

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 04/02/2018.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

RICARDO VENTURA

**DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICAS E AVALIAÇÕES DE
ANTIMICROBIANOS VISANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL
CARBURANTE**



unesp

**ARARAQUARA
2015**

RICARDO VENTURA

**DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICAS E AVALIAÇÕES DE
ANTIMICROBIANOS VISANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL
CARBURANTE**

Tese apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista -
UNESP, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Cecília Laluce

ARARAQUARA

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

V468d Ventura, Ricardo
Desenvolvimento de técnicas e avaliações de
antimicrobianos visando a produção de etanol carburante /
Ricardo Ventura – Araraquara : [s.n], 2016
120 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Cecília Laluce

1. Etanol. 2. Melaço. 3. Fermentação. 4. Bactérias
produtoras de ácido láctico. 5. Bactericida. I. Título.

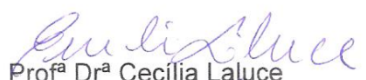
Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

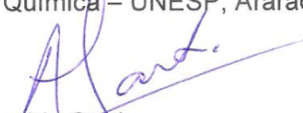
RICARDO VENTURA

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia.


Araraquara, 04 de fevereiro de 2016

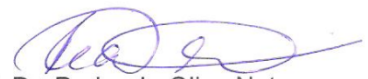
BANCA EXAMINADORA


Prof^ª Dr^a Cecília Laluece
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Prof. Dr. Arnaldo Sarti
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Prof. Dr. Clóvis Parazzi
Centro de Ciências Agrárias – UFSCar, São Carlos


Prof^ª Dr^a Dejanira de Franceschi de Angelis
Instituto de Biociências – UNESP, Rio Claro


Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto
Faculdade de Ciências e Letras – UNESP, Assis

Dados curriculares

Nome: Ricardo Ventura

Nome em citações bibliográficas: VENTURA, R.

Endereço profissional: Instituto de Química - Unesp - Depto. de Bioquímica e Tecnologia - R. Prof. Francisco Degni nº 55 - CEP 14.800-900 - Araraquara-SP.

Formação Acadêmica

- . Mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada): Instituto de Biociências – Unesp Rio Claro (2007)
- . Bacharelado em Químico Industrial: Universidade de Ribeirão Preto (1992)
- . Tecnologia em açúcar e álcool: Associação de Ensino de Ribeirão Preto (1983)

Formação complementar

- . Eficiência industrial na prod. de etanol – Bio Contal, Sertãozinho-SP (2011)
- . Gestão de projetos com MS Project – ITAL, Campinas - SP (2011)
- . Microbiologia enológica – Uni Rioja/UNESP, Rio Claro - SP (2008)
- . Confiabilidade analítica – SENAC Educação Ambiental, São Paulo - SP (2006)
- . Fermentando com alta eficiência – Fermentec, Piracicaba - SP (2006)
- . Tecnologia de produção de cachaça – CRQ IV, Ribeirão Preto - SP (2006)
- . Tratamento de efluentes – SENAC Educação Ambiental, São Paulo - SP (2004)
- . Certificação ISO 14.000 – Fund. Vanzolini, São Paulo - SP (2002)
- . Gerência de produtos – ESPM, São Paulo - SP (2002)
- . Marketing estratégico e operacional – ESPM, São Paulo - SP (2001)
- . Formação de preços na indústria – SEBRAE, São Paulo - SP (2000)
- . QS 9000 (PPAP, APQP, FMEA) – Bureau Veritas, São Paulo - SP (1998)
- . Gestão estratégica da produção – USP, São Paulo - SP (1999)
- . Avaliação estratégica de negócios na ind. química – USP, São Paulo - SP (1998)
- . Tratamento de águas industriais – Aquatec/Drew, Ribeirão Preto - SP (1986)

Produção bibliográfica

SILVA, R. P.; VENTURA, R.; VIOLA, M.C.; et al. NBR 9292 - Líquidos para freios hidráulicos tipos 3, 4 e 5. Rio de Janeiro: ABNT, 2000.

SILVA, R. P.; VENTURA, R.; VIOLA, M.C.; SANTOS, L. E.; et al. NBR 14261 - Solução arrefecedora para motor endotérmico - Requisitos e determinações das características. Rio de Janeiro: ABNT, 1998.

DELALIBERA, M. C. B; VENTURA, R.; CHAGAS, V. C. Determinação comparativa de níveis de infecção utilizando-se metodologia de análise microscópica e cultura em placas de Petri. STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos, v. 12, p. 37-38, 1984.

Apresentação de trabalho

VENTURA, R. Biorrefinarias: Tecnologias para produção de químicos a partir de fontes renováveis. 2015. Seminários Gerais da PG em Biotecnologia - IQ-UNESP Araraquara.

VENTURA, R.; LALUCE, C. Alternative use of a non-antibiotic biocide to improve ethanol fermentation with cell recycling. 2014. Simpósio BBEST. Campos do Jordão, 2014.

VENTURA, R. Aumento da eficiência fermentativa e redução de custo na produção de etanol. 2014. Reunião Fermentec. Ribeirão Preto, 2013.

VENTURA, R.; LALUCE, C. Control of bacterial contaminants in ethanol production process using natural biocides. Advanced Scholl of Bioorganic Chemistry. Araraquara, 2013.

VENTURA, R. Potenciais contaminantes em levedura extraída de fermentação alcoólica. Congresso internacional sobre uso da levedura na alimentação animal. Campinas, 2009.

VENTURA, R. ; MENEZES, A.; MELLO, G. Determinação de Residual de Monensina Sódica em Levedura Seca Oriunda de Fermentação Etanólica. SMA. Rio Claro, 2009.

VENTURA, R. Monitoramento da fermentação alcoólica através da quantificação de ácido láctico. SMA. Rio Claro, 2007.

VENTURA, R.; ANGELIS, D. F. Importância do monitoramento e controle da produção de ácido láctico na produção de etanol. SINAFERM. Curitiba, 2007.

VENTURA, R. Lactic acid quantification in Brazilian ethanol production. SIPAL. Campos do Jordão, 2005.

Atuação profissional:

- . Bolsista TT2 MCT/CNPq/CT - BIOTEC nº 27/2010 (2014)
- . Integra Química - Sócio gerente (desde 2013)
- . Química Real - Gerente técnico (2007 – 2012)
- . Centro Paula Souza - Professor ETEC em curso técnico em açúcar e álcool (2003 – 2006)
- . Phibro Internacional - Gerente de negócio (2002 – 2004)
- . BASF - Gerente de produto; repres. técnico; técnico lab. aplicação (1989 – 2002)
- . Shell Petróleo - Estagiário em base de combustíveis e lubrificantes (1988).
- . Analítica Equip. de Laboratório - Vendedor técnico (1986 – 1987)
- . Usina Santa Elisa - Sup. de laboratório; microbiologista (1985 – 1986)
- . Usina Santa Rita - Sup. de fermentação, analista laboratório; estagiário (1982 – 1985)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado força nessa árdua jornada.

À minha mãe pelo amor, apoio moral e logístico ao longo do curso.

À Prof. Dra. Cecília Laluze, por ter me aceitado em seu laboratório.

Aos colegas Jéssica, Maria Olívia e Ismael pelo companheirismo, auxílio no laboratório, dicas e convívio amistoso ao longo do curso.

As estagiárias Thamyres, Chadia e Mariana pelo auxílio durante os preparativos de experimento, análises e, é claro, administração das vidrarias.

Ao técnico Fernando Delfino pelo auxílio com o cromatógrafo a gás.

À Dra. Eloísa da Al Sukkar biotecnologia pelas análises de CIM.

As equipes da pós-graduação e biblioteca do IQ, pelo atendimento prestativo.

Ao professor Pedro Oliva por suas valiosas críticas na qualificação e pela amostra do biocida TCC.

À Vânia, do laboratório de produtos naturais, pela amostra de maitenina.

A colega Ana Paula, da UFSCar pela amostra da bactéria *L. fermentum*.

Ao CNPQ pelas bolsas parciais que foram de grande valia num período difícil durante parte do curso.

Aos professores Dejanira e Otávio (Vico) pelo incentivo desde a época do mestrado.

À professora Marisa pelas análises estatísticas.

Aos membros da banca pela presença e contribuição.

À minha querida mãe Geny, um anjo em minha vida, **OFEREÇO**

À memória de minha avó Ricarda, com saudade, **DEDICO**.

Lista de abreviaturas e siglas

ART: Açúcares redutores totais

ARRT: Açúcares redutores residuais totais

ATP: Adenosina trifosfato

Bx: Brix (porcentagem de sólidos solúveis)

CBA: Cloreto de benzalcônio

CIM: Concentração inibitória mínima

COS: Cloro oxigenado solúvel

DNS: Ácido 3,5-dinitrosalicílico

EDTA: Etilene diamino tetracetic ácido (ácido diamino tetra cético)

g: gramas

h: horas

HEDTA: Ácido hidroxí etileno diamino tetra cético

HS: Huwa-San

MT: maitenina

MN: Monensina

mL: mililitro

mM: milimolar

m/m: massa por massa

m/v: massa por volume

min: minutos

nm: nanômetros

NAD: Nicotinamida adenosina di-nucleotídeo

NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo hidrogenado

ppm: partes por milhão (mg/L)

rpm: Rotações por minuto

SL: Salinomicina

TCC: Triclorocarbanilida

v/v: volume por volume

YPD: Yeast peptone dextrose (extrato de levedura, peptona e glicose)

η : rendimento

μL : microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rota bioquímica simplificada do metabolismo da glicose a etanol.	25
Figura 2 - Esquema do processo de fermentação etanólica Melle-Boinot.	27
Figura 3 - Esquema de difusão passiva do ácido láctico em meio ácido e excreção de H ⁺ dissociado do íon lactato em <i>S. cerevisiae</i> .	31
Figura 4 - Compostos metabólicos de efeito fungicida, produzidos por bactérias lácticas.	32
Figura 5 - Co-floculação entre leveduras e lactobacilos em fermentação etanólica, registrada por microscopia eletrônica de varredura.	33
Figura 6 - Esquema de propagação de levedura pelo sistema de cortes em batelada alimentada com mosto de melaço 10° Bx.	49
Figura 7 - Esquema dos quadrados de uma câmara de Neubaer, com destaque par os quadrículos utilizados nas contagens.	56
Figura 8 - Câmara para contagem de bactérias de Helber.	57
Figura 9 - Esquema do procedimento de diluições em série e cultivo de bactérias.	58
Figura 10 - Efeito do tratamento dos inóculos com ácido sulfúrico (AS) nas concentrações 0,6%, 1,2% e 1,8% (m/v) sobre a viabilidade de <i>S. cerevisiae</i> PE-2 após 6 horas de fermentação em mosto de melaço (22° Bx; 405 mg/L de ácido láctico) a 35° C, por 5 ciclos.	61
Figura 11 - Efeito do tratamento com ácido sulfúrico nas doses 0,6%, 1,2% e 1,8% (m/v) sobre a viabilidade de <i>S. cerevisiae</i> PE-2 após 6 horas de fermentação em mosto de melaço (22° Bx; 1.205 mg/L de ácido láctico) a 35° C, ao longo de 5 ciclos fermentativos	62
Figura 12 - Placas com diluições em série do produto Huwa-San em caldo Mueller Hinton inoculado com <i>L. fermentum</i> (A) e bactéria láctica isoladas de fermentação alcoólica industrial (B) contendo corante resazurina.	63
Figura 13 - Placas com diluições em série do produto Huwa-San em caldo Mueller Hinton, inoculado com levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2.	64
Figura 14 - Viabilidade de levedura PE-2 após 6 horas de fermentações em mosto de melaço 22° Brix a 35° C, ao longo de 5 ciclos fermentativos, tratadas com: Huwa-San (HS) 200 e 1000 ppm; e ácido sulfúrico (AS) 1.800 ppm.	66
Figura 15 - Viabilidades médias de levedura PE-2 em 5 ciclos fermentativos de 6 horas em mosto de melaço 22° Brix a 35° C, submetidas aos tratamentos: Huwa-San (HS) 200 ppm; ácido sulfúrico (AS) 1.800 ppm, e controle (C).	67
Figura 16 - Brotamento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ao longo de 5 ciclos sucessivos de fermentação tratadas com 1000 ppm de Huwa-San (HS) e 1.800 ppm de ácido sulfúrico (AS), e controle, sem tratamento (C).	68

- Figura 17** - Crescimento de levedura em meio YPD, após 24 horas a 33° C. Placa A inoculada com amostra de fermentação tratada com 1.000 ppm de Huwa-San contendo $6,4 \times 10^7$ cel./mL; a placa B tratada com 1.800 ppm de ácido sulfúrico $1,3 \times 10^7$ cel./mL; e a placa C sem tratamento contendo $4,2 \times 10^8$ cel./mL. 69
- Figura 18** - Coloração de mosto de melão fermentados após cinco ciclos, cujos inóculos foram tratados com ácido sulfúrico 600 ppm (C); Huwa-San 200 ppm (B) e sem tratamento (A). 69
- Figura 19** - Viabilidade da levedura PE-2 em fermentações contaminadas, tratadas com cloro oxigenado (COS 50 e 100 ppm) e ácido sulfúrico (1.200 ppm) ao longo de 5 ciclos. 73
- Figura 20** - Leveduras PE-2 (400 x) após fermentação contaminada com bactéria láctica, com inóculo tratado com 100 ppm de cloro oxigenado. As células claras são viáveis e as coradas em azul estão mortas. 73
- Figura 21** - Produção de ácido láctico relativo à atividade bacteriana em fermentações tratadas com cloro oxigenado (COS) nas concentrações 50 e 100 ppm, e ácido sulfúrico (1.200 ppm) ao longo de 5 ciclos. 74
- Figura 22** - Ácido láctico produzido ao longo de cinco ciclos de fermentações, com inóculos tratados com concentrações 50; 80; 100 ppm do biocida triclorocarbanilida associada com cloreto de benzalcônio (TCC + CBA) e 1,2% ácido sulfúrico (AS). 78
- Figura 23** - Produção de ácido láctico ao longo de 5 ciclos de fermentações inoculadas com *S. cerevisiae* e bactéria láctica isolada de fermentação industrial. O inóculo misto foi tratado com 50 ppm de gluconato de clorexidina (GC) em associação com 40 ppm de cloreto de benzalcônio no mosto em comparação a inóculo tratado com 600 ppm de ácido sulfúrico (AS). 80
- Figura 24** - Concentração de ácido láctico após 6 horas de fermentação de mosto de melão 22° Bx a 35° C, inoculado com *S. cerevisiae* e *L. fermentum*, tratados com 30 ppm de maitenina (MT); 30 ppm de extrato de lúpulo (BB) e 600 ppm de ácido sulfúrico. 82
- Figura 25** - Etanol produzido nos ciclos sucessivos de fermentações inoculadas com *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus fermentum*, após tratamentos com ácido sulfúrico, maitenina (MT) e extrato de lúpulo (BB). 84
- Figura 26** - Viabilidade de *S. cerevisiae* após fermentações tratadas com 30 ppm de maitenina (MT); 30 ppm de extrato de lúpulo (BB); 600 ppm de ácido sulfúrico (AS). 84
- Figura 27** - Produção de ácido láctico ao longo de 10 ciclos fermentativos com mosto de melão 22° Bx inoculado com *S. cerevisiae* e *L. fermentum*. Os inóculos foram tratados no segundo e nono ciclos, respectivamente com 3 e 5 ppm de monensina (MN) e 6 e 10 ppm salinomicina (SL). 86
- Figura 28** - Produção de etanol ao longo de 10 ciclos fermentativos com mosto de melão 22° Bx inoculado com *S. cerevisiae* e *L. fermentum*. Os inóculos foram tratados no segundo e nono ciclos, respectivamente com 3 e 5 ppm de monensina (MN) e 6 e 10 ppm salinomicina (SL). 88

Figura 29 - Viabilidade de <i>S. cerevisiae</i> ao longo de 10 ciclos fermentativos com mosto de melão 22° Bx inoculado com <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i> . Os inóculos foram tratados no segundo e nono ciclos, respectivamente com 3 e 5 ppm de monensina (MN) e 6 e 10 ppm salinomicina (SL).	89
Figura 30 - Produção de biomassa de levedura ao longo de 10 ciclos fermentativos com mosto de melão 22° Bx inoculado com <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i> . Os inóculos foram tratados nos ciclos dois e nove, respectivamente com 3 e 5 ppm de monensina (MN) e 6 e 10 ppm salinomicina (SL).	89
Figura 31 - Produção de ácido láctico ao longo de 10 ciclos fermentativos com mosto de melão 22° Bx inoculadas com <i>S. cerevisiae</i> e bactéria láctica de fermentação industrial, tratadas com 3 ppm de monensina (MN) e 6 ppm de salinomicina (SL) no segundo ciclo, e 5 ppm de monensina no sétimo ciclo e 10 ppm de salinomicina no nono ciclo.	91
Figura 32 - Produção de etanol em fermentações de mosto de melão inoculadas com <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i> , tratadas com monensina e salinomicina ao longo de 10 ciclos fermentativos.	92
Figura 33 - Viabilidade de <i>S. cerevisiae</i> em fermentações tratadas com salinomicina e monensina ao longo de 10 ciclos fermentativos.	93
Figura 34 - Produção de biomassa ao longo de dez ciclos fermentativos tratados com salinomicina (SL) e monensina (MN).	93
Figura 35 - Ácido láctico produzido em fermentações tratadas com 200 e 1.000 ppm de HEDTA em comparação com 1.200 ppm de ácido sulfúrico.	94
Figura 36 - Produção de etanol em fermentações tratadas com 200 e 1.000 ppm de HEDTA, e 600 ppm de ácido sulfúrico.	95
Figura 37 - Viabilidade de <i>S. cerevisiae</i> tratadas com ácido sulfúrico (0,6%) e HEDTA 0,2 e 1% ao longo de cinco ciclos fermentativos.	95
Figura 38 - Índice de floculação de suspensões de levedura PE-2 em fermentações tratadas com 500 e 1.000 ppm de EDTA.	96
Figura 39 - Floculação de leveduras em fermentação etanólica contaminada com bactéria láctica, em aumento de 1.000 X.	97
Figura 40 - Curva padrão de calibração de sacarose 0,1% (m/v) para dosagens de açúcares redutores totais (ART) em função da absorbância (546nm), pelo método DNS em espectrofotômetro Bioespectro mod. SP-22.	118
Figura 41 - Bactéria láctica isolada de fermentação industrial vista ao microscópio ótico (aumento 1000 x) em suspensão (A) e em coloração de Gram (B).	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição típica de melão de cana-de-açúcar	23
Tabela 2 - Antibióticos utilizados em fermentação alcoólica e seus respectivos mecanismos, efeitos e espectro de ação.	36
Tabela 3 - Produtos utilizados nos tratamentos dos inóculos mistos e no mosto de melão submetidos a fermentação.	51
Tabela 4 - Produção de ácido láctico em caldo MRS inoculado com <i>L. fermentum</i> ($3,5 \times 10^7$ bact./mL) com diferentes concentrações do biocida Huwa-San.após 6 horas de fermentação a 37°C.	65
Tabela 5 - Viabilidade (%) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2 tratada com produto Huwa-San e ácido sulfúrico após 6 horas de fermentação em diferentes temperaturas.	65
Tabela 6 - Parâmetros de fermentação de mosto de melão 22° Bx a 35°C, inoculadas com <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i> após 6 h, com inóculos tratados com Huwa-San 200 ppm e ácido sulfúrico 1.200 ppm.	70
Tabela 7 - Parâmetros de fermentação de mosto de melão 22° Bx a 35°C, inoculadas com <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i> após 6 h, com inóculos mistos tratados com Huwa-San (500 ppm) e ácido sulfúrico (1.800 ppm).	81
Tabela 8 - Parâmetros de fermentação de mosto de melão 22° Bx a 35°C, inoculadas com <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i> após 6 h, com inóculos mistos tratados com Huwa-San (1.000 ppm) e ácido sulfúrico (1.800 ppm).	81
Tabela 9 - Parâmetros do 1º ciclo de fermentação de mosto de melão 22° BX em batelada, tratadas com diferentes antimicrobianos e ácido sulfúrico (1,8% m/v).	75
Tabela 10 - Parâmetros do 2º ciclo de fermentação de mosto de melão industrial em batelada, tratadas com diferentes antimicrobianos e ácido sulfúrico (1,8% m/v).	75
Tabela 11 - Parâmetros de fermentação de mosto de melão 22° Bx inoculado com <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i> sem tratamento, nos tempos zero e após 6 horas a 35°C.	76
Tabela 12 - Parâmetros do 1º ciclo de fermentações com inóculos mistos (<i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i>) tratados com biocida TCC + CBA 4% após 6 horas.	77
Tabela 13 - Parâmetros de fermentações tratadas com concentrações crescentes do biocida TCC+CBA 2% em ausência e presença de ácido sulfúrico (600 00m) após 6 horas.	77
Tabela 14 - Efeito inibitório do digluconato de clorexidina sobre a produção de ácido láctico e viabilidade da levedura em fermentações de melão por <i>S. cerevisiae</i> contaminados por <i>L. fermentum</i> .	80
Tabela 15 - Parâmetros de fermentação de mosto de melão 22° Bx, inoculado com <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i> , após 6 horas a 35° C.	81

Tabela 16 - Parâmetros de fermentação de mosto de melação 22° Bx, inoculados com <i>S. cerevisiae</i> e de <i>L. fermentum</i> , após 6 horas de fermentação a 35° C, com inóculos tratados com antibacterianos naturais maitenina e extrato de lúpulo; e ácido sulfúrico.	82
Tabela 17 - Parâmetros de fermentação de mosto de melação 22° Bx, inoculado com <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i> , após 6 horas a 35° C.	85
Tabela 18 - População de bactérias em fermentações de mosto de melação 22° Bx, inoculado com <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i> , antes e após tratamento com antibióticos ionóforos.	86
Tabela 19 - Parâmetros de fermentação de mosto de melação 22° Bx, inoculado com <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i> , após 6 horas a 35° C..	90
Tabela 20 - pH e população de bactérias em fermentações de mosto de melação 22° Bx, inoculado com <i>S. cerevisiae</i> e bactéria láctica isolada de fermentação industrial (BAL), antes e após tratamento com antibióticos ionóforos.	90
Tabela 21 - Concentrações de açúcares redutores totais (ART%) nos melações e mosto 22° Bx, obtidas pelo método DNS, a partir da curva padrão (Figura 40).	118
Tabela 22 - Viabilidade de levedura em fermentações contendo diferentes concentrações de ácido láctico e ácido sulfúrico, referente às Figuras 10 e 11.	119
Tabela 23 - Concentração de ácido láctico em fermentações tratadas com biocida TCC + CBA, em comparação com ácido sulfúrico, referente à Figura 22.	119
Tabela 24 - Concentração de ácido láctico em fermentações tratadas com a maitenina, extrato de lúpulo, e com ácido sulfúrico, referente à figura 24.	119
Tabela 25 - Concentração de etanol em fermentações tratadas com a maitenina, extrato de lúpulo, em comparação com ácido sulfúrico, referente à figura 25	120
Tabela 26 - Concentração de ácido láctico em fermentações contaminadas com <i>L. fermentum</i> , tratadas com salinomicina e monensina, referente à figura 27.	120
Tabela 27 - Concentração de ácido láctico em fermentações contaminadas com <i>Lactobacillus ssp.</i> , tratadas com salinomicina e monensina, referente à figura 31.	120
Tabela 28 - Concentração de etanol em fermentações contaminadas com <i>L. fermentum</i> , tratadas com salinomicina e monensina, referente à figura 28.	120
Tabela 29 - Concentração de etanol em fermentações contaminadas com <i>Lactobacillus ssp.</i> , tratadas com salinomicina e monensina, referente à figura 32.	120

RESUMO

A contaminação bacteriana nas destilarias de etanol é um problema crônico que afeta o rendimento, na medida em que esses microrganismos competem pelo substrato a ser convertido em álcool pelas leveduras e liberam produtos indesejados no meio. A adição de ácido sulfúrico ao inóculo é a prática mais utilizada no controle dessas bactérias, contudo é uma substância de baixa eficácia, que também afeta a levedura. Antibacterianos utilizados complementarmente devem levar em conta a seletividade; o espectro de ação; e ainda restrições em fermentações que utilizam o excedente de levedura para ração animal. Nesse contexto, esse trabalho se propôs a estudar diversos biocidas, com base na literatura e desempenho em outras áreas. Foram realizadas fermentações por bateladas em frascos agitados em condições operacionais padrão (pH, temperatura, concentração de açúcares) com recuperação de células ao final de cada ciclo, reproduzindo o processo industrial. Os inóculos contendo leveduras e bactérias foram tratados com os seguintes produtos: peróxido de hidrogênio aditivado com prata; cloro oxigenado; triclorocarbanilida; cloreto de benzalcônio; digluconato de clorexidina; maitenina; salinomicina, e agentes quelantes EDTA e HEDTA, além dos produtos referência (beta ácido de lúpulo e monensina). Ao final das fermentações foram analisadas a população de bactérias, a viabilidade da levedura, e os teores de ácido láctico e etanol. O biocida a base de peróxido, na dose 1.000 ppm não mostrou a mesma eficácia registrada nos testes preliminares *in vitro*, que apontaram CIM de 200 ppm para bactérias lácticas; os biocidas triclorocarbanilida (80 ppm) associado ao cloreto de benzalcônio e clorexidina (50 ppm) tiveram desempenho inferior ao reportado na literatura. O cloro oxigenado na dose 100 ppm afetou tanto a bactéria quanto a levedura. Os extratos vegetais (lúpulo e maitenina), dosado a 30 ppm, se mostraram inócuos à levedura, e exibiram efeito bacteriostático sobre bactérias. Os antibióticos ionóforos (monensina 3 ppm e salinomicina 6 ppm) foram os mais efetivos na inibição das bactérias, preservando a viabilidade e metabolismo da levedura, com maior produção de etanol. Os agentes quelantes na concentração 1.000 ppm não foram efetivos na desfloculação microbiana, nem aumentaram a produção de etanol.

Palavras-chave: Fermentação etanólica. Contaminação bacteriana. Biocidas. Descontaminação de levedura. Tratamento de melaço.

ABSTRACT

Bacterial contamination in ethanol distilleries is a chronic problem that affecting the yield, once these microorganisms compete for the substrate to be converted to alcohol by yeast, as well as release undesired products in the medium. The addition of sulfuric acid to the inoculum is the most used practice to control such bacteria, but is a substance of low efficacy, which also affects the yeast. Antibacterial used in addition should take into account the selectivity; spectrum; and also restriction in fermentation that uses yeast surplus for animal feed. In this context, this work proposes to study various biocides, based on the literature and performance in other areas. Batch fermentations were performed in shake flasks under standard operational conditions (pH, temperature, sugar concentration) with a recovery of cells at the end of each cycle, reproducing the industrial process. The inoculum containing yeast and bacteria were treated with hydrogen peroxide plus silver; oxygenated chlorine; trichlorocarbanilide plus benzalkonium chloride; chlorhexidine digluconate; maytenin; salinomycin, and chelating agents EDTA and HEDTA, indeed the reference products (beta hops acid and monensin). At the end of fermentations were performed analysis of population of bacteria, yeast viability and lactic acid and ethanol concentration. The peroxide-based biocide in the dose 1000 ppm did not showed the same efficacy recorded in preliminary tests *in vitro*, which showed a MIC of 200 ppm for lactic acid bacteria; the trichlorocarbanilide biocides (80 ppm) associated with benzalkonium chloride and chlorhexidine (50 ppm) had underperformed reported in the literature. Oxygenated chlorine at dose 100 ppm affected both the bacterium as yeast. The plant extracts (hops and maytenin), dosed at 30 ppm, exhibited bacteriostatic effect on bacteria and proved harmless to yeast. Antibiotic ionophores (monensin - 3 ppm and salinomycin - 6 ppm) showed higher bactericidal effect, preserving the viability and metabolism of the yeast with increased ethanol production. Chelating agents at concentration 1000 ppm were not effective in microbial deflocculating and not increased ethanol production.

Keywords: Ethanol fermentation. Bacterial Contamination. Biocides. Yeast decontamination. Molasses treatment.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	Revisão da literatura	21
2.1	A importância do etanol combustível	21
2.2	Matérias-primas para produção de etanol	21
2.3	O microrganismo da fermentação	24
2.4	Fermentação etanólica	25
2.5	Processos industriais para produção de etanol	26
2.5.1.	Processo de fermentação Melle-Boinot	27
2.6	Extração de levedura de fermentação para nutrição animal	28
2.7	Contaminação bacteriana na fermentação etanólica	28
2.8	Floculação entre leveduras e bactérias	32
2.9	Controle da contaminação em fermentação etanólica	34
2.9.1	Ácido sulfúrico	35
2.9.2	Antibióticos	36
2.9.3	Peróxidos	38
2.9.4.	Antibacterianos diversos	39
2.9.5	Agentes quelantes	41
3	Objetivos	43
4	Material e métodos	45
4.1	Microrganismos e manutenção	45
4.1.1	Levedura	45
4.1.2	Bactérias	45
4.2	Meios de cultivo e manutenção	45
4.2.1	Meio YPD	45
4.2.2	Meio MRS	46
4.2.3	Caldo MRS	46
4.2.4	Mosto de melação 10° Bx	46
4.2.5	Mosto de melação 22° Bx	47
4.3	Antibacterianos e agentes químicos	47
4.4	Preparo das soluções de trabalho	48
4.5	Propagação e manutenção da levedura	48
4.6	Propagação das bactérias	50
4.7	Preparo do inóculo misto	50
4.8	Tratamentos antibacterianos	50

4.9 Determinação das concentrações inibitórias mínimas do Huwa-San pelo método de microdiluição em placas	51
4.9.1 Determinação das concentrações inibitórias mínimas do Huwa-San sobre <i>S. cerevisiae</i> e bactéria lática.....	51
4.9.2 Determinação da concentração inibitória mínimas do Huwa-San sobre <i>L. fermentum</i> pelo método de macrodiluição em tubos.....	52
4.11 Viabilidade de <i>S. cerevisiae</i> em fermentação na presença dos ácidos sulfúrico e láctico	53
4.12 Teste de desfloculação celular	53
4.13 Ensaios analíticos.....	54
4.14 Ensaios microbiológicos	55
5 Resultados e discussão	61
5.1 Variação na viabilidade de <i>S. cerevisiae</i> em fermentação na presença dos ácidos sulfúrico e láctico em diferentes concentrações.....	61
5.2 Avaliação da atividade biocida do Huwa-San sobre microbiota de fermentação etanólica.....	63
5.2.1 Determinação das concentrações inibitórias mínimas do Huwa-San sobre levedura PE-2 e bactérias lácticas.....	63
5.2.2 Efeito de tratamentos com Huwa-San sobre viabilidade de levedura PE-2 em fermentação.....	65
5.2.3 Efeito do produto Huwa-San sobre brotamento de levedura PE-2	67
5.2.4 Efeito do produto Huwa-San sobre cultivo de levedura PE-2	68
5.2.5 Efeito do tratamento dos inóculos mistos com Huwa-San sobre levedura PE-2 e <i>L. fermentum</i> em fermentação.....	70
5.3 Efeito do cloro oxigenado (COS) sobre levedura e bactéria láctica em fermentação	72
5.4 Efeito de tratamentos com triclorocarbanilida em associação com cloreto de benzalcônio sobre <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i> em fermentação.....	76
5.5 Efeito do digluconato de clorexidina sobre <i>S. cerevisiae</i> e bactérias lácticas em fermentação.....	79
5.6 Efeito da maitenina e extrato de lúpulo sobre microbiota de fermentação etanólica....	81
5.7 Efeito de antibióticos ionóforos sobre bactérias lácticas e levedura PE-2 em fermentação etanólica	85
5.7.1 Efeito de salinomicina e monensina sobre <i>L. fermentum</i> e levedura PE-2 em fermentação etanólica	85
5.8.2 Desfloculação de células com EDTA	96
6 Conclusões	99
7 Recomendações para próximos trabalhos	101
REFERÊNCIAS	103
APÊNDICES	118

Introdução

1 INTRODUÇÃO

As alterações climáticas e o acúmulo de substâncias tóxicas provocadas pelo uso de combustíveis fósseis em países com grande frota de veículos têm aumentado a importância e a demanda de álcool combustível – renovável e menos poluente (BALAT; BALAT, 2009). A fermentação, processo pelo qual leveduras convertem os açúcares em álcool, é a etapa mais crítica da produção do etanol (KELSALL; LYONS, 2003). Desse modo, medidas devem ser tomadas para aumentar a produtividade industrial desse biocombustível, o que exige melhor controle microbiológico da fermentação (BASÍLIO et al., 2008).

Uma dessas premissas é manter as células de levedura operando com alta viabilidade, metabolismo eficiente e, conseqüentemente maior produtividade. Nesse sentido, controlar a contaminação bacteriana e manter o pH adequado do mosto é fundamental para proteger a levedura, de modo a obter eficiência e baixo custo de produção (OLIVA-NETO et al., 2013).

O sistema de reciclo de células adotado nas destilarias brasileiras, embora seja vantajoso em diversos aspectos, submete as leveduras a condições de estresse por vários fatores que outros processos de produção de etanol não enfrentam (AMORIM et al., 2011). Substâncias contidas no meio fermentativo, como ácido láctico, sulfito, e etanol, em presença de alta acidez e temperaturas elevadas, têm um efeito sinérgico negativo sobre o metabolismo da levedura (DORTA et al., 2006).

Assim, inovações tecnológicas na fermentação alcoólica correspondem ao uso mais restrito do ácido sulfúrico e o controle da produção de ácido láctico. Isso passa pela pesquisa e desenvolvimento de novos agentes químicos e estratégias alternativas para controlar a contaminação bacteriana (OLIVA-NETO et al., 2013; NARENDRANATH; BREY, 2009).

Nesse contexto, esse trabalho se propôs a avaliar novos produtos destinados ao tratamento do mosto e da levedura, de modo a conter o crescimento de bactérias produtoras de ácido láctico e diminuir o uso do ácido sulfúrico no processo.

Conclusões

6 Conclusões

O controle da contaminação bacteriana na fermentação etanólica representa um grande desafio na gestão do processo industrial.

Os testes laboratoriais para determinar a sensibilidade de bactérias aos biocidas devem reproduzir as condições do ambiente no qual serão aplicados, como pH, temperatura e composição do meio de cultura, caso contrário fornecerão resultados imprecisos.

O produto Huwa-San, a base de peróxido de hidrogênio, exibiu baixa ação bactericida, mesmo na dose de 1.000 ppm, mas pode ser usado como coadjuvante de outros tratamentos biocidas, em destilarias de etanol com aproveitamento de levedura para ração animal.

Derivados de cloro afetam indiscriminadamente bactérias e levedura em fermentação etanólica, além de serem produtos com alto potencial corrosivo.

A associação dos biocidas triclorocarbanilida e cloreto de benzalcônio mostrou efeito apenas bacteriostático em dose de 80 ppm, o que poderia inviabilizar economicamente os tratamentos.

O gluconato de clorexidina, dosado a 50 ppm, não mostrou eficácia no controle de *L. fermentum* nas condições de fermentação.

O produto natural maitenina, na dose 30 ppm, teve efeito bacteriostático sobre *L. fermentum*, e poder ser uma alternativa para tratamento de fermentações que produzem levedura para ração animal. Contudo, sua utilização depende de disponibilidade em escala comercial.

A salinomicina, nas doses 6 e 10 ppm, se mostrou eficaz no controle de bactérias lácticas, com reflexos positivos nos diversos parâmetros da fermentação.

Agentes quelantes, em doses de até 1.000 ppm, não revertem a floculação microbiana, nem controla as bactérias em fermentação etanólica.

O ácido sulfúrico deve ser utilizado em concentração máxima de 2% (m/v) sobre o volume do inóculo para não afetar a levedura.

Referências

REFERÊNCIAS

- ALBERT, A.; GLEDHILL, W. S. The choice of a chelating agent for inactivating trace metals. **Biochemical Journal**, v. 41, n. 4, p. 529-533, 1947.
- ALDIGUIER, A. S.; ALFENORE, S.; CAMELEYRE, X.; GOMA, G.; URIBELARREA, J. L.; GIULLOUET, S. E.; MOLINA-JOUVE, C. Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behavior in ethanol bio-fuel production. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 26, p. 217-222, 2004.
- ALEXANDRE, H.; CHARPENTIER, C. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 20-27, 1998.
- ALVES, L. M. C.; SCHUCH, V.; SOUZA, J. A. M.; LEMOS, E. G. M. Metagenoma e a desconstrução da biomassa. In: LEMOS, E. G. M.; STRADIOTTO, N. R. (Org.). **Bioenergia: desenvolvimento, pesquisa e inovação**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2012. Cap. 4, p. 83-111.
- AMORIM, H. V.; LOPES, M. L. Tecnologia sobre processamento de leveduras vivas, inativas e seus derivados: conceitos básicos. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE USO DA LEVEDURA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 1., 2009, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2009. p. 5-21.
- 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.; AUSTIN, G. D.; KELSALL, D. R.; KLUHSPIES, C. (Ed.). **The alcohol textbook**. 5th ed. Nottingham: Nottingham Univ. Press, 2009. Chap. 5, p. 39-56.
- 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.
- ANDRIETTA, M. G. S.; OLIVERIA, A. J.; STUPIELLO, J. P. Determinação da concentração inibitória mínima para cinco antimicrobianos sobre bactérias G (+) isoladas na indústria brasileira de fermentação alcoólica. **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 13, p. 42-43, 1995.
- AQUARONE, E. Penicillin and tetracycline as contamination control agents in alcoholic fermentation of sugarcane molasses. **Applied Microbiology**, v. 8, p. 263-268, 1960.
- AQUARONE, E.; SATO, S. Controle de contaminações microbianas em processos fermentativos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDL, W. (Coord.). **Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. Cap. 25, p. 583-593. (Biotecnologia industrial, v. 3).
- 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, 2006.

BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Applied Energy**, v. 86, p. 2273- 2282, 2009.

BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO SOCIAL - Centro de gestão de assuntos estratégicos. (Org.). **Bioetanol de cana de açúcar**: energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro: BNDES, 2008. Disponível em: <<http://www.bioetanoldecana.org/pt/download/bioetanol.pdf>>. Acesso em: 21/10/2013.

BARTH, D.; MONTEIRO, A. R. S.; COSTA, M. M. da; VIRKAJÄRVI, I.; SACON, V.; WILHEMSOM, A. DesinFix TM 135 in fermentation process for bioethanol production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 323-325, 2014.

BASF. **Trilon**: chelating agents. Ludwigshafen, 1995.

BASÍLIO, A. C. M.; ARAÚJO, P. R. L. de; MORAIS, J. O. F.; SILVA FILHO, E. A. da; MORAIS JUNIOR, M. A. de; SIMÕES, D. A. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. **Current Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 322-326, 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 development and prospects. Rijeka: Intech, 2011. Chap. 5, p. 85-100.

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, p. 1155-1163, 2008.

BAUER, F. F.; GOVENDER, P.; BESTER, M. C. Yeast flocculation and its biotechnological relevance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 88, n. 1, p. 31-39, 2010.

BAYROCK, D. P.; INGLEDEW, W. M. Inhibition of yeast by acid lactic bacteria in continuous culture: nutrient depletion and/or acid toxicity? **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 362-368, 2004.

BECKNER, M.; IVEY, M. L.; PHISTER, T. G. Microbial contamination in fuel ethanol fermentations. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, n. 4 p. 387-394, 2011.

BISCHOFF, K. M.; SKINNER-NEMEC, K. A.; LEATHERS, T. D. Antimicrobial susceptibility of *Lactobacillus* species isolated from commercial ethanol plants. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 739-744, 2007.

BISCHOFF, K. M.; LIU, S.; LEATHERS, T. D.; WORTHINGTON, R. E.; RICH, J. O. Modeling bacterial contamination in fuel ethanol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 1, p. 117-122, 2009.

BRIÑEZ, W. J.; ROIG-SAGUÉZ, A. X.; HERRERO, M. M. H.; LÓPEZ-PEDEMONTE, T.; GUAMIS, B. Bactericidal efficacy of peracetic acid in combination with hydrogen peroxide against pathogenic and non pathogenic strains of *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp., and *Escherichia coli*. **Food Control**, v. 17, p. 516-521, 2006.

BROMBERG, R.; YOKOYA, F. Chemical modifications of the cell-surface components of *Lactobacillus fermentum* FTPT 1405 and their effect on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 5, p. 508-511, 1995.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservatives agents in food: mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, n. 1/2, p. 1-17, 1999.

BURNQUIST, H. L. Porque o Brasil deve apoiar a internacionalização do etanol? **Revista Opiniões**, Ribeirão Preto, p. 22-23, jan./mar. 2007. Edição especial.

CALAM, C. T. Shake-flask fermentation. In: DEMAIN, A. L.; SOLOMON, N. A. **Manual of industrial microbiology and biotechnology**. Washington, DC: American Society of Microbiology, 1986. Chap. 6, p. 59-65.

CÂMARA, A.; AFONSO, J. A. B.; MENDONÇA, C. L.; VIEIRA, A. C. S. Efeito da salinomicina na prevenção da acidose láctica ruminal experimental em ovinos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 1, p. 65-73, 2013.

CAMOLEZ, M. A.; MUTON, M. R. J. Influência de microrganismos contaminantes sobre o processo fermentativo. **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 3, n. 5, p. 42-47, 2005.

CARMELO, V.; SANTOS, H.; SÁ-CORREIA, I. Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes**, v. 1325, n. 1, p. 63-70, 1997.

CAVALHEIRO, A. J.; COUTINHO, I. D.; LEME, G. M.; SILVA, A. A.; SILVA, A. P. D. Metabolômica de cana-de-açúcar e sua relação com a produção de biomassa vegetal para bioenergia. In: LEMOS, E. G. M; STRADIOTTO, N. R. (Org.). **Bioenergia: desenvolvimento, pesquisa e inovação**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2012. Cap. 1, p. 15-34.

CHANG, I. S.; KIM, B. H.; SHIN, P. K. Use of sulfite and hydrogen peroxide to control bacterial contamination in ethanol fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 1-6, 1997.

CHERUBIN, R. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003. 124 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CHOTINEERANAT, S.; WANSUKSRI, R.; PIYACHOMKWAN, K.; CHATAKANONDA, P.; WEERATHAWORN, P.; SRIROTH, K. Effect of calcium ions on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Sugar Tech**, v. 12, n. 2, p. 120-124. 2010.

CLEGHORN, B.; BOWDEN, G. H. The effect of pH on the sensitivity of species of *Lactobacillus* to chlorhexidine and the antibiotics minocycline and spiramycin. **Journal of Dental Research**, v. 68, n. 7, p. 1146-1150, 1989.

CLINICAL LABORATORY STANDARD INSTITUTE. **Document M07-A9**. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. 9th ed. Wayne, 2012. v. 32, n. 2, 88 p.

CORADELLO, L. F. C. **Condições de propagação e revitalização para produção de etanol pela linhagem iqar/45-2 da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em fermentações sucessivas**. 2012. 135 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

DAY, W. H.; SERJAK, W. D.; STRATTON, J. R.; STONE, L. Contamination inhibition, antibiotics as contamination-control agents in grain alcohol fermentations.

Agricultural and Food Chemistry, v. 2, p. 252-258, 1954.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 1, n. 23, p. 130-135, 1960.

DEVORE, J. L. **Probabilidade e estatística para a engenharia e ciências**. São Paulo: Cengage Learning, 2014.

DOETSCH, R. N. Determinative methods of light microscopy. In: GERHARDT, P. (Ed.). **Manual of methods for general bacteriology**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1981. Chap. 3, p. 21-33.

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.

DUNCAN, C. L.; COLMER, A. R. Coliforms associated with sugar cane plants and juices. **Applied Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 173-177, 1964.

DWYER, D. J.; KOHANSKY, M. A.; COLLINS, J. J. Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 482-489, 2009.

EARNEST, C.; SNYDER, C.; WESTRA, S. Fermentation management. In: INGLEDEW, W. M.; AUSTIN, G. D.; KELSALL, D. R.; KLUHSPIES, C. (Ed.). **The alcohol textbook**. 5th ed. Nottingham: Nottingham Univ. Press, 2009. Chap. 19, p. 275-287.

ERGUN, M.; MUTLU, S. F.; GÜREL, O. Improved ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* with EDTA, ferrocyanide and zeolite X addition to sugar beet molasses. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 68, n. 2, p. 147-150, 1997.

ESSIA-NGANG, J. J.; LETOURNEAU, F.; VILLA, P. Alcoholic fermentation of beet molasses: effects of lactic acid on yeast fermentation parameters. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 125-128, 1989.

FERNANDES, E. A. N.; NEPOMUCENO, N.; TREVIZAM, A. B.; AMORIM, H. V. From potential do reality: yeasts derived from ethanol production for animal nutrition. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 234, n. 1, p. 113-118, 1998.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **The Journal of Experimental Biology**, v. 201, n. 8, p. 1203-1209, 1998.

FURUKAWA, S.; WATANABE, T.; TOYAMA, H.; MORINAGA, Y. Significance of microbial symbiotic coexistence in traditional fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, n. 5, p. 533-539, 2013.

FUX, C. A.; STOODLEY, P.; SHIRTLIFF, M.; COSTERTON, J. W. The functional resistance of bacterial biofilms. In: MAYERS, D. (Ed.). **Antimicrobial drug resistance: mechanisms of drug resistance**. New York: Humana Press, 2009. v. 1, chap. 11, p. 121-131.

GALLO, C. R. Identificação de bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 10, p. 30-34, 1992.

GALLO, C. R.; CANHOS, V. P. Efeito do tratamento ácido do fermento sobre a microbiota bacteriana contaminante da fermentação alcoólica. **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 9, n. 6, p. 35-37, 1991.

GAO, Y. C.; ZHANG, G.; KRENTZ, S.; DARIUS, S.; POWER, J.; LAGARDE, G. Inhibition of spoilage lactic acid bacteria by lysozyme during wine alcoholic fermentation. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 8, n. 1, p. 76-83, 2002.

GARRO, M. S.; VALDEZ, G. F.; GIORI, G. S. Temperature effect on the biological activity of *Bifidobacterium longum* CRL 849 and *Lactobacillus fermentum* CRL 251 in the pure and mixed cultures grown in soymilk. **Food Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 511-518, 2004.

GOLDEMBERG, J.; MACEDO, I. C. Brazilian alcohol program: an overview. **Energy for Sustainable Development**, v. 1, p. 17-22, 1994.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, v. 36, p. 2086-2097, 2008.

GRAHAM, H.; SANTOS, T. T.; WADT, G. Mode of action of yeast products in animal feed. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE USO DA LEVEDURA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 1., 2009, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2009. p. 77-90.

GRAVES, T.; NARENDRANATH, N. V.; DAWSON K.; POWER, R. Interaction effects of lactic acid and acetic acid at different temperatures on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 5, p. 1190-1196, 2006.

GUERRA, E. J.; ANGELIS, D. F. Flocculação da levedura induzida por bactérias na fermentação etanólica. 1º método de detecção preventiva e estudos para o controle. **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 16, p. 25-27, 1998.

GULLO, F. P.; SARDI, J. C. O.; SANTOS, V. A. F. F. M.; SANGALLI-LEITE, F.; PITANGI, N. S.; ROSSI, S. A.; SILVA, A. C. A. P.; SOARES, L. A.; SILVA, J. F.; OLIVEIRA, H. C.; FURLAN, M.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Antifungal activity of maytenin and pristimerin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012. doi:10.1155/2012/340787.

HALDEN, R. U.; PAULL, D. H. Co-occurrence of trichlorcarban and triclosan in U. S. water resources. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 6, p. 1420-1426, 2005.

HOLYOAK, C. D.; STRATFORD, M.; McMULLIN, Z.; COLE, M. B.; CRIMMINS, K.; BROWN, A. J.; COOTE, P. J. Activity of the plasma membrane H⁺-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of the weak-acid preservative sorbic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3158-3164, 1996.

HYNES, S. H.; KJARSGAARD, D. M.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Use of virginiamycin to control the growth of lactic acid bacteria during alcoholic fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 284-291, 1997.

IMAI, T.; OHNO, T. The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 3604-3608, 1995.

INGLEDEW, W. M. Yeasts: physiology, nutrition and ethanol production. In: INGLEDEW, W. M.; AUSTIN, G. D.; KELSALL, D. R.; KLUHSPIES, C. (Ed.). **The alcohol textbook**. 5th ed. Nottingham: Nottingham Univ. Press, 2009a. Chap. 9, p. 101-113.

INGLEDEW, W. M. Yeast stress in the fermentation process. In: INGLEDEW, W. M.; AUSTIN, G. D.; KELSALL, D. R.; KLUHSPIES, C. (Ed.). **The alcohol textbook**. 5th ed. Nottingham: Nottingham Univ. Press, 2009b. Chap. 10, p. 116-126.

INGLEDEW, W. M.; AUSTIN, G. D.; KRAUS, J. K. Commercial yeast production for the fuel ethanol and distilled beverage industries. In: INGLEDEW, W. M.; AUSTIN, G. D.; KELSALL, D. R.; KLUHSPIES, C. (Ed.). **The alcohol textbook**. 5th ed. Nottingham: Nottingham Univ. Press, 2009. Chap. 11, p. 127-144.

INGLEDEW, W. M.; AUSTIN, G. D.; KELSALL, D. R.; KLUHSPIES, C. The alcohol industry: how has it changed and matured? In: _____. (Ed.). **The alcohol textbook**. 5th ed. Nottingham: Nottingham Univ. Press, 2009. Chap. 1, p. 1-6.

KABARA, J. J.; ORTH, D. S. Preservative-free and self-preserving cosmetics and drugs. In: KABARA, J. J.; ORTH, D. S. (Ed.). **Principles for product preservation**. New York: Marcel Dekker, 1997. v. 16, chap. 1, p. 1-14. (Cosmetic science and technology, v. 16).

KANDLER, O.; WEISS, N. Genus *Lactobacillus*. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. v. 2, sect. 14, p. 1208-1234.

KELSALL, D. R.; LYONS, T. P. Practical management of yeast: conversion of sugars to ethanol. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook**. 4th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. Chap. 10, p. 121-133.

KETCHUM, P. A. **Microbiology**: concepts and applications. New York: John Wiley & Sons, 1988.

KHAN, S. J.; ROSER, D. J.; DAVIES, C. M.; PETERS, G. M.; STUETZ, R. M. TUKCER, R.; ASHBOLT, N. J. Chemical contaminants in feedlot wastes: concentration, effects and attenuation. **Environment International**, v. 34, p. 839-859, 2008.

KIRSOP, B. E. Maintenance of yeasts. In: KIRSOP, B. E.; DOYLE, A. (Ed.). **Maintenance of microorganisms and cultured cells**. 2nd ed. London: Academic Press, 1991. p. 161-181.

KYRIAKIS, S. C.; SARRIS, K.; KRITAS, S. K.; SAOULIDIS, K.; TSINAS, A. C.; TSILOYANNIS, V. K. The effect of salinomycin on the control of *Clostridium perfringens* type-A infection in growing pigs. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 42, p. 355-359, 2010.

LALUCE, C.; TOGNOLLI, J. O.; OLIVEIRA, K. F.; SOUZA, C. S.; MORAIS, M. R. Optimization of temperature, sugar concentration, and inoculum size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, p. 627-637, 2009.

LALUCE, C.; LONGO, E.; SPONCHIADO, S. R. P.; CILLI, E. M.; GALLARDO, J. C. M.; MASIERO, M. O. C. A complexidade da produção do bioetanol em fermentações abertas de matérias-primas industriais. In: LEMOS, E. G. M.; STRADIOTTO, N. R. (Org.). **Bioenergia**: desenvolvimento, pesquisa e inovação. São Paulo: Cultura Acadêmica. 2012. Cap. 7, p. 165-194.

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

LEGRAS, J. L.; MERDINOGLU, D.; CORNUET, J. M.; KARST, F. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 2091-2102, 2007.

LEITE, I. R.; FARIA, J. R.; MARQUEZ, L. D. S.; REIS, M. H. M.; REZENDE, M. M.; RIBEIRO, E. J.; CARDOSO, V. L. Evaluation of hop extract as a natural antibacterial agent in contaminated fuel ethanol fermentations. **Fuel Processing Technology**, v. 106, p. 611-618, 2013.

LEIVE, L. A nonspecific increase in permeability in *Escherichia coli* produced by EDTA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 53, n. 4, p. 745-750, 1965.

LEJA, K.; BRODA, M. The occurrence and identification of microbiological contamination in fuel ethanol production. **Technologia Alimentaria**, v. 4, n. 8, p. 25-31, 2009.

- LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDL, W. (Coord.). **Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. Cap. 1, p. 1-43. (Biotecnologia industrial, v. 3).
- LIMA, K. C.; NEVES, A. A.; BEYRUTH, J. B.; MAGALHÃES, F. A. C.; UZEDA, M. Levels of infection and colonization of some oral bacteria after use of NAF, chlorhexidine and combined chlorhexidine with NAF mouth rinses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 158-161, 2001.
- LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, p. 627-642, 2005.
- 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.
- LOWBURY, E. J. L.; LILLY, H. A. Use of 4% chlorhexidine detergent solution (hibiscrub) and other methods of skin disinfection. **British Medical Journal**, v. 1, p. 510-515, 1973.
- LUCENA, B. T. L.; SANTOS, B. M.; MOREIRA, J. L. S.; MOREIRA, A. P. B.; NUNES A. C.; AZEVEDO, V.; MIYOSHI, A.; THOMPSON, F. L.; MORAIS JUNIOR, M. A. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiology**, 2010. doi:10.1186/1471-2180-10-298.
- LYONS, T. P. Alcohol production: a traditional process changing rapidly. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook**. 4th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. p. ix-xi.
- MACEDO, I. C. Situação atual e perspectivas do etanol. **Estudos Avançados**, v. 21, p. 157-165, 2007.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. São Paulo: Prentice Hall, 2004.
- MADSHUS, I. H. Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. **Biochemical Journal**, v. 250, n. 1, p. 1-8, 1988.
- MAEKAWA, L. E.; CARVALHO, A. S.; CARDOSO, P. E.; XAVIER, A. C. C.; OLIVEIRA, L. D. Atividade antimicrobiana de EDTA gel associado a peróxido de hidrogênio sobre cepas clínicas de *Candida albicans*. **Ciência Odontológica Brasileira**, v. 12, p. 57-60, 2009.
- MAIORELLA, B.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, p. 103-121, 1983.
- MENEGHIN, S. P.; REIS, F. C.; ALMEIDA, P. G.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Chlorine dioxide against bacteria and yeast from the alcoholic fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 337-343, 2008.

MILL, P. J. The nature of the interaction between flocculent cells in the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 61-68, 1964.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n.3, p. 426-428, 1959.

MORAIS, M. R. **Parâmetros de fermentação e estabilidade genética de leveduras em ciclos sucessivos de fermentação**. 2013. 103 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

MULTICLOR QUÍMICA LTDA (Brasil). F. Jorge. **Cloro oxigenado para tratamento de águas e seu respectivo processo de obtenção e aplicação**. PI0902987-7A2, 12 ago. 2009, 12 abr. 2011.

MUTHAIYAN, A.; LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. **Energy and Combustion Science**, v. 37, p. 351-379, 2011.

NARENDRANATH, N. V. Bacterial contamination and control in ethanol production. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook**. 4th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. Chap. 20, p. 287-298.

NARENDRANATH, N. V.; BREY, S. Bacterial contamination and control. In: INGLEDEW, W. M.; AUSTIN, G. D.; KELSALL, D. R.; KLUHSPIES, C. (Ed.). **The alcohol textbook**. 5th ed. Nottingham: Nottingham Univ. Press, 2009. Chap. 23, p. 337-356.

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 fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 7, p. 2239-2243, 2005.

NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Urea hydrogen peroxide reduces the numbers of lactobacilli, nourishes yeast, and leaves no residues in the ethanol fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4187-4192, 2000.

NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 171-177, 2001.

NARENDRANATH, N. V.; HYNES, S. H.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentations. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4158-4163, 1997.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NG, C. H.; TAN, S; X.; PERRONE, G. G.; THORPE, G. W.; HIGGINS, V. J.; DAWES, I. W. Adaptation to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of NADPH-generating systems and the SKN7 transcription factor. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, p. 1131-1145, 2008.

NOBEL, J. G.; DIJKERS, C.; HOOIJEBERG, E.; KLIS F. M. Increased cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with dithiothreitol or EDTA. **Journal of General Microbiology**, v. 135, p. 2077-2084, 1989.

NOBRE, T. P.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 20-25, 2007.

NOWAK, B.; VANBRIESEN, J. M. **Biogeochemistry of chelating agents**. Washington, DC: American Chemical Society, 2005. (ACS symposium series, 910).

OLIVA-NETO, P. de; YOKOYA, F. Evaluation of bacterial contamination in a fed-batch alcoholic fermentation process. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 697-699, 1994.

OLIVA-NETO; P. de; YOKOYA, F. Effect of 3,4,4'-Trichlorocarbanilide on growth of lactic acid bacteria contaminants in alcoholic fermentation. **Bioresources Technology**, v. 63, p. 17-21, 1998.

OLIVA-NETO, P. de; YOKOYA, F. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria from the alcohol industry to several antimicrobial compounds. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 10-14, 2001.

OLIVA-NETO, P. de; LUDIWIG, K. M.; DORTA, C.; CARVALHO, A. F. A.; SILVA, D. F.; LIMA, V. M. G. Contaminação na fermentação alcoólica para produção de etanol carburante. In: LEMOS, E. G. M.; STRADIOTTO, N. R. (Org.). **Bioenergia: desenvolvimento, pesquisa e inovação**. São Paulo: Cultura Acadêmica. 2012. Cap. 14, p. 447-488.

OLIVA-NETO, P. de; DORTA, C.; LUDIWIG, K. M.; 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: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Materials and processes for energy: communicating current research and technological development**. Badajoz: Formatex Research Center, 2013. p. 371-379. (Energy book series, 1).

OLIVA-NETO, P. de; LIMA, F. A.; SILVA, K. C.; SILVA, D. F.; CARVALHO, A. F. A.; SANTOS, C. Chemical inhibition of the contaminant *Lactobacillus fermentum* from distilleries producing fuel bioethanol. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 3, p. 441-447, 2014.

OLIVEIRA, K. F. de. **Efeitos do ácido láctico adicionado sobre a produção de etanol em fermentações com reutilização de células a 34 °C**. 2008. 191 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto Butantan; Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

OVIDEIO, C.; RODRIGUEZ, J. EDTA: chelating agent under environmental scrutiny. **Química Nova**, v. 26, p. 901-905, 2003.

PELCZAR, J. M. Jr.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v. 1.

PENG, J.; ZHANG, L.; GU, Z. H.; DING, Z. Y.; SHI, Z. Y. The role of nisin in fuel ethanol production with *Saccharomyces cerevisiae*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 55, p. 128-134, 2012.

PENG, X.; SUN, J.; ISERENTANT, D.; MICHIELS, C. Flocculation and coflocculation of bacteria and yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, p. 777-781, 2001.

PEREIRA, F. B.; GOMES, D. G.; GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Cell recycling during repeated very high gravity bio-ethanol fermentation using the industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. **Biotechnology Letters**, v. 53, p. 45-53, 2012.

PIGGOT, R. Treatment and fermentation of molasses when making rum-type spirits. In: JACQUES, K.A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook**. 4th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. Chap. 8, p. 75-84.

PILGRIM, C. Status of the worldwide fuel alcohol industry. In: INGLEDEW, W. M.; AUSTIN, G. D.; KELSALL, D. R.; KLUHSPIES, C. (Ed.). **The alcohol textbook**. 5th ed. Nottingham: Nottingham Univ. Press, 2009. Chap. 2, p. 7-17.

PILLAI, J. S.; DANESH, N.; PUTTAIAH, E. T.; FIRISH, K. Microbial diversity in solid waste molasses of sugar industry. **International Journal of Environmental Science**, v. 2, n. 2, p. 723-730, 2011.

POWER, R. Enzymatic conversion of starch to fermentable sugars. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook**. 4th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. Chap. 3, p. 23-32.

RAMOS, I. A.; LEITE, R. B.; MENEZES, K. M. Efeito inibitório de enxaguatórios bucais sobre o crescimento de *Lactobacillus casei*. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 69, n. 1, p. 107-110, 2012.

REED, G.; NAGODAWITHANA, T. W. **Yeast technology**. 2nd ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991.

ROBERGE, P. R. Environments. In: _____. **Handbook of corrosion and Engineering**. New York: McGraw-Hill, 1999. Chap. 2, p. 55-220.

RÜCKLE, L.; SENN, T. Hop acids can efficiently replace antibiotics in ethanol production. **International Sugar Journal**, v. 108, p. 139-147, 2006.

RUSSEL, I. Understanding yeast fundamentals. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook**. 4th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. Chap. 9, p. 85-119.

SALMA, M.; ROUSSEAU, S.; SEQUEIRA-LE GRAND, A.; DIVOL, B.; ALEXANDRE, H. Characterization of the viable but nonculturable (VBNC) state in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One**, v. 8, n. 10, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0077600.

- SANDERSON, W. R. Cleaner industrial processes using hydrogen peroxide. **Pure and Applied Chemistry**, v. 72, n. 7, p. 1289-1304, 2000.
- SANTOS, M. T.; YOKOYA, F. Characteristics of yeast cell flocculation by *Lactobacillus fermentum*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, n. 2, p. 151-154, 1993.
- SCHEBB, N. H.; INCEOGLU, B.; AHN, K. C.; MORISSEAU, C.; GEE, S. J.; HAMMOCK, B. Investigation of human exposure to triclocarban after showering and preliminary evaluation of its biological effects. **Environmental Science Technology**, v. 45, p. 3109-3115, 2011.
- SCHIMIDELL, W. Biorreatores e processos fermentativos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. Cap. 8, p. 179-192. (Biotecnologia industrial, v. 2).
- SCHNÜRER, J.; MAGNUSSON, J. Antifungal lactic acid bacteria as bio preservatives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, p. 70-78, 2005.
- SEELEY, H. W. Jr.; VANDEMARK, P. J.; LEE, J. J. **Microbes in action**. 4th ed. New York: Freeman & Company, 1984.
- SIMPSON, W. J.; HAMMOND, J. R. M. The response of brewing yeast to acid washing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 95, p. 347-354, 1989.
- SKINNER, K. A.; LEATHERS, T. D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 401-408, 2004.
- SOUZA, M. A. C.; MUTTON, M. J. R. Flocculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum* em processos industriais de fermentação alcoólica avaliada por técnica fotométrica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 4, p. 893-898, 2004.
- SOUZA, C.; OLIVEIRA, K. F.; TREVISAN, H. C.; LALUCE, C. A strategy to compare yeast strains and improve cell survival in ethanol production processes above 30°C. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology**. Badajoz: Fomatex, 2007. p. 410-417. (Microbiology book series, v. 1).
- STRATFORD, M. Yeast flocculation: calcium specificity. **Yeast**, v. 5, p. 487-496, 1989.
- STRATFORD, M. Induction of flocculation in brewing yeasts by change in pH value. **Microbiology Letters**, v. 136, p. 13-18, 1996.
- STRAVER, M. H.; KIJNE, J. W.; SMIT, G. Cause and control of flocculation in yeast. **Trends in Biotechnology**, v. 11, p. 228-232, 1993.
- STROPPIA, C. T.; ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; SERRA, G. E. Use of penicillin and monensin to control bacterial contamination of Brazilian alcohol fermentations. **International Sugar Journal**, v. 102, p. 78-82, 2000.

TABER, H. W. Antibiotic permeability. In: LEWIS, K.; SALYERS, A. A.; TABER, H. W.; WAX, R. G. (Ed.). **Bacterial resistance to antimicrobials**. New York: Marcel Dekker, 2008. Chap. 8, p. 193-208.

TAMEHIRO, N.; HOSAKA, T.; XU, J.; HU, H.; OTAKE, N.; OCHI, K. Innovative approach for improvement of an antibiotic-overproducing industrial strain of *Streptomyces albus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 6412-6417, 2003.

TANG, Y. Q.; AN, M. Z.; ZHONG, Y. L.; SHIGERU, M.; WU, X. L.; KIDA, K. Continuous ethanol fermentation from non-sulfuric acid-washed molasses using traditional stirred tank reactors and the flocculating yeast strain KF-7. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, p. 41-46, 2010.

TECLU, D.; TIVCHEVA, G.; LAINGB, M.; WALLIS, M. Determination of the elemental composition of molasses and its suitability as carbon source for growth of sulphate-reducing bacteria. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, p. 1157-1165, 2009.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi-continuous alcoholic fermentation of corn mash. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90. p. 819-828, 2001.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic acid and lactic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1616-1623, 2002.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Crescimento microbiano. In: _____. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012. Cap. 6, p. 156-182.

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.

VENTURA, R. Potenciais contaminantes em levedura extraída de fermentação alcoólica. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE USO DA LEVEDURA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 1., 2009, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2009. p. 137-142.

VIEGAS, E. K. D. **Propriedade antibacteriana da própolis verde sobre bactérias da fermentação etanólica**. 2011. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

WALKER, G. M. **Yeast physiology and biotechnology**. London: John Wiley & Sons, 1998.

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

XU, D.; LI, Y.; LINDENBERGER, A. L.; LIU, H.; GU, T. Green chemicals for enhanced biofilm mitigation. In: MÉNDEZ-VILAS, A. **Microbial pathogens and strategies for combating them**. Badajoz: Formatex Research Center, 2013. v. 1, p. 90-101.

YAMADA, E. A.; ALVIM, I. D.; SANTUCCI, M. C. C.; SGARBIERI, V. C. Composição centesimal e valor proteico de levedura residual da fermentação etanólica e seus derivados. **Revista de Nutrição**, v. 16, p. 423-432, 2003.

YOKOYA, F.; OLIVA-NETO, P. Características da floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*. **Revista de Microbiologia**, v. 22, p. 12-16, 1991.

ZANDYCKE, S. V. Yeast monitoring and identification. In: INGLEDEW, W. M.; AUSTIN, G. D.; KELSALL, D. R.; KLUHSPIES, C. (Ed.). **The alcohol textbook**. 5th ed. Nottingham: Nottingham Univ. Press, 2009. Chap. 8, p. 95-100.

ZHANG, Z. Batch fermentation and fermenter design. In: INGLEDEW, W. M.; AUSTIN, G. D.; KELSALL, D. R.; KLUHSPIES, C. (Ed.). **The alcohol textbook**. 5th ed. Nottingham: Nottingham Univ. Press, 2009. Chap. 17, p. 229-257.

ZHU, C.; CHEN, Z.; YU, G. Fungicidal mechanism of chlorine dioxide on *Saccharomyces cerevisiae*. **Annals Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 495-502, 2013.