

A FERMENTAÇÃO ETANÓLICA NO BRASIL

características e peculiaridades

1.1 INTRODUÇÃO

O grande estímulo à produção de etanol no Brasil aconteceu nos anos 1970 devido à crise do petróleo, quando o governo federal lançou o Programa Nacional do Álcool, o Proálcool. Naquele momento, o etanol produzido era adicionado à gasolina, mas com a segunda crise do petróleo em 1979, a indústria automobilística brasileira iniciou a produção de carros movidos a etanol. Desde então, a produção de etanol no país passou por diferentes fases, alternando estímulo e estagnação, as quais estão resumidas na Tabela 1.1.

O etanol pode ser produzido por via química ou microbiológica, sendo a última a mais importante rota usada para sua produção em todo o mundo, em um processo conhecido como fermentação alcoólica ou etanólica. Durante esse processo, açúcares são convertidos por leveduras em etanol, energia, biomassa celular, dióxido de carbono (CO_2) e outros subprodutos. As fontes de açúcar são variadas; no Brasil, a principal matéria-prima é a cana-de-açúcar, enquanto nos Estados Unidos o etanol é produzido a partir do milho – os dois países são os maiores produtores de etanol no mundo. Tanto a cana-de-açúcar quanto o milho são plantas C_4 com alta eficiência na conversão do CO_2 atmosférico e água em açúcar e polímeros, como amido, celulose e hemicelulose, por meio da fotossíntese, que utiliza a energia da luz solar para fixar carbono e liberar oxigênio no ar atmosférico. Desta forma, todo o CO_2 resultante da queima do etanol é reciclado por meio

da fotossíntese. A taxa de redução das emissões de gases do efeito estufa é de 40 a 62% quando se utiliza etanol de cana-de-açúcar em comparação com a gasolina.²

Tabela 1.1 Linha do tempo evidenciando os principais eventos e consequências relacionados à produção de etanol no Brasil.

Data/período	Principal evento	Consequências
Até os anos 1970	Disponibilidade e baixo custo dos derivados do petróleo	Inibição do desenvolvimento do etanol carburante.
Outubro de 1973	Crise do petróleo	A crise internacional aumentou as despesas do Brasil com importação de petróleo, provocando déficit na balança comercial e consequente aumento da dívida externa brasileira e da inflação.
14 de novembro de 1975	Criação do Proálcool para estímulo da produção nacional de etanol carburante	Redução da importação de petróleo pelo estímulo à substituição da gasolina por etanol.
1975 a 1979 (primeira fase do Proálcool)	Produção de álcool anidro para ser misturado à gasolina	A produção brasileira de etanol cresceu de 600 milhões para 3,4 bilhões de litros/ano em quatro anos. Surgimento dos primeiros carros movidos exclusivamente a álcool em 1978.
1980 a 1986 (segunda fase do Proálcool)	O segundo choque do petróleo em 1979-1980 consolidou o programa	A produção de etanol atingiu 12,3 bilhões de litros em 1986-1987 e a proporção de carros movidos a álcool aumentou de 0,46% em 1979 para 26,8% em 1980, chegando a 76,1% em 1986.
1986 a 1995 (terceira fase do Proálcool)	Fase de estagnação do Proálcool devido aos preços do barril de óleo bruto diminuírem significativamente	Escassez de recursos públicos para estímulo aos combustíveis alternativos, baixa oferta de etanol frente ao crescimento da demanda por carros movidos a álcool, gerando crise de desabastecimento.
1995 a 2000 (quarta fase do Proálcool)	Fase de redefinição do programa, com a liberação dos mercados do álcool anidro e hidratado em todas as fases de produção	Preços determinados pelas condições de oferta e demanda. Houve queda significativa na produção de veículos movidos a álcool.
2001 a 2008	Corrida para ampliação de unidades por decisões da iniciativa privada e desenvolvimento da tecnologia dos motores <i>flex fuel</i> em 2003	A produção de automóveis <i>flex fuel</i> ultrapassou a de movidos a gasolina em 2005. Aumento da expectativa do produtor de etanol em investir na ampliação da safra, evidenciado pelo aumento vertiginoso da moagem da cana em um período de 30 anos. Aceleração do fim das queimadas da cana, aumento da mecanização da colheita e da área plantada.

2 Wang *et al.* (2012), Lopes *et al.* (2016).

Tabela 1.1 *Continuação...*

Data/período	Principal evento	Consequências
2008 a 2015	Longa crise no setor sucroalcooleiro devido a fatores internos e externos	Investidores suspenderam a construção de novas usinas, fechamento de unidades produtoras e estagnação na produção de cana, açúcar e etanol. Os principais fatores internos e externos geradores da crise são: reservas de petróleo do pré-sal, subsídio à gasolina, competição cana x alimentos quanto à área plantada, falta de política de apoio aos biocombustíveis, fatores climáticos e baixa produtividade.
2016 até o momento	Criação da Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio) em 2017	O RenovaBio, objetivando o estímulo do uso de biocombustíveis e redução do consumo de derivados de petróleo, cria uma nova fonte de receita para as usinas, que são os Créditos de Descarbonização (C BIO) emitidos pelos produtores e negociados na Bolsa de Valores. A emissão dos C BIOs considera o volume de biocombustível produzido e a eficiência energético-ambiental de cada usina.

Fonte: Alcarde; Cortez *et al.*; Almeida, Longhi e Santos; Centro Nacional das Indústrias do Setor Sucroenergético e Biocombustíveis.³

Embora o Brasil e os Estados Unidos sejam os maiores produtores mundiais de etanol, há diferenças significativas entre os processos fermentativos utilizados. As destilarias brasileiras utilizam um processo aperfeiçoado que foi patenteado em 1937 por Firmino Boinot da região de Melle, na França, denominado *Melle-Boinot*, o qual consiste na reciclagem das células de levedura ao final de cada ciclo fermentativo.⁴

O processo fermentativo tal qual é utilizado no Brasil apresenta peculiaridades que o tornam produtivo e permitem ciclos rápidos de fermentação; no entanto o torna também suscetível à contaminação por microrganismos indesejáveis. O reciclo das células implica que, ao final de cada fermentação, o mosto fermentado (chamado de vinho) é centrifugado para a separação em células de leveduras e vinho delevedurado, o qual segue para a destilação para obtenção do etanol. O creme concentrado de células sofre tratamento com uma solução aquosa de ácido sulfúrico (pH 2,0-2,5, por 1 a 2 horas) na etapa que é conhecida como tratamento ácido

³ Alcarde (2008), Cortez *et al.* (2016), Almeida, Longhi e Santos (2017), Centro Nacional das Indústrias do Setor Sucroenergético e Biocombustíveis (2020).

⁴ Lopes *et al.* (2016).

do fermento, cujo principal objetivo é diminuir a quantidade de contaminantes bacterianos e promover a desfloculação do fermento, se for o caso. As células tratadas com ácido retornam para os tanques de fermentação onde novo mosto de fermentação é introduzido para novo ciclo de fermentação.⁵

O processo fermentativo brasileiro utiliza tanques (dornas) de fermentação de grande capacidade (0,5 a 3 milhões de litros), altas densidades celulares (10-15% m/v), curtos períodos de fermentação (6-12 horas) e mostos de cana-de-açúcar constituídos de caldo de cana ou melaço diluído ou a mistura de ambos. As destilarias anexas às fábricas de açúcar (usinas) geralmente utilizam o melaço, subproduto originado da fabricação de açúcar, diluído com água ou misturado com caldo de cana como mosto de fermentação, enquanto as destilarias autônomas empregam somente o caldo de cana na fermentação.⁶ Ao final, o teor alcoólico atinge 7-11% (v/v) e a concentração de açúcar residual no vinho é inferior a 0,1%. O vinho é centrifugado para a separação das células de leveduras, que recebem o tratamento com ácido sulfúrico, em seguida retornando aos tanques de fermentação para novo ciclo fermentativo. A safra da cana dura cerca de 200 a 300 dias; considerando ciclos de fermentação de 12 horas, as células de leveduras são recicladas aproximadamente 400 a 600 vezes durante a safra. O reciclo celular e a não assepsia do processo são peculiaridades do processo fermentativo brasileiro.⁷

A destilação do vinho resulta em etanol hidratado (96% em volume) ou álcool anidro, após desidratação com cicloexano, monoetileno glicol ou por meio de peneiras moleculares.⁸ O principal resíduo do processo fermentativo em termos de volume é gerado após a destilação do vinho, constituindo a vinhaça, um líquido escuro, ácido, rico em minerais, como potássio, cálcio, magnésio, nitrogênio e fósforo, e que é utilizado como fertilizante nas planta-

5 Id. *ibid.*

6 Amorim, Basso e Lopes (2009).

7 Amorim *et al.* (2011).

8 Wheals *et al.* (1999).

ções de cana-de-açúcar. As destilarias brasileiras produzem cerca de 10 a 15 litros de vinhaça para cada litro de etanol.⁹

Embora o reciclo de células seja característica comum a todas as unidades produtoras de etanol, não há um padrão único de processo adotado por todas as destilarias brasileiras, variando o sistema de fermentação, a composição e o tratamento do mosto de fermentação, as linhagens de leveduras empregadas como iniciadoras, as condições operacionais do processo e o tratamento do fermento, entre outros. Ao se considerar a fermentação como um processo vivo, é importante ter a compreensão de como esse processo ocorre em nível microscópico assim como as influências a que está sujeito em decorrência das características do processo industrial.

1.2 BIOQUÍMICA DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

O etanol pode ser produzido pela fermentação de açúcares presentes em produtos agrícolas ou em resíduos vegetais.¹⁰ Atualmente a produção de etanol em nível industrial, obtida pela fermentação alcoólica, utiliza predominantemente matérias-primas contendo açúcares e amidos, por serem economicamente mais favoráveis.¹¹ No Brasil, utiliza-se majoritariamente a cana-de-açúcar como matéria-prima para a produção de etanol.¹²

A produção de etanol por via fermentativa é constituída basicamente de três etapas, sendo elas o preparo do mosto, o processo fermentativo e a destilação do vinho fermentado. Inicialmente a cana é moída, obtendo-se um caldo com 78% a 86% de água e 10% a 20% de sacarose, além de açúcares redutores, cinzas e compostos nitrogenados, que são de 0,8% a 3,5% no total, com pH que varia de 5,2 a 6,8. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* realiza a conversão dos açúcares em etanol pela via fermentativa¹³ e é a espécie microbiana mais utilizada nos processos industriais devido às suas

9 Mutton, Rossetto e Mutton (2010), Amorim *et al.* (2011).

10 Baptista *et al.* (2006).

11 Hira e Oliveira (2009).

12 Basso *et al.* (2008), Della-Bianca *et al.* (2013).

13 Lima, Basso e Amorim (2001).

características de alta produtividade em etanol, alta tolerância ao etanol e habilidade de fermentar uma ampla gama de açúcares.

Segundo Lima, Basso e Amorim,¹⁴ o processo industrial de fermentação alcoólica pode ser dividido em três fases: fermentação preliminar ou pré-fermentação, fermentação principal ou tumultuosa e fermentação complementar ou pós-fermentação. A fermentação preliminar inicia-se com a adição do mosto à massa de leveduras. Quando o inóculo é pequeno, esta fase caracteriza-se pela multiplicação das leveduras, com conseqüente consumo de açúcares e lenta produção de álcool. Portanto, deve-se utilizar uma quantidade maior de leveduras de rápida multiplicação. Com o aumento da produção de álcool, evidenciado pela produção de gás carbônico, tem-se o final desta fase e o início da fase de fermentação principal ou tumultuosa.

As principais características da fase de fermentação principal são: intensa produção de álcool e liberação de CO₂, aumento da temperatura, que deve ser controlada por resfriamento, progressivo aumento de espuma e elevação da acidez do mosto. A fermentação principal cessa quando diminui a liberação de gás e, conseqüentemente, a turbulência característica do mosto. Na fase de pós-fermentação verifica-se a diminuição da temperatura do vinho, elevação da acidez e a diminuição da atividade de fermentação da levedura devido ao acúmulo de determinadas substâncias, do esgotamento dos carboidratos e dos produtos metabólicos dos contaminantes.

Bioquimicamente falando, a fermentação é a oxidação incompleta do açúcar, gerando como subproduto um composto orgânico oxidável. Inicialmente, a sacarose, que é o açúcar de reserva da cana, sofre hidrólise pela enzima invertase, sendo convertida nos monossacarídeos glicose e frutose. Esta enzima é codificada pelo gene *SUC2*, sendo encontradas duas variantes da enzima em *S. cerevisiae*: uma forma glicosilada, sujeita à repressão da glicose e secretada no espaço periplasmático (fora da célula, entre a parede celular e a membrana citoplasmática), também denominada invertase extracelular, e uma forma não glicosilada, que é constitutivamente produzida e presente no citosol da célula, conhecida por

14 Id. ibid.

invertase intracelular. A forma glicosilada representa a maior parte da atividade desta enzima em *S. cerevisiae*.¹⁵ Os monossacarídeos glicose e frutose entram na célula por difusão facilitada e sofrem fosforilação intracelular na primeira etapa do ciclo glicolítico. No entanto, no caso do transporte ativo da sacarose para dentro da célula, o rendimento em ATP é 25% menor (3 ATPs são produzidos ao invés de 4 ATPs), uma vez que um ATP é consumido pelas bombas H⁺-ATPase para liberar o próton que entrou junto com o dissacarídeo.¹⁶ Dentro da célula, a sacarose é convertida em glicose e frutose pela ação da invertase intracelular.

De uma forma ou outra, ambos monossacarídeos entram na via glicolítica e, através de uma sequência de reações, são convertidos a piruvato. Este primeiramente é descarboxilado pela enzima piruvato descarboxilase, formando acetaldeído e liberando CO₂. Posteriormente, o acetaldeído é reduzido a etanol, sendo esta reação catalisada pela enzima álcool desidrogenase.¹⁷

A fermentação alcoólica pode ser esquematizada pela seguinte equação:



A fermentação alcoólica resulta de dois processos distintos: glicólise (via de Embden-Meyerhof-Parnas) e metabolismo anaeróbio do piruvato. Em microrganismos eucarióticos, a glicólise realiza-se na matriz citoplasmática e divide-se em duas partes: a fase inicial de seis carbonos e a fase final de três carbonos. A finalidade do metabolismo do açúcar é gerar uma forma de energia, o ATP, que será empregado na realização de diversas funções fisiológicas (absorção, excreção e outras) e biossínteses necessárias à manutenção da vida, crescimento e multiplicação da levedura.¹⁸

Na fase de seis carbonos ocorre a fosforilação da glicose, por duas vezes, originando a frutose-1,6-difosfato, com consumo de duas moléculas de ATP. A frutose-1,6-difosfato é quebrada para liberar

15 Carlson e Botstein (1982).

16 Weusthuis *et al.* (1994).

17 Nelson e Cox (2014).

18 Id. *ibid.*

duas trioses diferentes, o gliceraldeído-3-fosfato (aldose) e a di-hidroxiacetona fosfato (cetose) por ação da enzima aldolase. Somente o gliceraldeído-3-fosfato pode ser diretamente degradado nas reações seguintes da glicólise, no entanto a di-hidroxiacetona fosfato é rápida e reversivelmente convertida em gliceraldeído-3-fosfato pela enzima triose fosfato isomerase. Desta forma, as etapas seguintes até a formação de etanol correm em dobro.¹⁹

Na fase de três carbonos ocorre a conversão a piruvato, formando-se quatro moléculas de ATP. O processo de redução de piruvato a etanol pode ser dividido em duas etapas: na primeira etapa ocorre a descarboxilação do piruvato em uma reação irreversível catalisada pela piruvato descarboxilase; na segunda, o acetaldeído é reduzido a etanol.²⁰

O etanol e o CO₂ não são os únicos produtos obtidos por meio da fermentação alcoólica. Além destes há vários subprodutos, como ácidos orgânicos, outros álcoois e o glicerol.²¹ O glicerol é o principal subproduto da fermentação etanólica, sendo sintetizado pela redução da di-hidroxiacetona fosfato a glicerol-3-fosfato e em seguida pela defosforilação deste a glicerol. As enzimas que catalisam estas reações são produtos dos genes *GPD1* ou *GPD2* e *GPP1* ou *GPP2*, e esta via parece ser a única rota para a produção de glicerol em *S. cerevisiae*, uma vez que mutantes *gpd1/gpd2* são incapazes de produzir glicerol. O glicerol tem um importante papel na manutenção do balanço redox da célula, como precursor de fosfolipídios e triacilglicerolipídios e como osmorregulador.²² Importante destacar o papel do glicerol no balanço redox durante a fermentação. Em condições anaeróbias, o acoplamento da glicólise e produção de etanol apresenta balanço nulo de oxirredução; no entanto, a síntese de ácidos orgânicos assim como algumas reações anabólicas produzem excesso de NADH, causando desbalanço redox. A redução da di-hidroxiacetona fosfato a glicerol-3-fosfato ocorre à custa de um NADH.²³

19 Id. *ibid.*

20 Id. *ibid.*

21 Bai, Anderson e Moo-Young (2008).

22 Nevoigt e Stahl (1997).

23 Pagliardini *et al.* (2013).

A transformação da sacarose em etanol e CO_2 envolve 12 reações em sequência ordenada, cada uma catalisada por uma enzima específica, conforme esquema da Figura 1.1.

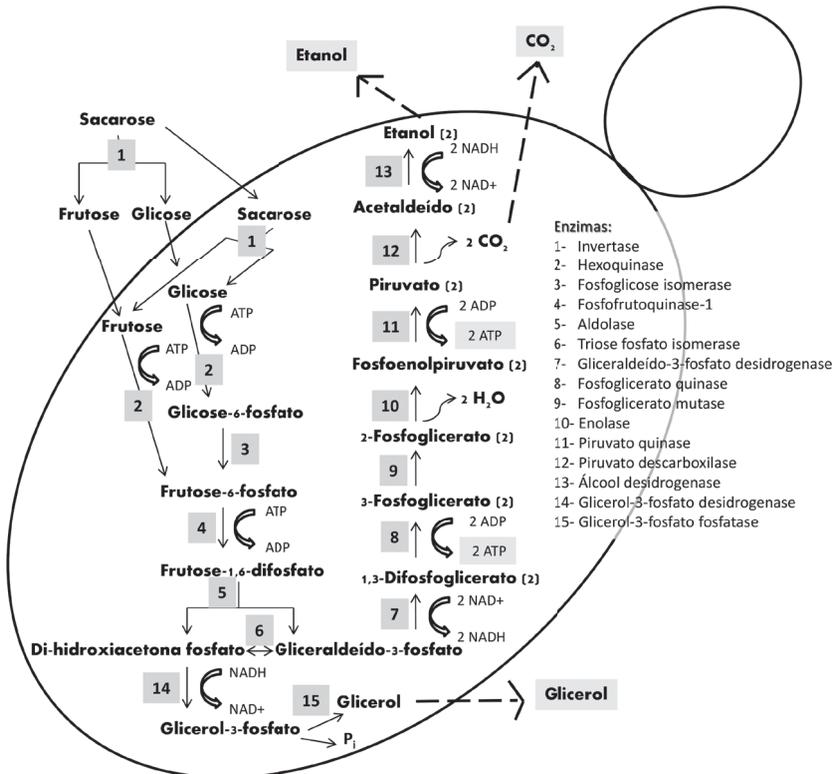


Figura 1.1 Esquema representativo das etapas de conversão de açúcares a etanol, CO_2 e glicerol que ocorrem no citosol das células de leveduras. O esquema representa a hidrólise da sacarose pela enzima invertase, que ocorre tanto extra quanto intracelularmente.

Fonte: modificada de Costa.²⁴

Considerando-se o fator estequiométrico pela equação de Gay-Lussac, a partir de 1 g de glicose poderiam ser produzidos

24 Costa (2017).

0,51 g de etanol e 0,49 g de dióxido de carbono, porém vários fatores, como contaminação bacteriana, contaminação por leveduras nativas, condições não ideais de pH e temperatura, entre outros, e até mesmo a síntese celular e de produtos secundários, limitam o rendimento estequiométrico a valores da ordem de 92-93% do rendimento teórico.²⁵

1.3 PREPARO DO MOSTO

Com a desregulamentação do setor sucroalcooleiro em 1990, reduzindo a intervenção do governo e a liberação da exportação de açúcar, houve aumento considerável na exportação deste produto e, como consequência, as usinas foram anexadas às destilarias autônomas existentes, consolidando o modelo de produção de açúcar e etanol de modo integrado, que persiste até hoje.²⁶

A integração açúcar-etanol reverberou de forma significativa no processo fermentativo para produção de etanol, uma vez que os mostos de fermentação podem variar entre as unidades produtoras e até mesmo dentro de uma mesma safra, a depender dos preços do açúcar, do etanol e da gasolina nos mercados interno e externo. Este *trade-off* resulta na variação da disponibilidade de caldo de cana ou melaço para a produção de etanol, uma vez que, com a preferência pela produção de açúcar, o caldo de cana é mobilizado para a usina, restando o melaço, subproduto da fabricação de açúcar, como mosto para a fermentação alcoólica.

A Figura 1.2 ilustra os processos de produção integrada de açúcar e etanol, com destaque para os principais subprodutos gerados, tais como vinhaça, melaço e bagaço.

25 Della-Bianca *et al.* (2013).

26 Dias *et al.* (2015).

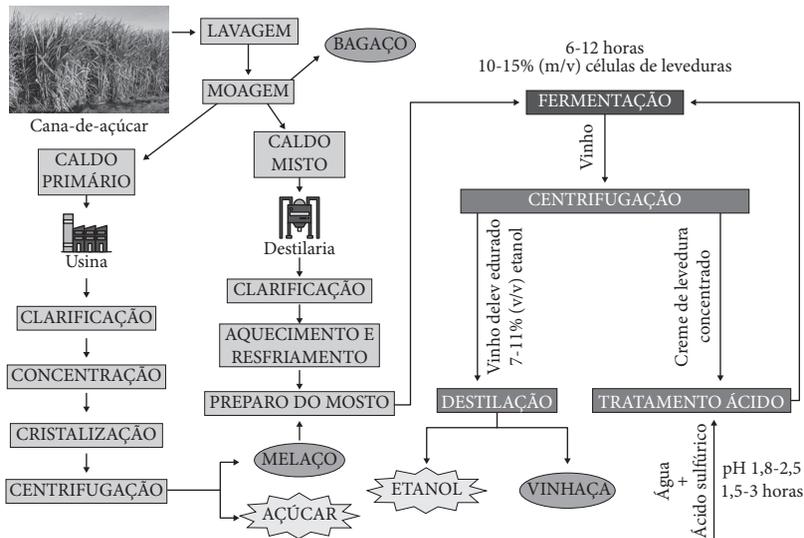


Figura 1.2 Esquema representativo dos processos para produção de açúcar e etanol no Brasil, destacando-se os principais subprodutos: bagaço, melação e vinhaça.

Fonte: elaboração própria.

Algumas operações iniciais são comuns tanto à usina quanto à destilaria, a saber, a recepção, o preparo e a extração do caldo da cana. Após a chegada da cana à indústria, ocorre a lavagem para eliminação do solo aderido e impurezas. Há diferenças na recepção da cana colhida após queima ou por colheita mecanizada. No primeiro caso, trata-se da cana inteira, que é assim lavada; no segundo caso, utiliza-se a limpeza a seco das canas cortadas para evitar perda de açúcar.²⁷ Em seguida, a cana é cortada com facas e desfibradores, os quais promovem a abertura das células para a liberação do caldo. A extração do caldo é realizada por moendas constituídas por quatro a seis ternos dispostos em série, cada um contendo quatro rolos, onde o processo de extração ocorre por pressão mecânica. Ao receber a primeira compressão, a cana picada e desfibrada libera o caldo conhecido como primário e o bagaço segue pela esteira para

27 Leal (2010).

o terno seguinte, e assim sucessivamente. Ao final do processo, o bagaço apresenta cerca de 50% de umidade e é encaminhado para as caldeiras para geração de vapor, o qual é necessário em todo o processamento e para o acionamento das moendas. Muitas vezes utiliza-se o processo de embebição, que consiste em adicionar água ou o próprio caldo extraído ao bagaço entre um terno e outro, com a finalidade de aumentar a extração de sacarose. Geralmente, o caldo primário é encaminhado para a usina para a produção de açúcar por ser mais puro e concentrado, enquanto o caldo do segundo terno (caldo misto) vai para a produção de etanol.²⁸

Algumas unidades utilizam o processo de difusão para extração do caldo, em que a sacarose adsorvida ao material fibroso da cana é diluída e removida por lixiviação ou lavagem em um processo de contracorrente. A eficiência na extração da sacarose é maior nos difusores do que nas moendas, além de ter menor consumo de energia na difusão.²⁹

O tratamento do caldo misto, utilizado na produção de etanol, compreende inicialmente uma etapa de peneiramento para eliminar impurezas mais grosseiras, como fibras e areia. São utilizadas inicialmente peneiras rotativas integradas ao conjunto de extração, para em seguida utilizar peneiras hidrodinâmicas e hidrociclones, o que possibilitará a remoção de material fibroso de menor tamanho, areia e terra, respectivamente. O caldo assim tratado passa por preaquecimento à temperatura de 70 °C, adição de cal, aquecimento posterior a aproximadamente 105 °C, desaeração, adição de polímero para causar floculação e remoção final de impurezas por meio da decantação. O lodo obtido na clarificação é filtrado para aumentar a recuperação da sacarose. O caldo clarificado é submetido a novo aquecimento para morte térmica dos microrganismos e imediatamente sofre pré-resfriamento, seguido de resfriamento final até a temperatura de 32 °C, antes de ser direcionado à dorna de fermentação. O caldo assim produzido apresenta apro-

28 Dias *et al.* (2015).

29 Macedo e Cortez (2005), Dias *et al.* (2015).

ximadamente 18-20 °Bx (teor de sólidos solúveis), o que equivale a aproximadamente 13-15% de açúcares totais.³⁰

O caldo pode ser concentrado em evaporadores contínuos como estratégia para obtenção de fermentação com alto teor alcoólico, devido à elevação do teor de açúcar total. Além disso, a concentração garante a continuidade do processo fermentativo em paradas da moagem, permitindo o armazenamento do caldo, agora chamado de xarope. A concentração ideal para armazenamento do xarope gira em torno de 50 a 55 °Bx, partindo inicialmente de uma concentração de cerca de 14 a 16 °Bx no caldo.³¹

O tratamento do caldo para a produção de açúcar compreende as mesmas etapas do tratamento do caldo para produção de etanol. No entanto, mais cal é necessário para a produção de açúcar, além da adição de dióxido de enxofre (SO₂) em um processo chamado sulfitação, que diminui a cor do xarope para produção de açúcar branco, causa a coagulação dos sólidos solúveis e reduz a viscosidade do caldo para facilitar as operações de evaporação e cristalização.³²

Durante a produção de açúcar, o caldo de cana é clarificado com cal e concentrado por meio de etapas repetitivas de evaporação e centrifugação. O caldo concentrado passa por uma etapa de cristalização para formação dos cristais de sacarose, que são removidos por centrifugação. O líquido resultante, escuro e viscoso, é chamado de melaço e contém de 45 a 60% de sacarose e 5 a 20% de glicose e frutose.³³ O melaço pode ser utilizado em combinação com o caldo de cana para aumentar a concentração de açúcar no mosto ou pode ser diluído com água, em substituição ao caldo de cana. A composição dos mostos preparados a partir do caldo ou do melaço ou de uma mistura de ambos influencia o desempenho da fermentação.³⁴

30 Oliva-Neto *et al.* (2013).

31 Macedo e Cortez (2005).

32 *Id. ibid.*

33 Amorim *et al.* (2011), Basso, Basso e Rocha (2011).

34 Amorim, Basso e Lopes (2009), Basso, Basso e Rocha (2011).

1.4 SISTEMAS DE CONDUÇÃO DA FERMENTAÇÃO

Os processos fermentativos podem ser classificados quanto ao modo como são desenvolvidos em batelada ou descontínuo e contínuo, havendo variações em cada um deles. No processo descontínuo, o mosto é colocado de uma só vez juntamente com o inóculo; quando se atinge o máximo de produção, o processo é finalizado. Nas destilarias brasileiras utiliza-se o processo descontínuo alimentado, também chamado de batelada alimentada (*fed-batch*). Neste sistema, o creme de levedura tratado com ácido é enviado para a dorna de fermentação, a qual é preenchida com o mosto em fluxo controlado, o que evita o estresse por choque osmótico. Podem ser utilizadas várias dornas de fermentação, mas cada uma faz a fermentação de forma individual. Cada dorna é preenchida, manejada e limpa separadamente das demais. As seguintes vantagens são atribuídas a este sistema: medida mais fácil do rendimento fermentativo, pois o volume é mantido constante; menos suscetível às contaminações bacterianas, pois cada dorna é lavada após cada ciclo de fermentação, o que diminui o uso de antimicrobianos; o vinho apresenta menor teor de acidez; menor risco de floculação e melhor desempenho das centrífugas; maior facilidade em otimizar o tempo de alimentação das dornas; e possibilidade de estender o tempo de fermentação se a concentração de açúcar residual estiver alta. Estima-se que o sistema de batelada alimentada é empregado em cerca de 83% das destilarias, podendo ser alcançados rendimentos de 92 a 95%.³⁵

O sistema contínuo foi proposto nos anos 1980 e consiste na alimentação contínua de todo o mosto inoculado para uma ou mais dornas que se mantêm sempre cheias durante o processo. O vinho parcialmente fermentado transborda para uma segunda dorna, que é mantida cheia, e desta transborda para uma terceira, quarta, em série, até o consumo total dos açúcares. Da última dorna, o vinho segue para a centrifugação, onde o creme de levedura é separado e segue para o tratamento ácido. Em seguida, o fermento tratado é encaminhado de volta para a primeira dorna, onde é alimentado junto com o mosto e inicia-se novo ciclo. No sistema

35 Godoy *et al.* (2008).

contínuo, o mosto e a levedura são adicionados na primeira dorna, iniciando-se a fermentação. Este mosto inoculado é bombeado para as demais dornas, finalizando a fermentação na última dorna. Todas as dornas fermentam simultaneamente e não podem ser lavadas com frequência.³⁶

A fermentação contínua apresenta vantagens sobre a batelada alimentada por ter menor custo de implantação, custando cerca de 50 a 60% menos, e maior facilidade de automação. No entanto as desvantagens residem principalmente na dificuldade de controlar a contaminação por bactérias e leveduras nativas, maior dificuldade na avaliação do rendimento fermentativo devido às variações de volume nas dornas e o estresse osmótico.³⁷ Quanto ao rendimento fermentativo, melhores resultados têm sido obtidos com a fermentação em batelada alimentada, e, na melhor das hipóteses, os rendimentos são comparáveis, pois raramente a fermentação contínua demonstra rendimento superior.³⁸

1.5 TRATAMENTO DO FERMENTO

Quando termina a fermentação, as células de leveduras são separadas do vinho por centrifugação, resultando em um creme de leveduras com 60 a 70% (m/v) de células. Este creme concentrado é então diluído com água e tratado com ácido sulfúrico em pH que varia de 1,8 a 2,5, por um período de uma hora e meia a três horas. Esta suspensão de fermento diluído e acidificado é conhecida na prática pelo nome de pé-de-cuba. Em seguida, esse creme concentrado de leveduras é utilizado para reiniciar a fermentação na dorna com mosto fresco.³⁹ O emprego do tratamento ácido para combater contaminações bacterianas não é uma prática nova na indústria da fermentação, especialmente na fabricação da cerveja.⁴⁰ O tratamento ácido reduz a contaminação bacteriana e a floculação

36 Centro Nacional de Pesquisa em Energias e Materiais ([2017] 2020).

37 Godoy *et al.* (2008).

38 Id. *ibid.*, Centro Nacional de Pesquisa em Energias e Materiais ([2017] 2020).

39 Lopes *et al.* (2016).

40 Simpson e Hammond (1989).

das células de leveduras, seja causada por bactérias ou por uma característica intrínseca da linhagem.⁴¹

Poucos são os trabalhos que mostram a eficiência do tratamento ácido em números. Gallo⁴² verificou uma redução de 44,55% no número de bactérias com o uso do tratamento das células com ácido sulfúrico. Experimentos laboratoriais mostraram redução de três ciclos log (99,9%) no número da bactéria *Lactobacillus fermentum* utilizando o tratamento com ácido sulfúrico.⁴³

As leveduras toleram baixo pH, mas o tratamento ácido pode causar distúrbios fisiológicos nas células das leveduras, especialmente em condições específicas, como predominância de células muito jovens ou muito velhas.⁴⁴ Atribui-se aos carboidratos de reserva, tais como glicogênio e trealose, a capacidade que as leveduras têm de suportar o estresse ácido durante o tratamento do fermento.⁴⁵

Melo *et al.*⁴⁶ estudaram os mecanismos moleculares que permitem às células de uma linhagem industrial de *S. cerevisiae* (JP1) sobreviver em ambientes com baixo pH. Cerca de 65 genes foram significativamente superexpressados na condição de baixo pH (2,0), estando relacionados aos mecanismos de resposta ao estresse, como também à morfogênese celular, biogênese da parede celular e biossíntese de metabólitos induzidos pelo estresse, tais como glicerol e trealose. Os resultados mostraram que o baixo pH ativa a resposta geral ao estresse (GSR, *General Stress Response*), sendo importante para a sobrevivência da célula por longo tempo. Foi também sugerido que existe um mecanismo regulatório dependente da Proteína Quinase A (PKA) que afeta o ciclo celular de forma a adquirir tolerância ao ambiente ácido. Lucena *et al.*⁴⁷ complementaram este estudo usando duas estratégias experimentais (crescimento celular e expressão gênica) para mostrar que os genes envolvidos no mecanismo de integridade da parede celular e as vias

41 Amorim *et al.* (2011).

42 Gallo (1989).

43 Costa, Cerri e Ceccato-Antonini (2018), Silva-Neto *et al.* (2020).

44 Oliva-Neto *et al.* (2013).

45 Basso *et al.* (2008).

46 Melo *et al.* (2010).

47 Lucena *et al.* (2012).

PKC-MAPK (vias Proteína Quinase C – Proteína Quinase Ativada por Mitógeno) são essenciais para o crescimento das células de leveduras em ambientes ácidos.

Lucena *et al.*⁴⁸ demonstraram que a sobrevivência de uma linhagem industrial de *S. cerevisiae* depende da reprogramação metabólica das células para assegurar a viabilidade celular, por meio da inibição do crescimento celular sob condição desfavorável. Nesta situação ocorre a expressão diferencial de um conjunto de genes relacionados à composição e integridade da parede celular, processos de oxidação-redução, metabolismo de carboidrato, síntese de ATP e absorção de ferro.

Estudos têm mostrado a tolerância das leveduras *S. cerevisiae* industriais ao ambiente ácido,⁴⁹ de forma que o tratamento ácido não causa impacto significativo à levedura do processo, se realizado adequadamente. Não há dúvida também quanto à eficiência do tratamento ácido na redução da contaminação bacteriana e de seus efeitos, como na desfloculação do fermento, mas a questão principal que acaba recaindo sobre seu uso é o custo do ácido e a segurança na manipulação. É preciso pensar em alternativas mais seguras e ambientalmente corretas que assegurem a minimização dos efeitos da contaminação. O uso de antibióticos deve ser evitado devido à sua retenção nos subprodutos da fermentação, como na levedura seca, que é comercializada para ração animal,⁵⁰ e na vinhaça, que por ser utilizada na fertirrigação pode carregar antibióticos que serão disseminados no ambiente, levando ao aumento da resistência bacteriana a antibióticos. Linhagens de bactérias resistentes a vários antibióticos já foram isoladas de unidades produtoras de etanol.⁵¹ Além disso, a presença de antibióticos na vinhaça pode afetar o processo de biodigestão anaeróbia da vinhaça para produção de biogás pelo fato de inibir as bactérias acetogênicas e metanogênicas.⁵²

Uma série de agentes químicos com ação bacteriostática e bactericida tem sido testada em escala laboratorial, mas o que tem se

48 Id. (2015).

49 Della-Bianca *et al.* (2014), Reis *et al.* (2017), Costa, Cerri e Ceccato-Antonini (2018), Silva-Neto *et al.* (2020).

50 Amorim *et al.* (2011).

51 Murphree *et al.* (2014), Mendonça *et al.* (2016).

52 Sanz *et al.* (1996), Assad (2017).

destacado em escala industrial é o dióxido de cloro. Essa substância é geralmente empregada em sistemas de tratamento de água para combater bactérias, vírus e algas, tendo forte ação oxidante.⁵³ Em 2012 foi aprovada a patente do dióxido de cloro para emprego na fermentação, denominado de DuPont™ Fermasure®. Muitas destilarias brasileiras têm substituído os antibióticos e cerca de 40% do tratamento ácido pelo uso do dióxido de cloro na concentração de 30 mg/L.⁵⁴

O próprio etanol, por ter ação bactericida, poderia ser utilizado em combinação ou não com o ácido sulfúrico, na tentativa de minimizar ou até eliminar o volume de ácido gasto no tratamento do fermento. O trabalho pioneiro de Ceballos-Schiavone⁵⁵ avaliou a adição de etanol em concentrações de 15, 20, 25, 30 e 35% à solução ácida com diferentes valores de pH (2,5 a 6,0) a fim de verificar o efeito sobre o crescimento de sete espécies de *Lactobacillus*. A combinação de pH 2,5 e 20% de etanol por 2 horas de incubação foi a melhor condição para eliminar completamente o número de bactérias. Aumentando o pH para 6,0, foi necessária uma concentração de 25% de etanol para causar o mesmo efeito.

Costa, Cerri e Ceccato-Antonini⁵⁶ testaram concentrações inferiores a 15% de etanol adicionado à solução ácida pH 2,0 e relataram a completa perda da viabilidade de *L. fermentum* já ao final do primeiro ciclo de tratamento com a concentração de 5% de etanol e pH 2,0. Os experimentos foram realizados com caldo de cana esterilizado em coculturas de *S. cerevisiae* e *L. fermentum*. O tratamento foi continuado por seis ciclos de fermentação e, embora não tenha tido efeito sobre a viabilidade da linhagem industrial de *S. cerevisiae*, houve decréscimo na produção de etanol. Neste contexto, Silva-Neto *et al.*⁵⁷ testaram esta mesma concentração de etanol em soluções ácidas com pH superior a 2,0 e não obtiveram redução significativa no número de *L. fermentum*. Para causar perda total da viabilidade da bactéria, seria necessária uma concentração de 20% de etanol em solução ácida pH 3,0 ou 22% de etanol em água sem

53 Lapolli *et al.* (2005).

54 Furtado ([2013] 2020).

55 Ceballos-Schiavone (2009).

56 Costa, Cerri e Ceccato-Antonini (2018).

57 Silva-Neto *et al.* (2020).

adição de ácido. Estes resultados mostram que a substituição total do ácido sulfúrico pelo etanol não é viável devido à alta concentração necessária para causar a morte das bactérias. A redução da quantidade de ácido no tratamento combinado com etanol também não surtiu efeito no controle da contaminação, pois alta concentração de etanol (20%) é necessária para ser adicionada à solução ácida pH 3,0, ou seja, 4 vezes mais etanol comparando com a solução ácida pH 2,0 (5% de etanol), para ocasionar perda total da viabilidade de *L. fermentum*. Estas concentrações de etanol são muito altas para serem empregadas no contexto industrial.

Silva-Neto *et al.*⁵⁸ também testaram a aplicação do tratamento ácido pH 2,0 com a adição de 5% de etanol em fermentação realizada com a linhagem industrial PE-2 em caldo de cana não estéril e contaminado com *L. fermentum* (10^8 UFC/mL), resultando em perda total da viabilidade da bactéria no primeiro ciclo fermentativo. Nos demais ciclos, mesmo utilizando caldo não estéril mas sem a inoculação de *L. fermentum*, somente o tratamento ácido pH 2,0 (sem adição de etanol) foi suficiente para causar a perda da viabilidade das bactérias nativas do caldo. Os maiores teores alcoólicos foram obtidos com o tratamento combinado pH 2,0 + 5% de etanol nas fermentações contaminadas com *L. fermentum*. Os resultados apontam para o uso do etanol em combinação com o tratamento ácido em situações em que somente o ácido não é capaz de combater a contaminação bacteriana, em substituição ao uso de antibióticos.

A etapa do tratamento do fermento é de extrema importância no processo fermentativo como um todo, impactando diretamente sobre o rendimento fermentativo à medida que reduz a contaminação bacteriana. No entanto tem recebido pouca atenção no sentido de quantificar a eficiência do ácido sulfúrico no combate às diferentes espécies de bactérias presentes no processo e de buscar alternativas mais seguras e ambientalmente corretas em substituição ao ácido sulfúrico.

58 Id. *ibid.*

1.6 FATORES QUE AFETAM A FERMENTAÇÃO

As características do processo fermentativo impõem às leveduras uma série de condições que podem afetar seu crescimento e a capacidade fermentativa. Vários fatores podem afetar a fermentação, como alta concentração de etanol, alta pressão osmótica, baixo pH, variações de temperatura nas dornas, composição do mosto de fermentação e contaminação por bactérias e leveduras nativas. O efeito destes fatores pode ser intensificado pela prática do reciclo celular, que inclui o tratamento ácido do fermento entre cada ciclo de fermentação.⁵⁹

A composição do mosto de fermentação é um fator importante para o desempenho da levedura na fermentação, pois o melaço e o caldo de cana guardam diferenças significativas em sua composição química. Enquanto o caldo de cana pode apresentar algumas deficiências nutricionais, o melaço pode conter substâncias consideradas inibitórias para as leveduras, como o sulfito, resultado da etapa de sulfitação do caldo para a produção de açúcar. Em decorrência disto, a mistura caldo de cana + melaço pode ser uma melhor alternativa do que cada um separadamente.⁶⁰

As vantagens da utilização do melaço residem no fato de ele ser um meio já concentrado em açúcares, descartando-se a necessidade de concentrar o caldo de cana. O efeito tóxico do alumínio é menor em melaço do que em caldo, provavelmente devido às propriedades quelantes de alguns componentes do melaço. O baixo pH do meio de fermentação converte o alumínio presente nos mostos na sua forma tóxica (Al^{+3}), causando redução na viabilidade das leveduras, nos níveis de trealose e taxas de fermentação. O magnésio atenua o efeito do alumínio, ressaltando a importância de adicionar cal dolomítico com alto conteúdo de magnésio na fase de tratamento do caldo. Por outro lado, o melaço apresenta altas concentrações de potássio, causando efeitos no metabolismo da levedura, com redução do rendimento fermentativo, viabilidade celular e níveis de trealose; altas concentrações de cálcio, aumentando o efei-

59 Basso, Basso e Rocha (2011).

60 Amorim, Basso e Lopes (2009).

to da floculação causada pelas bactérias; e presença de substâncias inibidoras do crescimento microbiano, como furfural, ácido fórmico e outros compostos originados das reações de Maillard.⁶¹ A presença de sulfito no melaço, devido ao processo de sulfitação na usina para produção de açúcar, pode trazer inibição ao metabolismo da levedura, especialmente considerando-se que sua ação inibitória está diretamente relacionada ao pH, sendo mais tóxico em meios mais ácidos, como é o caso da fermentação alcoólica.⁶²

A composição do mosto é um fator que interfere nas interações entre os microrganismos durante a fermentação, por potencialmente exercer uma força de seleção para favorecer microrganismos específicos.⁶³ Verificou-se maior produção de acetato em mosto de melaço do que em mosto de caldo de cana quando a fermentação conduzida por *S. cerevisiae* estava contaminada com *D. bruxellensis*⁶⁴ ou com leveduras nativas *S. cerevisiae* rugosas e *L. fermentum*.⁶⁵ O efeito do melaço sobre o rendimento fermentativo em fermentações contaminadas com *D. bruxellensis* e *L. fermentum* foi maior do que com caldo de cana,⁶⁶ mostrando que a composição do mosto pode interferir com as interações entre os diferentes microrganismos presentes na dorna, com o risco de estar favorecendo mais os contaminantes do que a levedura do processo.

O pH do mosto de fermentação é um fator de importância quando se considera a presença de ácidos orgânicos no meio, como ácido láctico e ácido acético, produzidos por contaminantes bacterianos. Além disso, o próprio caldo de cana ou melaço apresenta uma composição complexa de ácidos orgânicos, como trans-acotânico, málico, cítrico, succínico, oxálico, tartárico e glicólico.⁶⁷ No meio ácido do ambiente fermentativo, estes ácidos na forma protonada podem entrar nas células das leveduras; ao encontrar o pH intracelular mais alto (por volta de 7,0), rapidamente se dissociam,

61 Eggleston e Amorim (2006), Amorim, Basso e Lopes (2009).

62 Oliva-Neto *et al.* (2013).

63 Tosetto (2008).

64 Pereira *et al.* (2014).

65 Reis *et al.* (2018).

66 Bassi *et al.* (2018).

67 Basso e Lino (2018).

liberando o próton e acidificando o interior das células.⁶⁸ A glicólise é um dos processos biológicos afetados pela acidificação do pH intracelular.⁶⁹ Dorta *et al.*⁷⁰ avaliaram o efeito sinérgico do sulfito, ácido láctico, etanol e baixo pH sobre a fermentação conduzida por duas linhagens industriais de *S. cerevisiae* (M-26 e PE-2) e mostraram que o baixo pH (3,6) seguido do etanol (9,5%) foram os fatores mais estressantes para as leveduras durante a fermentação.

O etanol causa efeito na membrana citoplasmática das células de leveduras, diminuindo sua fluidez e consequentemente a permeabilidade da membrana a alguns íons, especialmente íons H⁺. A entrada desses íons ocasiona a dissipação do gradiente eletroquímico na membrana, afetando a manutenção da força protomotiva com diminuição do pH intracelular. Além de afetar a composição da membrana, o etanol causa inibição do crescimento e inativação de enzimas, levando à perda da viabilidade celular.⁷¹ A tolerância das leveduras ao etanol é um dos fatores que limitam o desenvolvimento de fermentações com alto teor alcoólico. Em *S. cerevisiae*, segundo Dorta *et al.*,⁷² a concentração máxima de etanol que permite o crescimento é de 10% (m/v). A procura por linhagens tolerantes ao etanol deve ser estimulada, pois as linhagens industriais CAT-1, PE-2, BG-1 e SA-1 não demonstraram tolerância ao etanol comparável àquela apresentada pelas leveduras nativas rugosas, contaminantes da fermentação.⁷³

O efeito inibidor do etanol é potencializado com o aumento da temperatura. A faixa ótima de temperatura para a fermentação alcoólica é de 26 a 35 °C, no entanto, com o aumento da temperatura ambiente no decorrer da safra e pelo fato de a fermentação alcoólica ser um processo exotérmico, a temperatura das dornas pode alcançar 38 °C, requerendo resfriamento por trocadores de calor nas dornas de fermentação.⁷⁴ É sabido que o aumento da

68 Ullah *et al.* (2013).

69 Pearce, Booth e Brown (2001).

70 Dorta *et al.* (2006).

71 Stanley *et al.* (2010).

72 Dorta *et al.* (2006).

73 Reis *et al.* (2017).

74 Lima, Basso e Amorim (2001), Macedo e Cortez (2005).

temperatura ocasiona aumento na velocidade da fermentação, mas ainda que seja interessante selecionar linhagens de leveduras termotolerantes para aplicação industrial, é necessário lembrar que o crescimento das bactérias é estimulado em temperaturas acima de 32 °C e que temperaturas mais amenas (abaixo de 27 °C) reduzem a toxicidade do etanol.⁷⁵

A fermentação de alto teor alcoólico tem sido uma das prioridades do setor sucroalcooleiro por proporcionar vantagens econômicas e técnicas, especialmente a redução do volume de vinhaça. No entanto é preciso investir em linhagens de leveduras adaptadas à alta concentração de etanol nos mostos de fermentação acima de 10%.⁷⁶

O estresse osmótico causado pela alta concentração inicial de açúcar no meio de fermentação pode levar à queda na produção de etanol devido à regulação da síntese das enzimas glicolíticas e inibição do transporte de açúcar pela concentração de açúcar do meio. Durante o processo fermentativo em batelada simples ocorre decréscimo na taxa específica de crescimento da levedura causada ou pelo substrato ou pelo produto final. A viabilidade das leveduras diminuiu significativamente quando a concentração de açúcar do meio aumentou de 120 para 180 g/L devido ao estresse osmótico, que resulta em perda de água do interior da célula para o ambiente.⁷⁷ Pode ocorrer sinergia entre o estresse osmótico e aqueles causados pelo etanol e outros compostos presentes no meio, como ácidos orgânicos, aumentando a toxidez desses compostos.⁷⁸ Para superar a inibição pelo produto ou pelo substrato, os sistemas de batelada alimentada, contínuo ou semicontínuo, são mais apropriados.⁷⁹ O sistema de batelada alimentada, mais extensivamente utilizado nas destilarias brasileiras, consiste na alimentação intermitente de açúcar sem remoção do caldo de fermentação, reduzindo assim a inibição pelo substrato e pelo produto final, resultando em menor tempo de fermentação e alta produtividade em etanol. Desta forma, em um sistema como este, o estresse osmótico não é

75 Basso, Basso e Rocha (2011).

76 Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais ([2017] 2020).

77 Mager e Siderius (2002).

78 Graves *et al.* (2006).

79 Chang *et al.* (2018).

significativo a ponto de impactar o crescimento e o metabolismo da levedura do processo.

É importante destacar que os fatores que afetam a fermentação não ocorrem isoladamente durante o processo, de forma que os estresses impostos simultânea ou sequencialmente têm efeito muito maior do que o efeito de cada um dos estresses isoladamente, como foi descrito para as condições de acidez – temperatura –, etanol, por exemplo.

REFERÊNCIAS

ALCARDE, A. R. DO proálcool ao flex fuel, etanol migrou do Estado para o mercado. *Visão Agrícola*, n. 8, p. 26-28, 2008.

ALMEIDA, V. P.; LONGHI, G. M.; SANTOS, L. R. Etanol: 40 anos de evolução do mercado de combustíveis e automóveis no Brasil. *Teoria e Evidência Econômica*, v. 23, n. 49, p. 462-484, 2017.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; LOPES, M. L. Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage. In: INGLEDEW, W. M.; KELSALL, A. G. D.; KLUHSPIES, C. (ed.). *The alcohol textbook*. Nottingham: University Press, 2009. p. 39-46.

AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, J. V. C.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 91, p. 1267-1275, 2011.

ASSAD, L. Aproveitamento de resíduos do setor sucroalcooleiro desafia empresas e pesquisadores. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v. 69, n. 4, p. 13-16, 2017.

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, 2008.

BAPTISTA, C. M. S. G.; CÓIAS, J. M. A.; OLIVEIRA, A. C. M.; OLIVEIRA, N. M. C.; ROCHA, J. M. S.; DEMPSEY, M. J.; LANNINGAN, K. C.; BENSON, P. S. Natural immobilisation of microorganisms for continuous ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 127-131, 2006.

BASSI, A. P. G.; MENEGUELLO, L.; PARALUPPI, A. L.; SANCHES, B. C. P.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Interaction of *Saccharomyces cerevisiae*–*Lactobacillus fermentum*–*Dekkera bruxellensis* and feedstock on fuel ethanol fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 111, p. 1661-1672, 2018.

BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Research*, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: BERNARDES, M. A. S. (ed.). *Biofuel production: recent developments and prospects*. Rijeka: InTech, 2011. p. 85-100.

BASSO, T. O.; LINO, F. S. O. Clash of kingdoms: how do bacterial contaminants thrive in and interact with yeasts during ethanol production? In: BASSO, T. P.; BASSO, L. C. (ed.). *Fuel ethanol production from sugarcane*. Londres: InTechOpen, 2018. p. 23-38.

CARLSON, M.; BOTSTEIN, D. Two differentially regulated mRNAs with different 5'ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. *Cell*, v. 28, n. 1, p. 145-154, jan. 1982.

CEBALLOS-SCHIAVONE, C. H. M. *Tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar visando a redução de contaminantes bacterianos: lactobacillus na produção de etanol e eficiência de tratamento do fermento por etanol*. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CENTRO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS DO SETOR SUCROENERGÉTICO E BIOCOMBUSTÍVEIS. *Renovabio: novo momento no setor sucroenergético*. 20 jan. 2020. Disponível em: <http://www.ceisebr.com/conteudo/renovabio-novo-momento-no-setor-sucroenergetico.html>. Acesso em: 22 mar. 2020.

CENTRO NACIONAL DE PESQUISA EM ENERGIA E MATERIAIS. *Fermentação: contínua ou em batelada?* 5 set. 2017. Disponível em: <http://cnpem.br/fermentacao-continua-ou-em-batelada/>. Acesso em: 22 mar. 2020.

CHANG, Y. H.; CHANG, K. S.; CHEN, C. Y.; HSU, C. L.; CHANG, T. C.; JANG, H. D. Enhancement of the efficiency of bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* via gradually batch-wise and fed-batch increasing the glucose concentration. *Fermentation*, v. 4, n. 45, p. 1-12, 2018.

CORTEZ, L. A. B.; CRUZ, C. H. B.; SOUZA, G. M.; CANTARELLA, H.; VAN SLUYS, M. A.; MACIEL FILHO, R. *Universidades e empresas: 40 anos de ciência e tecnologia para o etanol brasileiro*. São Paulo: Blucher, 2016.

COSTA, M. A. S. *Efeito do sistema de fermentação, da adição de etanol ao tratamento ácido e da contaminação por Lactobacillus sp na produção de etanol*. 2017. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2017.

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. 7, p. 77-85, jan. 2018.

DELLA-BIANCA, B. E.; BASSO, T. O.; STAMBUK, B. U.; BASSO, L. C.; GOMBERT, A. K. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 97, p. 979-991, 2013.

DELLA-BIANCA, B. E.; HULSTER, E.; PRONK, J. T.; VAN MARIS, A. J.; GOMBERT, A. K. Physiology of the fuel ethanol strain *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 at low pH indicates a context-dependent performance relevant for industrial applications. *FEMS Yeast Research*, v. 14, n. 8, p. 1196-1205, dez. 2014.

DIAS, M. O. S.; MACIEL FILHO, R.; MANTELATTO, P. E.; CAVALETT, O.; ROSSELL, C. E. V.; BONOMI, A.; LEAL, M. R. L. V. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. *Environmental Development*, v. 15, p. 35-51, jul. 2015.

DORTA, C.; OLIVA-NETO, P.; ABREU-NETO, M. S.; NICOLAU-JUNIOR, N.; NAGASHIMA, A. I. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 22, n. 2, p. 177-182, 2006.

EGGLESTON, G.; AMORIM, H. Reasons for the chemical destruction of sugars during the processing of sugarcane for raw sugar and fuel alcohol production. *International Sugar Journal*, v. 108, n. 1289, p. 271-282, 2006.

FURTADO, M. *Ambiente* – Beraca usa ClO₂ na fermentação alcoólica. 9 abr. 2013. Disponível em: <http://www.quimica.com.br/ambiente-beraca-usa-clo2-na-fermentacao-alcoolica>. Acesso em: 22 mar. 2020.

GALLO, C. R. *Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica*. 1989. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.

GODOY, A.; AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, A. J. Continuous and batch fermentation processes: advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. *International Sugar Journal*, v. 110, n. 1311, p. 175-181, 2008.

GRAVES, T.; NARENDRANATH, N. V.; DAWSON, L.; POWER, R. Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 33, n. 6, p. 469-474, 2006.

HIRA, A.; OLIVEIRA, L. G. No substitute for oil? How Brazil developed its ethanol industry. *Energy Policy*, v. 37, p. 2450-2456, 2009.

LAPOLLI, F. R.; HASSEMER, M. E. N.; CAMARGO, J. G.; DAMÁSIO, D. L.; LOBO-RECIO, M. A. Desinfecção de efluentes sanitários através de dióxido de cloro. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 10, n. 3, p. 200-208, jul./set. 2005.

LEAL, M. R. L. V. Evolução tecnológica do processamento da cana-de-açúcar para etanol e energia elétrica. In: CORTEZ, L. A. B. (ed.). *Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade*. São Paulo: Blucher, 2010. p. 561-575.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (ed.). *Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Blucher, 2001. p. 1-43.

LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A.; LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; AMORIM NETO, H. B.; AMORIM, H. V. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 47, n. 1, p. 64-76, dez. 2016.

LUCENA, R. M.; ELSZTEIN, C.; PITA, W.; SOUZA, R. B.; PAIVA JR., S. S. L.; MORAIS JR., M. A. Transcriptomic response of *Saccharomyces cerevisiae* for its adaptation to sulphuric acid-induced stress. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 108, n. 5, p. 1147-1160, nov. 2015.

LUCENA, R. M.; ELSZTEIN, C.; SIMÕES, D. A.; MORAIS JR., M. A. Participation of CWI, HOG and Calcineurin pathways in the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to low pH by inorganic acid. *Journal of Applied Microbiology*, v. 113, p. 629-640, 2012.

MACEDO, I. C.; CORTEZ, L. A. B. O processamento industrial da cana-de-açúcar no Brasil. In: ROSILLO-CALLE, F.; BAJAY, S. V.; ROTHMAN, H. (org.). *Uso da biomassa para produção de energia na indústria brasileira*. Campinas: Editora da UNICAMP, 2005. p. 247-268.

MAGER, W. H.; SIDERIUS, M. N. Insights into the osmotic stress response of yeast. *FEMS Yeast Research*, v. 2, p. 251-257, 2002.

MELO, H. F.; BONINI, B. M.; THEVELEIN, J.; SIMÕES, D. A.; MORAIS JR., M. A. 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, jul. 2010.

MENDONÇA, A. A.; LUCENA, B. T. L.; MORAIS, M. M. C.; MORAIS JR., M. A. First identification of Tn916-like element in industrial strains of *Lactobacillus vini* that spread the tet-M resistance gene. *FEMS Microbiology Letters*, v. 363, n. 3, p. 1-5, fev. 2016.

MURPHREE, C. A.; LI, Q.; HEIST, P. E.; MOE, L. A. A multiple antibiotic-resistant *Enterobacter cloacae* strain isolated from a bioethanol fermentation facility. *Microbes and Environments*, v. 29, n. 3, p. 322-325, 2014.

MUTTON, M. A.; ROSSETTO, R.; MUTTON, M. J. R. Utilização agrícola da vinhaça. In: CORTEZ, L. A. B. (coord.). *Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade*. São Paulo: Blucher, 2010. p. 423-440.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Porto Alegre: Artmed, 2014. 456 p.

NEVOIGT, E.; STAHL, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 21, n. 3, p. 231-241, nov. 1997.

OLIVA-NETO, P.; DORTA, C.; CARVALHO, A. F. A.; LIMA, V. M. G.; SILVA, D. F. The Brazilian technology of fuel ethanol fermentation-yeast inhibition factors and new perspectives to improve the technology. In: MENDEZ-VILAS, A. (ed.). *Materials and processes for energy: communicating current research and technological development*. Badajoz: Formatex, 2013. p. 279-372.

PAGLIARDINI, J.; HUBMANN, G.; ALFENORE, S.; NEVOIGT, E.; BIDEAUX, C.; GUILLOUET, S. E. The metabolic costs of improving ethanol yield by reducing glycerol formation capacity under anaerobic conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, v. 12, n. 29, p. 1-14, 2013.

PEARCE, A. K.; BOOTH, I. R.; BROWN, A. J. P. Genetic manipulation of 6-phosphofructo-1-kinase and fructose 2, 6-bisphosphate levels affects the extent to which benzoic acid inhibits the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, v. 147, p. 403-410, 2001.

PEREIRA, L. F.; LUCATTI, E.; BASSO, L. C.; MORAIS JR., M. A. The fermentation of sugarcane molasses by *Dekkera bruxellensis* and the mobilization of reserve carbohydrates. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 105, n. 3, p. 481-489, mar. 2014.

REIS, V. R.; ANTONANGELO, A. T. B. F.; BASSI, A. P. G.; COLOMBI, D.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Bioethanol strains of *Saccharomyces cerevisiae* characterised by microsatellite and stress resistance. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 48, n. 2, p. 268-274, abr./jun. 2017.

REIS, V. R.; BASSI, A. P. G.; CERRI, B. C.; ALMEIDA, A. R.; CARVALHO, I. G. B., BASTOS, R. G.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Effects of feedstock and co-culture of *Lactobacillus fermentum* and wild *Saccharomyces cerevisiae* strain during fuel ethanol fermentation by the industrial yeast strain PE-2. *AMB Express*, v. 8, n. 23, 2018.

SANZ, J. L.; RODRIGUEZ, N.; AMILS, R. The action of antibiotics on the anaerobic digestion process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 46, p. 587-592, 1996.

SILVA-NETO, J. M.; COVRE, E. A.; ROSA, B. C.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Can ethanol replace partially or fully sulfuric acid in the acid wash step of bioethanol production to fight contamination by *Lactobacillus fermentum*? *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2020.

SIMPSON, W. J.; HAMMOND, J. R. M. The response of brewing yeasts to acid washing. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 95, p. 347-354, 1989.

STANLEY, D.; BANDARA, A.; FRASER, S.; CHAMBERS, P. J.; STANLEY, G. A. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 109, p. 13-24, 2010.

TOSETTO, G. M. *Comportamento de linhagens industriais de Saccharomyces frente a compostos inibitórios presentes no melaço de cana-de-açúcar na produção de bioetanol*. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

ULLAH, A.; CHANDRASEKARAN, G.; BRUL, S.; SMITS, G. J. Yeast adaptation to weak acids prevents futile energy expenditure. *Frontiers in Microbiology*, v. 4, p. 1-10, jun. 2013.

WANG, M.; HAN, J.; DUNN, J. B.; CAI, H.; ELGOWAINY, A. Well-to-wheels energy use and greenhouse gas emissions of ethanol from corn, sugarcane and cellulosic biomass for US use. *Environmental Research Letters*, v. 7, p. 1-13, 2012.

WEUSTHUIS, R. A.; PRONK, J. T.; VAN DEN BROEK, P. J. A.; VAN DIJKEN, J. P. Chemostat cultivation as a tool for studies on sugar transport in yeasts. *Microbiological Reviews*, v. 58, n. 4, p. 616-630, 1994.

WHEALS, A. E.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. *Trends in Biotechnology*, v. 17, n. 12, p. 482-487, dez. 1999.