

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura-“Luiz de Queiroz”

Processo alternativo ao tratamento ácido do fermento na produção de etanol

Gustavo Theodoro Peixoto

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

Piracicaba
2023

Gustavo Theodoro Peixoto
Engenheiro Químico

Processo alternativo ao tratamento ácido do fermento na produção de etanol

Orientador:
Prof. Dr. **THIAGO DE OLITTA BASSO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2023

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Peixoto, Gustavo Theodoro

Processo alternativo ao tratamento ácido do fermento na produção de etanol / Gustavo Theodoro Peixoto. - - Piracicaba, 2023.

69 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura-“Luiz de Queiroz”.

1. Etanol 3. *Lactobacillus* 5. *Sacharomyces cerevisiae* 6. Cinética de crescimento 7. Bacteriostático 8.

DEDICATÓRIA

Dedico à minha esposa e aos meus familiares,

AGRADECIMENTOS

É com imensa satisfação e gratidão que inicio este texto de agradecimento, pois alcançar este momento significativo em minha trajetória acadêmica não teria sido possível sem o apoio, orientação e incentivo de pessoas extraordinárias. Primeiramente, expresso minha profunda gratidão aos professores Thiago de Olitta Basso e Antonio Sampaio Baptista, que generosamente dedicaram seu tempo, conhecimento e expertise para orientar minha dissertação. Suas orientações críticas e valiosas foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. À minha esposa Ana Paula, minha eterna fonte de inspiração, agradeço por seu apoio incondicional, por compartilhar comigo não apenas os desafios, mas também as alegrias e momentos únicos. Sua presença na minha vida é, sem dúvida, a melhor coisa que já me aconteceu. Aos meus pais, Maria Tereza e Eraldo, e ao meu irmão Gabriel, expresso minha gratidão profunda por serem a base sólida que sustentou meus sonhos e aspirações. Seu amor, encorajamento e apoio constante foram pilares essenciais ao longo desta jornada. Aos amigos de Piracicaba, companheiros ímpares que enriqueceram minha experiência durante o mestrado, meu reconhecimento e carinho. Guilherme Nacata, Guilherme Torrezan, Artur, Lígia, Thiago, Laécio, Wellingson, Gustavo Valani, Raíssa, Thais e Rodolfo, cada um de vocês é parte indelével dessa conquista. À minha cunhada Rafaele, meu cunhado Dannylo e ao Gabriel, agradeço por todos os momentos compartilhados, pelo companheirismo e solidariedade. Não posso deixar de mencionar a contribuição inestimável dos estagiários Liandra, Igor e Karol, cuja colaboração foi vital para o avanço das pesquisas realizadas durante o mestrado. Agradeço também à Thamiris Guerra Giacon, do laboratório BELA (Poli-USP), pela valiosa ajuda na realização da cinética, assim como a Isabela que me orientou e explicou sobre o plaqueamento de microgotas, evidenciando o espírito colaborativo que permeou este percurso. A todos vocês, minha mais sincera gratidão. Cada gesto de apoio, incentivo e colaboração deixou uma marca indelével em minha jornada acadêmica. Este trabalho é também fruto do esforço coletivo, e por isso celebro não apenas a conclusão da minha dissertação, mas também as relações e parcerias construídas ao longo do caminho. Muito obrigado a todos que, de alguma forma, contribuíram para este importante capítulo da minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	11
7. CONCLUSÃO	14
REFERÊNCIAS.....	61

RESUMO

Processo alternativo ao tratamento ácido do fermento na produção de etanol

A contaminação dos meios fermentativos, em biorrefinarias de etanol combustível, é predominantemente ocasionada por bactérias ácido lácticas (LABs, do inglês lactic acid bacteria). Visto que, dependendo da intensidade de contaminação do processo produtivo, utilizam-se agentes químicos para combater os contaminantes, tais como os antibióticos e também agentes para acidificar o meio, como o ácido sulfúrico e o ácido clorídrico. Estes métodos de controle microbiano, apesar de eficazes, trazem problemas como corrosividade, seleção de microrganismos, insalubridade, impactos sobre as leveduras e no coproduto após a fermentação. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o impacto de soluções, com e sem a presença de compostos fitoquímicos sobre o crescimento de LABs contaminantes da fermentação alcoólica, e também sobre o crescimento da levedura industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. Foram realizados ensaios de forma isolada, com relação aos efeitos sobre as LABs e simultâneos (em co-cultivo) para avaliar os efeitos sobre leveduras e LABs. Ensaios de cinética de crescimento foram realizados para avaliar os potenciais de inibição das LABs homo- e hetero-fermentativas, em condições proliferativas. Assim como também foram testados os efeitos sinérgicos, separadamente, do ETA e ETB, quando adicionados nestas soluções. Seus resultados de inibição foram comparados com os efeitos da solução SAS-2,5LB, usado como o controle. Em seguida, foram realizados testes de co-cultivo utilizando LAB homo- e hetero-fermentativas e a levedura PE-2. Amostras dos ensaios de cinética de crescimento e co-cultivo também foram utilizadas para o plaqueamentos a fim de expressar os efeitos dos tratamentos avaliados sobre o crescimento microbiano, comparando estes efeitos com o controle. No primeiro ensaio, em relação ao crescimento das LABs foi observado que os efeitos de inibição de soluções com concentrações maiores que 15ET foi 5% maior do que o tratamento com SAS-2,5LB. Velocidades de crescimento específicas máximas No tocante ao efeito sinérgico entre as soluções e os compostos ETA e ETB, pode-se observar que 15ETB3LB, obteve um efeito de controle microbiano melhor que com solução SAS-2,5LB. Os resultados das curvas e plaqueamentos demonstraram que em 10ETB3LB, não houve crescimento das LABs, mas houve o aumento de 1 ciclo log de células de levedura. Conclui-se que os efeitos inibidores das soluções, juntamente com ETA e ETB, separadamente, possuem eficiências equiparáveis à solução SAS-2,5LB e pode ser utilizada como substituto do tratamento ácido nos ciclos celulares de leveduras para a produção de etanol.

Palavras-chave: Biorrefinarias, Etanol, Ácido sulfúrico, Levedura, Bactérias, Contaminação

ABSTRACT

Alternative process to the acid treatment of yeast in ethanol production

The contamination of fermentative media in fuel ethanol biorefineries is predominantly caused by lactic acid bacteria (LABs). Depending on the intensity of contamination in the production process, chemical agents such as antibiotics and acidifying agents like sulfuric and hydrochloric acid are used to combat contaminants. Despite their effectiveness, these microbial control methods bring issues such as corrosiveness, microorganism selection, unhealthiness, impacts on yeast, and on the byproduct after fermentation. In this context, the present study aimed to evaluate the impact of solutions, with and without the presence of phytochemical compounds, on the growth of contaminating LABs in alcoholic fermentation and on the growth of the industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. Isolated assays were conducted to assess the effects on LABs and simultaneous (co-culture) assays to evaluate effects on yeast and LABs. Growth kinetic assays were performed to assess the inhibition potentials of homo- and hetero-fermentative LABs under proliferative conditions using solutions. Synergistic effects of ETA and ETB, separately added to these solutions, were also tested and compared with the effects of SAS-2,5LB as a control. Co-culture tests were then conducted using homo- and hetero-fermentative LABs and yeast PE-2. Samples from growth kinetic and co-culture assays were plated to express the effects of the evaluated treatments on microbial growth, comparing these effects with the control. In the first assay, regarding LABs' growth, it was observed that the inhibition effects of solutions with concentrations higher than 15ET were 5% greater than SAS-2,5LB treatment in terms of maximum specific growth rates. Regarding the synergistic effect between solutions and ETA and ETB compounds, it was observed that 15ETB3LB had a better microbial control effect than SAS-2,5LB. Results showed that in 10ETB3LB, there was no LAB growth, but there was a 1-log cycle increase in yeast cells. In conclusion, the inhibitory effects of solutions, along with ETA and ETB separately, have efficiencies comparable to SAS-2,5LB and can be used as a substitute for acid treatment in yeast cell recycling for ethanol production

Keywords: Biorefineries, Ethanol, Sulfuric Acid, Yeast, Bacteria, Contamination

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, tem crescido o entusiasmo pela elaboração de sistemas produtivos ambientalmente sustentáveis. Desse modo, o foco de muitos países está direcionado para as fontes renováveis de energia, cujo etanol se evidencia como uma relevante estratégia (BELLUCO; ALCARDE, 2008).

O grande avanço na produção de etanol, ocorreu com a utilização do processo de reciclagem celular, denominado "Melle-Boinot", foi desenvolvido na década de 1930 por Firmino Boinot (França). Após o produto da fermentação ser centrifugado, são separados o vinho do creme de leveduras. O vinho é destinado para a destilação e o creme de leveduras para a fase de reciclo celular. Na fase de reciclo, o creme de leveduras é submetido a um processo de descontaminação realizada por ácidos (BREXÓ; SANT'ANA, 2017). Segundo BASSO et al. (2011) nas destilarias brasileiras produtoras de etanol a partir de cana, que operam em batelada alimentada e em processo contínuo, efetuam o reciclo de células de leveduras. Ainda conforme os mesmos autores, as leveduras sofrem inúmeros estresses durante o processo de fermentação, como: efeitos de altas temperaturas, pressão osmótica, pH baixo e contaminação bacteriana. De acordo com OLIVA-NETO E YOKOYA, (2001) a contaminação bacteriana por LABs causa sérios problemas de floculação durante a fermentação alcoólica. Além disso, essas bactérias produzem ácidos orgânicos que inibem o metabolismo das leveduras, diminuindo o rendimento da fermentação alcoólica.

Visando conter contaminações bacterianas, MENEGHIN et al. (2008), menciona que são adicionados ácido sulfúrico ou biocidas na lavagem do levedo. Porém, em relação a utilização do ácido sulfúrico no tratamento do levedo, o mesmo pode causar corrosão, tornar o processo perigoso para os trabalhadores e também tornar o tratamento de efluentes mais oneroso (CECCATO-ANTONINI, 2018); além dificultar o reaproveitamento das leveduras para nutrição animal e humana, e da vinhaça para fabricação de biogás. Visto que a aplicação de biocidas sintéticos apresenta pontos negativos, como: custos elevados e seleção de microrganismos resistentes MENEGHIN et al., 2008). A luz dos conhecimentos de OLIVA-NETO et.al (2013), o uso contínuo de antibióticos no controle de microrganismos, corresponde a seleção de bactérias mais resistentes à sua ação, tal qual, a modificação do equilíbrio natural de todos os microrganismos do processo. Segundo POVEDA, (2014), os resíduos de antibióticos ativos contidos na vinhaça, podem ser dispersados no solo durante o processo de fertirrigação. Além de ocorrer a presença de resíduos na vinhaça, Taube (2009), menciona que

em alguns países, resíduos de antibióticos presentes em leveduras destinadas para alimentação animal e humana, são inadmissíveis.

2. CONCLUSÃO

Nas cinéticas bacterianas, as soluções contendo 15ET juntamente com B1 a B3 ou A1 a A3 apresentaram resultados semelhantes em eficiência de inibição aos obtidos com 20ET e 25 ET. A utilização do controle de bactérias lácticas através da utilização do etanol juntamente com os compostos fotoquímicos testados, mostra ser uma tecnologia natural, com efeito inibitório de crescimento para os contaminantes, semelhante a solução SAS-2,5. Nas cinéticas de co-cultivo, o efeito inibitório das soluções com os compostos fitoquímicos testados, apresenta ocorrer em ambos os microrganismos. Porém, dependendo da concentração de ETALB ou ETBLB, mostra ser mais favorável ou menos favorável ao crescimento das leveduras.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, D. A. et al. Physiological and Transcriptional Responses to High Concentrations of Lactic Acid in Anaerobic Chemostat Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 18, p. 5759–5768, 1 ago. 2008.
- ALENCAR, S. M. DE et al. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais Chemical composition of *Baccharis dracunculifolia*, the botanical source of propolis from. *Ciência Rural*, v. 35, p. 909–915, 2005.
- ALEXANDRE, H. et al. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, v. 498, n. 1, p. 98–103, 2001.
- AMORIM, H. V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 91, n. 5, p. 1267–1275, 7 jul. 2011.
- ANDRIETTA, M. G. S.; STECKELBERG, C. E.; ANDRIETTA, S. R. Bioetanol – Brasil 30 anos na vanguarda. *MultiCiências*, v. 7, p. 1-16, 2007.
- ARAUJO BRUNO, V.; GONÇALVES, A. R. Renewable Liquid Transportation Fuels: The Cornerstone of the Success of Brazilian Bioenergy Program. *Biofuels in Brazil*, n. 978-3-319-05020-1, p. 61–68, 2014.
- BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, v. 26, n. 1, p. 89–105, 1 jan. 2008.
- BARTH, D. et al. DesinFix TM 135 in fermentation process for bioethanol production. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 45, n. 1, p. 323–325, 2014.
- BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol in Brazil. *FEMS Yeast Research*, Amsterdam, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.
- BASSO, L. C.; BASSO, T.O; ROCHA, S. N. Biofuel production – recent developments and prospects. 1. ed. Teodora Smiljanic: Petra Zobic, 2011. p. 85–100
- BASSO, T. O. et al. Homo- and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 105, n. 1, p. 169–177, 1 jan. 2014.
- BECKNER, M.; IVEY, M. L.; PHISTER, T. G. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. *Letters in Applied Microbiology*, v. 53, n. 4, p. 387–394, 2 ago. 2011.
- BELLUCO, A. E. DE S.; ALCARDE, A. R. Cana e milho: métodos distintos convergem ao etanol Visão agrícola. [s.l: s.n.].
- BONATELLI, M. L. et al. Characterization of the contaminant bacterial communities in sugarcane first-generation industrial ethanol production. *FEMS Microbiology Letters*, v. 364, n. 17, 25 jul. 2017.
- BREGAGNOLI, F.C.R. Comportamento fisiológico de microrganismos submetidos à biocidas convencional e natural na produção de cachaça orgânica. (Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias). Unesp, Jaboticabal – SP, 2006, p. 69.

- BREXÓ, R. P.; SANT'ANA, A. S. Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 73, p. 423–434, jun. 2017.
- BRITO, A. F. RESPOSTA AO ESTRESSE POR ETANOL EM *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735: UMA ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA E DO PERFIL METABÓLICO. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2015. Acesso em: 6 ago. 2023.
- BRUNO, V. DE A.; GONÇALVES, A. R. *Biofuels in Brazil*. New York: Springer International Publishing, 2014. p. 61–68
- COSTA, M. A. S.; CERRI, B. C.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Ethanol addition enhances acid treatment to eliminate *Lactobacillus fermentum* from the fermentation process for fuel ethanol production. *Letters in Applied Microbiology*, v. 66, n. 1, p. 77–85, 2017.
- CAMARGO, C.A.; USHIMA, A.H.; RIBEIRO, A.M.M.; SOUZA, M.E.P.; SANTOS, N.F. Conservação de energia na indústria do açúcar e álcool: manual de recomendações. Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, 1990. 797p. (Publicações IPT 1817).
- CANETTA, E.; ADYA, A. K.; WALKER, G. M. Atomic force microscopic study of the effects of ethanol on yeast cell surface morphology. *FEMS Microbiology Letters*, v. 255, n. 2, p. 308–315, fev. 2006.
- CARLOS, L.; OLITTA, T.; NITSCHKE, S. Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. *Biofuel Production-Recent Developments and Prospects*, v. 1530, 2011.
- CARMELO, V.; SANTOS, H.; SÁ-CORREIA, I. Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1325, n. 1, p. 63–70, abr. 1997.
- CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. *Fermentação Descontínua Alimentada*. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. 1. Ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher. 2001. v 2. P. 205-212
- CASERTA, R. et al. Citrus biotechnology: What has been done to improve disease resistance in such an important crop? *Biotechnology Research and Innovation*, v. 3, 3 jan. 2020.
- CECCATO-ANTONINI, S. R. Conventional and nonconventional strategies for controlling bacterial contamination in fuel ethanol fermentations. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 34, n. 6, p. 1–11, 2018.
- CESCONETO, F. R. et al. Materiais celulares vítreos obtidos via colagem de gel de uma emulsão de óleo vegetal. *Revista Materia*, v. 21, n. 2, p. 385–390, 2016.
- COSTA, M. A. S.; CERRI, B. C.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Ethanol addition enhances acid treatment to eliminate *Lactobacillus fermentum* from the fermentation process for fuel ethanol production. *Letters in Applied Microbiology*, v. 66, n. 1, p. 77–85, 21 dez. 2017.
- CORADINI, A. L. V. et al. QTL mapping of a Brazilian bioethanol strain links the cell wall protein-encoding gene *GAS1* to low pH tolerance in *S. cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, v. 14, n. 1, dez. 2021.
- DELLA-BIANCA, B. E. et al. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 97, n. 3, p. 979–991, 28 dez. 2012.

- DE MAN, J. C.; ROGOSA, d M.; SHARPE, M. Elisabeth. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of applied Bacteriology*, v. 23, n. 1, p. 130-135, 1960.
- DE MELO, H. F. et al. Physiological and molecular analysis of the stress response of *Saccharomyces cerevisiae* imposed by strong inorganic acid with implication to industrial fermentations. *Journal of Applied Microbiology*, v. 109, n. 1, p. 116–127, 10 jun. 2010.
- DEPARIS, Q. et al. Engineering tolerance to industrially relevant stress factors in yeast cell factories. *FEMS Yeast Research*, v. 17, n. 4, 1 jun. 2017.
- DIAS, M. O. S. et al. Simulation of ethanol production from sugarcane in Brazil: economic study of an autonomous distillery. (S. Pierucci, G. B. Ferraris, Eds.)20th European Symposium on Computer Aided Process Engineering – ESCAPE20. Anais...Elsevier, 2010.
- DOĞAN, A. et al. Improvements of Tolerance to Stress Conditions by Genetic Engineering in *Saccharomyces Cerevisiae* during Ethanol Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 174, n. 1, p. 28–42, 8 jun. 2014.
- EITH, C.; KOLB, M.; RUMI, A.; SEUBERT, A.; VIEHWEGER, K. H. *Práticas em Cromatografia de íons: Uma Introdução*. 2006. 142p. Metrohm, 2006.
- FERNANDES JÚNIOR, A. et al. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. *Ciência Rural*, v. 36, n. 1, p. 294–297, 2006.
- GIBNEY, P. et al. Characterizing the in vivo role of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae* using the AGT1 transporter. 2015. Acesso em: 25 abr. 2023.
- GIBSON, B. R. et al. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling: Figure 1. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 31, n. 5, p. 535–569, set. 2007.
- GIERSCH, R. M. et al. Gene drive inhibition by the anti-CRISPR proteins AcrIIA2 and AcrIIA4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, v. 164, n. 4, p. 464–474, 1 abr. 2018.
- GÓES-FAVONI, S. P. DE et al. Fermentação alcoólica na produção de etanol e os fatores determinantes do rendimento. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, v. 9, n. 4, p. 285–296, 23 maio 2018.
- GOLDEMBERG, J.; MACEDO, I. C. Brazilian alcohol program: an overview. *Energy for Sustainable Development*, v. 1, n. 1, p. 17–22, maio 1994.
- GOMES, A. M. *Extrato de lúpulo no controle bacteriano em usinas de etanol*. Goiás, 2020.
- GUERREIRO, J. F. et al. Sphingolipid biosynthesis upregulation by TOR complex 2–Ypk1 signaling during yeast adaptive response to acetic acid stress. *Biochemical Journal*, v. 473, n. 23, p. 4311–4325, 25 nov. 2016.
- GRAVES, T. et al. Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 33, n. 6, p. 469–474, 21 fev. 2006.
- HALLSWORTH, J. E. Ethanol-induced water stress in yeast. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 85, n. 2, p. 125–137, 1998.
- HE, X. et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* on the ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 105, n. 6, p. 2597–2611, mar. 2021.

INGRAM, L. ETHANOL TOLERANCE IN BACTERIA I. MECHANISM OF ACTION OF ETHANOL ON BACTERIA. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 9, n. 4, 1990.

INGLEDEW, W. M. Continuous fermentation in the fuel alcohol industry: How does the technology affect yeast? in the alcohol textbook. 4. ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. p. 135–144

INGLEDEW, W. M. Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer, in the alcohol textbook. 3rd ed. UK: Nottingham University Press; 1999.

JIMÉNEZ-GUTIÉRREZ, E. et al. Not just the wall: the other ways to turn the yeast CWI pathway on. *International Microbiology*, v. 23, n. 1, p. 107–119, 24 jul. 2019.

JÚNIOR, J. B. C. Tecnologia e Fabricação do Alcool. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria: Inhumas: IFG, 2012. p. 31–44

KRCE, L. et al. A simple interaction-based *E. coli* growth model. *Physical Biology*, v. 16, n. 6, p. 066005, 18 set. 2019.

KUBOTA, S. et al. Effect of ethanol on cell growth of budding yeast: Genes that are important for cell growth in the presence of ethanol. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 68, n. 4, p. 968–972, 2004.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, v. 11, p. 641–649, 1981.

LEITE, N. et al. ANÁLISE DA BIOATIVIDADE E EFEITO BACTERICIDA DO NOVO COMPÓSITO DE nHap/MWCNT FUNCIONALIZADOS. Uberlândia: XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – CBEB, 2014. Acesso em: 19 jul. 2023.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. *Biotecnologia industrial*. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher, Reimpr, 2001. v. 3p. 1–43

LIU, Y. P.; ZHENG, P.; SUN, Z. H.; NI, Y.; DONG, J. J.; ZHU, L. L. Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresources Technology*, v. 99, p. 1736–1742, 2008.

LUCENA, R. M. et al. Extreme Low Cytosolic pH Is a Signal for Cell Survival in Acid Stressed Yeast. *Genes*, v. 11, n. 6, p. 656, 16 jun. 2020.

LUND, P.; TRAMONTI, A.; DE BIASE, D. Coping with low pH: molecular strategies in neutrophilic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 38, n. 6, p. 1091–1125, nov. 2014.

MA, M.; LIU, Z. L. Mechanisms of ethanol tolerance in *saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 87, n. 3, p. 829–845, 2010.

MAKINO, Y. Model for Aerobic Growth of *Bacillus Amyloliquefaciens* in Processed Soy Sauce under Various Conditions of Temperature, Initial Dry Cell Mass and Ethanol Concentration. *Food Science and Technology Research*, v. 11, n. 1, p. 115–121, 2005.

MAGER, W.; SIDERIUS, M. Novel insights into the osmotic stress response of yeast. *FEMS Yeast Research*, v. 2, n. 3, p. 251–257, ago. 2002.

MCKELLAR, R. C.; LU, X. *CRC Series in CONTEMPORARY FOOD SCIENCE MODELING MICROBIAL RESPONSES in FOOD*. Boca Raton: CRC Press, 2004.

MENDONÇA, A. A. et al. *Lactobacillus vini*: mechanistic response to stress by medium acidification. *Microbiology*, v. 165, n. 1, p. 26–36, 1 jan. 2019.

MENEGHIN, S. P. et al. Chlorine dioxide against bacteria and yeasts from the alcoholic fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, n. 2, p. 337–343, 2008.

MIRA, N. P.; TEIXEIRA, M. C. Microbial mechanisms of tolerance to weak acid stress. *Frontiers in Microbiology*, v. 4, 2013.

NARENDRANATH, N. V.; POWER, R. Relationship between pH and Medium Dissolved Solids in Terms of Growth and Metabolism of *Lactobacilli* and *Saccharomyces cerevisiae* during Ethanol Production. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 5, p. 2239–2243, maio 2005.

NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Acetic Acid and Lactic Acid Inhibition of Growth of *Saccharomyces Cerevisiae* by Different Mechanisms. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, v. 59, n. 4, p. 187–194, set. 2001.

NAVARRO-TAPIA, E.; QUEROL, A.; PÉREZ-TORRADO, R. Membrane fluidification by ethanol stress activates unfolded protein response in yeasts. *Microbial Biotechnology*, v. 11, n. 3, p. 465–475, 22 fev. 2018.

OHTA, E. et al. Metabolomic approach for improving ethanol stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 121, n. 4, p. 399–405, 2016.

- OLIVA-NETO, P. de; DORTA, C.; CARVALHO, A. F. A.; MARTA, V.; LIMA, G. de; SILVA, D. F. The Brazilian technology of fuel ethanol fermentation - yeast inhibition factors and new perspectives to improve the technology. *Materials and Processes for Energy*, v. 1, n. 56, p. 371-379, 2013.
- PACHECO, A. et al. Hexose transport in *Torulaspora delbrueckii*: identification of Igt1, a new dual-affinity transporter. *FEMS Yeast Research*, v. 20, n. 1, 25 jan. 2020.
- PALMA, M.; GUERREIRO, J. F.; SÁ-CORREIA, I. Adaptive Response and Tolerance to Acetic Acid in *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*: A Physiological Genomics Perspective. *Evolutionary and Genomic Microbiology*, a section of the journal *Frontiers in Microbiology*, v. 9, 2018.
- PARAPOULI, M. et al. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiology*, v. 6, n. 1, p. 1–32, 11 fev. 2020.
- PELEG, M.; CORRADINI, M. G. Microbial Growth Curves: What the Models Tell Us and What They Cannot. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 51, n. 10, p. 917–945, dez. 2011.
- PEÑA, A. et al. Effects of high medium pH on growth, metabolism and transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research*, v. 15, n. 2, p. 1–13, 2015.
- PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; VALERO, A. *Predictive Microbiology in Foods*. New York: Springer, 2013.
- PIERCE, J.S. Analysis committee: measurement of yeast viability. *Journal of the Institute of Brewing*, v.76, p.442-443, 1970.
- POVEDA, M. M. R. ANÁLISE ECONÔMICA E AMBIENTAL DO PROCESSAMENTO DA VINHAÇA COM APROVEITAMENTO ENERGÉTICO. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2014.
- RFA. Annual Ethanol Production. Disponível em: <<https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production>>. Acesso em: 12 abr. 2023.
- RIBEIRO, R. A.; BOURBON-MELO, N.; SÁ-CORREIA, I. The cell wall and the response and tolerance to stresses of biotechnological relevance in yeasts. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, 28 jul. 2022.
- RICH, J. O.; LEATHERS, T. D.; BISCHOFF, K. M.; ANDERSON, A. M.; NUNNALLY, M. S. Biofilm formation and ethanol inhibition by bacterial contaminants of biofuel fermentation. *Bioresource Technology*, v. 196, p. 347-354, 2015.
- SALDAÑA, C. et al. Rapid and reversible cell volume changes in response to osmotic stress in yeast. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 52, n. 2, p. 895–903, 21 jan. 2021.
- SAUER, M. et al. Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends in Biotechnology*, v. 26, n. 2, p. 100–108, fev. 2008.
- SEKOAI, P. T.; MHLONGO, S. I.; EZEOKOLI, O. T. Progress in the development of methods used for the abatement of microbial contaminants in ethanol fermentations: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, v. 18, n. 4, p. 795–821, 27 ago. 2019.
- SKINNER, K. A.; LEATHERS, T. D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 31, n. 9, p. 401–408, 28 ago. 2004.
- SONEGO, J. L. S. Estudo da produção de etanol de sacarose por fermentação extrativa utilizando arraste com dióxido de carbono. Tese—São Carlos: UFSCar: 2016.

SWINNEN, S. et al. Identification of novel causative genes in an industrially important trait using pooled segregant whole-genome sequence analysis. *Molecular Cell*, p. 1–31, 2011.

SUGIYAMA, M. et al. Nuclear Localization of Haa1, Which Is Linked to Its Phosphorylation Status, Mediates Lactic Acid Tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, n. 11, p. 3488–3495, jun. 2014.

TAUBE, J.S. O negócio é ser natural. *Revista Canamix*, Ribeirão Preto, 2009.

ULLAH, A. et al. Yeast adaptation to weak acids prevents futile energy expenditure. *Frontiers in Microbiology*, v. 4, 2013.

VAN UDEN, N. ETHANOL TOXICITY AND ETHANOL TOLERANCE IN YEASTS. Portugal: Academic Press, 1985. Acesso em: 26 abr. 2023.

VASCONCELOS, J. N. de. Fermentação Etanólica. In; SANTOS, Fernando; BORÉM, Aluizio; CALDAS, Celso. *Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e álcool – tecnologias e perspectivas*. 22. ed. Viçosa: UFV, 2010. p. 401-437.

VELOSO, I. I. K. Modelagem e otimização da fermentação alcoólica em batelada alimentada a baixa temperatura. Dissertação—Universidade Federal de São Carlos: 2019.

VENTURA, R. Quantificação do ácido láctico na fermentação etanólica como parâmetro de monitoramento do processo. 2007. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

VERGHESE, J.; ABRAMS, J.; WANG, Y. Biology of the Heat Shock Response and Protein Chaperones: Budding Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a Model System. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 76, jun. 2012.

ZAGO, E.A.; SILVA, L.F.L.F.; BERNARDINO, C.D.; AMORIM, H.V. Métodos analíticos para o controle da produção de álcool e açúcar. Piracicaba: ESALQ FERMENTEC, 1996.

WALKER, G. M., & BASSO, T. O. (2020). Mitigating stress in industrial yeasts. *Fungal Biology*, 124(5), 387–397. <https://doi.org/10.1016/J.FUNBIO.2019.10.010>

WALKER, G. M.; WALKER, R. S. K. (2018) Enhancing Yeast Alcoholic Fermentations. *Advances in Applied Microbiology*, p. 87–129, 2018.