Emprego de cepas de *Zymomonas mobilis* em processos fermentativos

Wellington Pine Omori[(1)]
Renata Trindade Pires[(2)]
Flávia Okushiro Ogassavara[(3)]
Mariana Carina Frigieri[(4)]

Resumo

Devido às constantes variações do petróleo e da contínua preocupação com as emissões de gases que agravam o efeito estufa, o mundo tem buscado novas alternativas energéticas vindas de fontes renováveis. Uma dessas alternativas é o etanol, que é produzido, com auxilio de microrganismos, a partir da conversão de açúcares. O seu uso é muito interessante para a substituição dos combustíveis de origem fóssil e produtos petroquímicos. No Brasil o processo para obtenção do álcool etílico é realizado através da fermentação empregando-se leveduras, sendo a *Saccharomyces cerevisiae* o microrganismo de escolha das indústrias sucroalcooleiras. Contudo, a bactéria *Zymomonas mobilis* tem despertado grande interesse, por seu metabolismo peculiar e por suas características no processo fermentativo para a produção de etanol. A bactéria *Zymomonas mobilis* é Gram-negativa, não esporulante e móvel, anaeróbia facultativa, sendo que, algumas linhagens são obrigatoriamente anaeróbias. Essa bactéria na presença de carboidratos simples é capaz de produzir cerca de 1,9 mol de etanol por mol de glicose, com velocidade três a quatro vezes maior que *Saccharomyces cerevisiae*. Porém, esse rendimento diminui quando é utilizada a sacarose, um dissacarídeo, como fonte de carboidrato. Alguns autores associam essa diminuição com a formação de subprodutos. Estudos devem ser realizados procurando compreender melhor as características fisiológicas desse microrganismo, de forma a regular a síntese de etanol e, assim, a bactéria *Zymomonas mobilis* poderia se tornar uma alternativa muito interessante para a produção industrial de etanol.

Palavras-chave: microrganismos, fermentação, açúcares e subprodutos

[1] Graduando do curso de Tecnologia em Biocombustíveis. FATEC-JB. wpomori@hotmail.com
[2] Graduada do curso de Tecnologia em Biocombustíveis. FATEC-JB. renatatrindadepires@yahoo.com.br
[3] Engenheira Agrônoma, FCAV-UNESP. Auxiliar docente FATEC-JB. flaviaokog@hotmail.com
[4] Doutora em Biotecnologia IQ-UNESP. Professora Assistente FATEC-JB. marifrigieri@gmail.com

Abstract

Due to the constant fluctuations of petroleum and the unremitting concerns over gas emissions that exacerbate the greenhouse effect, the world has pursued new energetic alternatives arising from renewable resources. One of those energy resources is ethanol, which is produced with the aid of microorganisms from the conversion of sugars. Its use is very attractive for the replacement of fossil fuels and petrochemicals. In Brazil, the process for obtaining ethyl alcohol is accomplished by the yeast fermentation and Saccharomyces cerevisiae is the chosen organism for the sugar and alcohol industries. Yet, the bacterium Zymomonas mobilis has attracted increased interest both for its unique metabolism and for its characteristics in the fermentation process for the production of ethanol. Zymomonas mobilis is a gramnegative facultative anaerobic bacterium, non spore-forming and movable, and some strains are necessarily anaerobic. This bacterium in the presence of simple carbohydrates is capable of producing approximately 1.9 mol of ethanol per mol of glucose, at a rate of 3 to 4 times greater than Saccharomyces cerevisiae. However, this efficiency decreases when using a disaccharide named sucrose as a source of carbohydrate. Some researchers associate this decrease with the byproducts formation. Therefore, studies should be carried out in order to better understand the physiological characteristics of that microorganism with a focus at regulating the synthesis of ethanol and, thus, the bacterium Zymomonas mobilis could become a very interesting alternative for the industrial production of ethanol.

Keywords: *microorganisms, fermentation, sugar e subproducts.*

Introdução

Com a crise mundial do petróleo na década de 70, os países foram forçados a buscarem novas fontes sustentáveis de matéria-prima para fins energéticos, na tentativa de diminuir a dependência do petróleo estrangeiro. A criação do Programa Nacional do Álcool (PROALCOOL) foi uma das saídas encontradas pelo Brasil para reduzir a dependência do petróleo em nossa matriz energética. O programa incentivou o aperfeiçoamento dos processos industriais existentes na época que envolvia a produção do etanol etílico (VEIGA FILHO e RAMOS, 2006).

Para a fermentação e obtenção do etanol, pode-se empregar a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ou outras células microbianas, como as células do procarioto *Zymomonas mobilis* (ABUD, 2005; SILVA, *et al.*, 2010). Em comparação com a levedura, *Z. mobilis* apresenta via metabólica e condições de crescimento mais simples. A desvantagem de seu uso na fermentação é devido à faixa de substratos que este microrganismo pode utilizar, se restringindo a glicose, frutose e sacarose (MALVESSI, 2008). Além disto, ela pode propiciar baixo rendimento de etanol quando o meio for rico em sacarose, favorecendo a formação de metabólitos secundários indesejáveis, como sorbitol, levana, ácido acético e pequenas frações de alcoóis superiores (TANO e BUZATO, 2003; ALEGRE e WENDT, 2005).

Com o avanço das pesquisas e incentivos a busca de novos microrganismos, ou modificações destes pelo uso das ferramentas da biologia molecular, é questão de tempo para que avanços relacionados à obtenção de maiores quantidades em volume de etanol sejam alcançados.

Revisão da literatura

Em primeiro de junho de mil novecentos e trinta e três, através do Decreto do Governo Federal de nº 22789, foi criado o Instituto do Álcool e do Açúcar (IAA) com o intuito primordial de melhorar as condições da agroindústria açucareira nacional da época, resolvendo os problemas da produção excedente do açúcar e fomento do álcool combustível que era um entrave ao crescimento do setor agroindustrial. Para que essa meta fosse alcançada, o governo incentivou a modernização do setor sucroalcooleiro e a estabilização dos preços do açúcar (FERREIRA JR e HESPANHOL, 2006).

Na década de 70, houve outro grande incentivo à modernização do setor sucroalcooleiro, porém desta vez ela foi voltada a produção do etanol combustível devido à ocorrência da crise mundial do petróleo e a cogitação do risco eminente do esgotamento das fontes desse combustível não-renovável, prejudicando o suprimento mundial de petróleo. Isto forçou os países a buscarem novas fontes de matéria-prima para fins energéticos, com o intuito de reduzir a dependência do petróleo importado dos países árabes. Neste período, com a criação do Programa Nacional do Álcool (PROALCOOL), o Brasil encontrou a saída para a redução da dependência do petróleo estrangeiro ao explorar e aperfeiçoar os processos que envolviam a obtenção do etanol advindo da fermentação alcoólica do caldo extraído da cana-de-açúcar (TANO e BUZATO, 2001; CASOTTI *et al.*, 2007; FLEXOR, 2007; FONSECA e BRAGA, 2008). Desde então, o país desenvolveu suas técnicas agronômicas e industriais referente à

cultura de cana-de-açúcar, sempre aprimorando a qualidade do produto final: açúcar ou etanol (LORA, 2008; SANTOS, 2010).

Mercado do Etanol

Atualmente, o mercado do etanol combustível sofre incentivos devido às inovações das tecnologias do motor flex, que permitiram o uso de etanol, gasolina ou mistura dos dois combustíveis em qualquer proporção nos motores de milhões de carros em todo Brasil. Em 2011 a União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICA), publicou que o Grupo Magneti Marelli desenvolveu uma tecnologia inovadora que consiste em um sistema multicombustível direcionado ao setor aeronáutico, permitindo que este setor tenha os mesmos benefícios alcançados por 50% da frota leve de veículos do país.

Recentemente, o Brasil começou a investir em pesquisas voltadas ao etanol de segunda geração, aquele que é extraído da celulose. O Brasil possui vantagens comparativas na corrida pelo desenvolvimento do etanol de segunda geração, mesmo que este tipo de pesquisa ainda seja muito novo por aqui, pois possuímos enorme disponibilidade de matéria-prima barata, que é o bagaço pré-colhido, além de termos uma infraestrutura muito bem estabelecida na produção de etanol. O governo brasileiro busca ampliar a quantidade de etanol fabricada sem aumentar a área de plantio, o que aumentaria a competitividade do etanol de cana. Estudos realizados pelo Projeto Bioetanol, uma rede de pesquisa financiada pelo governo federal, concluiu que uma destilaria produz hoje 1 milhão de litros de etanol por dia do caldo oriundo da extração da cana-de-açúcar e, com o adicional estimado pelo rendimento da tecnologia de hidrólise, seria acrescentado mais 150 mil litros de etanol do bagaço (MARQUES, 2009).

Metabolismo e características da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

O microrganismo normalmente empregado em grande escala na indústria para a realização da fermentação, tanto do mosto de cana-de-açúcar, mosto de uva e fermentação de pães é a levedura ascomicética gemulante, *Saccharomyces cerevisiae* (MAMEDE e PASTORE, 2004; KUYPER *et al.*, 2005; RAVANELI *et al.*, 2006). Suas células são elípticas, medindo entre 6 a 8 mm de comprimento por 5 μm de largura (CARVALHO *et al.*, 2006), podendo apresentar tanto reprodução assexuada quanto sexuada. A forma de reprodução assexuada é realizada através da gemulação (brotamento). A nova célula brota e ocasiona uma protuberância na

levedura-mãe e após atingir certo tamanho, esse broto se desprende da mãe. Uma célula madura, durante sua vida, gera em média 24 células-filhas. Outra forma de reprodução é a esporulação, isso ocorre sexuadamente formando um organismo diplóide a partir da fusão de duas células haplóides de *Mating Type* oposto (*Mat a* e *Mat α*). O diplóide gerado em meio com baixo nível de nutrientes esporula e gera quatro esporos (tétrade), permitindo estudos sobre combinações genéticas, mutações e seleção (FRIGIERI, 2007).

A fermentação alcoólica, do ponto de vista bioquímico, é o processo que envolve a fermentação das moléculas de açúcares glicose e frutose em uma via catabólica localizada no interior das células microbianas até a formação de etanol e CO_2 com liberação de energia térmica. A via central do catabolismo da glicose é a glicólise, gerando como produto final o piruvato que pode seguir para o processo de respiração ou para outras vias metabólicas como a da fermentação alcoólica e láctica (LEHNINGER, 2002).

As leveduras produzem etanol a partir do piruvato em duas etapas. Na primeira etapa, ocorre a descarboxilação e formação de acetaldeído e CO_2, reação esta catalisada pela enzima piruvato descarboxilase (E.C. 4.1.1.1) e, na segunda etapa, o acetaldeído é reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase (E.C. 1.1.1.1). A enzima álcool desidrogenase, em princípio, pode catalisar a reação em duas direções, pois ela é codificada por dois genes e as enzimas por eles codificadas recebem o nome de *ADH1* e *ADH2*. A síntese de etanol é realizada pela *ADH1* e, somente no caso do esgotamento da glicose disponível no meio, ocorrerá a transcrição do gene da *ADH2* que oxidará o etanol do meio convertendo-o a acetaldeído. O acetaldeído é então convertido a acetato seguindo para o ciclo do ácido cítrico, conforme visualizado na Figura 1 (SILVA *et al.*, 2000; CUNHA, 2004; FRAGIORGE, 2006; SOUZA, 2006).

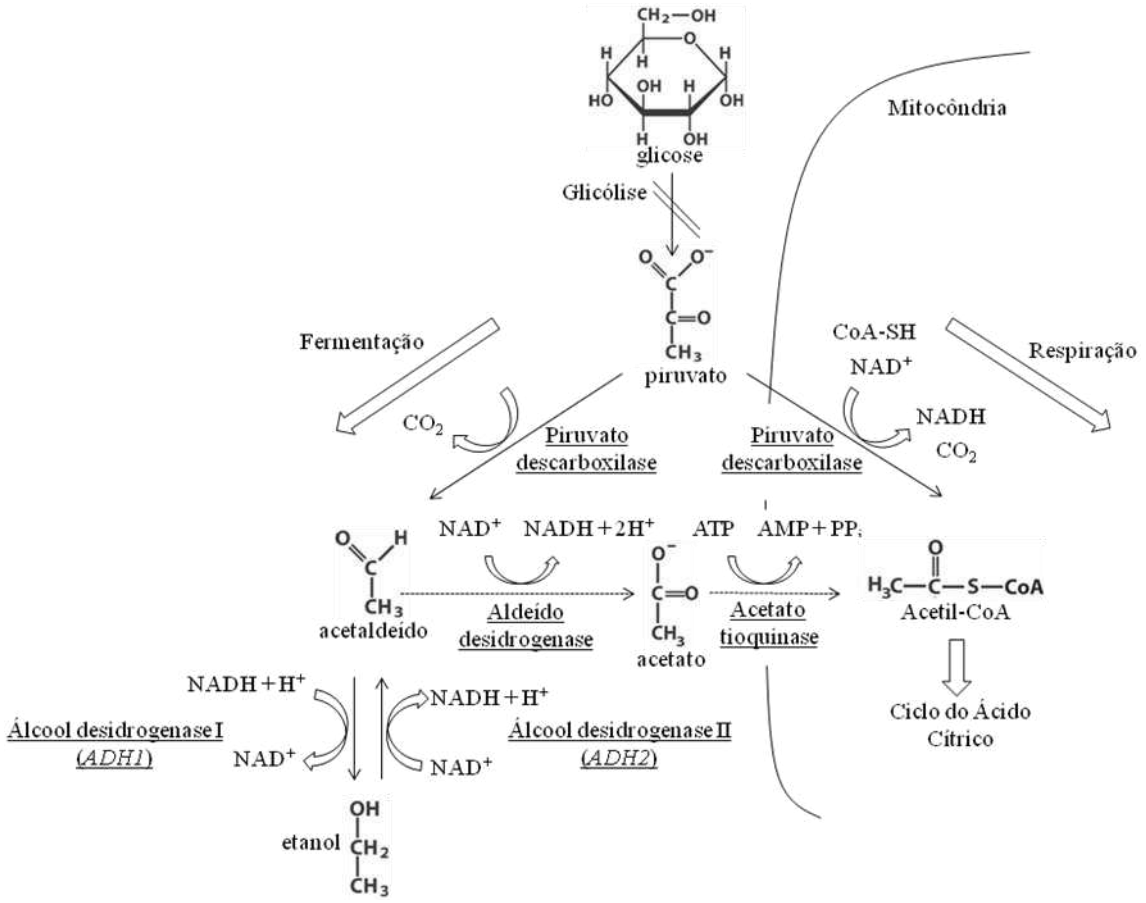

Figura 1. Representação esquemática da fermentação e da respiração. As vias ativas quando ocorre o esgotamento da glicose estão representadas pelas setas pontilhadas (oxidação do etanol), seguindo posteriormente para a via respiratória. Note que existe duas álcool desidrogenases (1 e 2), codificadas por genes diferentes (em itálico). Todas as enzimas da via estão sublinhadas (CUNHA, 2004, p. 5, adaptado).

Vantagens e desvantagens do uso de *S. cerevisiae*

As linhagens de leveduras foram sendo selecionadas conforme as características desejáveis do processo e produto final. Produtividade, eficiência da fermentação do caldo extraído da cana-de-açúcar, tolerância ao etanol e temperatura, resistência a altas concentrações de açúcares, floculação, produção de certos componentes aromatizantes de bebidas e capacidade de produzir metabólitos anti-contaminantes são fatores importantes de se observar em uma levedura (RIBEIRO e HORII, 1999).

S. cerevisiae é considerado um microrganismo modelo, biologicamente conhecido e de fácil manipulação. Do ponto de vista científico, estas características o tornam excelente para estudos experimentais na elaboração de cepas melhoradas. Como exemplo, pode-se citar a possibilidade do isolamento de novas proteínas e a posterior caracterização quanto a sua

funcionalidade com a ajuda de análises que envolvem a abordagem conhecida como bioinformática (SAFFI *et al*., 2001; QUEIROZ, 2002; PROSDOCIMI, 2007). Quanto às vantagens de manipulação, ele é muito empregado em diversos setores por atribuições como ser unicelular (diferente de outros eucariotos que são mais complexos), crescimento em meio definido o que favorece um completo controle sobre interferências físicas e químicas do ambiente além de possuir ciclo de vida ideal para a genética clássica, fator este que possibilitou a construção de um mapa detalhado do conjunto haplóide de seus 16 cromossomos (BUSSO, 2010).

Por ser muito bem estudada e caracterizada, *S. cerevisiae* é usada também como modelo nas indústrias durante a fabricação de etanol. No processo de moagem da cana-de-açúcar alguns cuidados devem ser tomados quanto à qualidade da matéria-prima, uma vez que a incidência de microrganismos provenientes do campo é muito alta e de difícil controle, pois estes sobrevivem ao processamento da cana e dos demais processos do tratamento e preparo do caldo extraído. Os fatores que permitem o desenvolvimento da levedura, bem como o de microrganismos contaminantes, são a presença de teores de nutrientes orgânicos e inorgânicos, alta atividade de água, pH, além da temperatura em que ocorre o processo de fermentação propriamente dito (CHERUBIN, 2003).

Durante o processo de fermentação, ocorre a inversão da sacarose aumentando a pressão osmótica sofrida pela levedura, fazendo com que ela deixe de produzir etanol e passe a produzir glicerol, o que interfere negativamente no rendimento de obtenção do etanol no final do processo fermentativo (DARÉ, 2008). A inversão da sacarose pode ser visualizada na FIG. 2.

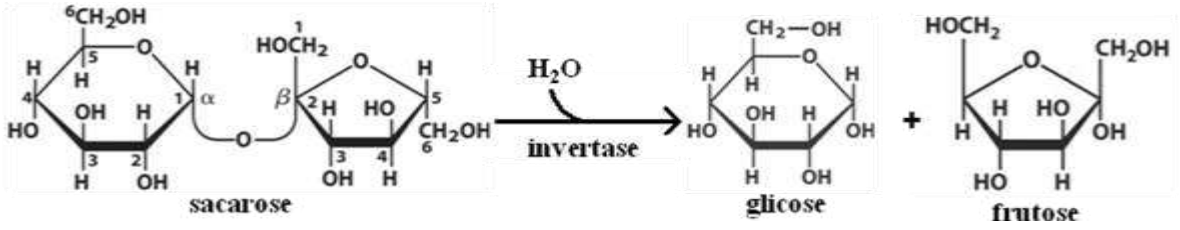

Figura 2. Reação catalisada pela enzima invertase em meio aquoso (MARTINS, 2009, p. 13, adaptado)

Outro agravante é o favorecimento da contaminação por outros microrganismos indesejáveis que utilizam a sacarose como substrato. A presença de contaminantes pode resultar em

prejuízos no processo devido ao consumo de açúcar, formação de goma, floculação do fermento, inibição e queda da viabilidade das leveduras devido às toxinas e ácidos orgânicos liberados no meio. Quando uma molécula de glicose é convertida em duas de ácido láctico, ocorre a queda no rendimento de duas moléculas de etanol (DÁRIO *et al.*, 2010; NAVES, *et al.*, 2010).

O nível elevado de contaminantes que sobrevivem aos processos industriais e que chegando à fase de fermentação, é apontado por estudos como o fator principal envolvendo perdas graduais do fermento inoculado no início da safra. Souza *et al.* (2010) avaliou o desempenho das leveduras incorporadas ao processo no início da safra com o programa LabView 8.5. No final da safra, constatou-se que as leveduras inicialmente inoculadas permaneciam por no máximo 45 dias no processo, decaindo para 20 dias em processos que ofereciam condições menos favorecidas. Para fins interpretativos, as dornas são usadas 2 vezes ao dia e em 210 dias de safras, 420 vezes.

Mesmo com os problemas apresentados pela contaminação, a levedura ainda é a mais utilizada, visto o seu rendimento fermentativo e fácil manuseio. Métodos envolvendo a melhora do processo fermentativo, qualidade da operação e da matéria-prima deve servir como fatores que contribuam para a redução da contaminação, que além de garantir maior longevidade das cepas selecionadas de *S. cerevisiae* no processo colaboram para um rendimento fermentativo dentro dos padrões estabelecidos.

Zymomonas mobilis: microrganismo alternativo à fermentação

Um processo fermentativo é admitido como adequado quando é registrado rendimentos entre 43 e 49% de etanol (BRINGHENTI *et al.*, 2007). Para a realização deste processo, não é comum encontrar na literatura outro microrganismo que apresente melhor desempenho que as leveduras na produção de etanol. Porém, *Z. mobilis* é um microrganismo que vem atraindo atenção especial dos pesquisadores por proporcionar altos rendimentos na produção de etanol, alcançando margens superiores a aquelas obtidas pelas leveduras. O interesse maior nesse microrganismo é pelo fato deste produzir etanol através de monossacarídeos como frutose e glicose (hexoses), obtidos da hidrólise de hemicelulose e celulose, além do seu baixo rendimento celular, alta tolerância a concentrações elevadas de açúcares, resistência a altas concentrações de etanol, formação de poucos produtos secundários e a possibilidade de uso

do caldo fermentado para o tratamento de doenças (ABUD, 2005; NETO *et al.*, 2005; CANILHA *et al.*, 2010).

Z. mobilis é uma bactéria gram-negativa, anaeróbia facultativa ou facultativa obrigatória, não esporulante ou formadora de cápsulas e que apresenta reprodução assexuada por divisão binária simples. O formato assumido por este microrganismo é tipicamente esférico, cilíndrico ou espiralado e, na sua forma cilíndrica, apresenta dimensões que variam entre 1 a 6 µm de comprimento e de 1 a 1,4 µm de diâmetro (SWINGS *et al.*, 1977; RANZAN, 2010).

As vantagens em se empregar este microrganismo na produção de etanol é por causa das altas taxas de consumo de glicose para a produção do etanol, rendimento produtivo de etanol próximo ao valor teórico máximo com baixa formação de biomassa e alta tolerância ao etanol excretado no meio. As desvantagens são baixa tolerância a sais e o fato de ser capaz de metabolizar somente 3 fontes de carbono: glicose, frutose e sacarose (SEVERO JR, 2008). Além disto, o rendimento de etanol pode ser diminuído quando o meio for rico em sacarose. Essa situação favorece a formação de metabólitos secundários indesejáveis, como sorbitol, levana, ácido acético e pequenas frações de alcoóis superiores (TANO e BUZATO, 2003; ALEGRE e WENDT, 2005).

Vias metabólicas e enzimas envolvidas no metabolismo de *Z. mobilis*

Durante a fermentação de açúcares fermentescíveis como glicose, frutose e sacarose, este microrganismo produz outros compostos além do etanol e, conforme o aumento da produção dos mesmos, o processo para obter etanol pode se tornar inviável. Esses três açúcares são metabolizados na mesma via bioquímica, a Entner-Doudoroff que é característica marcante desta bactéria, pois dentre as bactérias anaeróbicas somente ela utiliza esta via. Ainda, algumas reações que acontecem nesta via são comuns a via glicolítica. (RANZAN, 2010). Um esquema da via da Glicólise e da Entner-Doudoroff pode ser verificado na Figura 3.

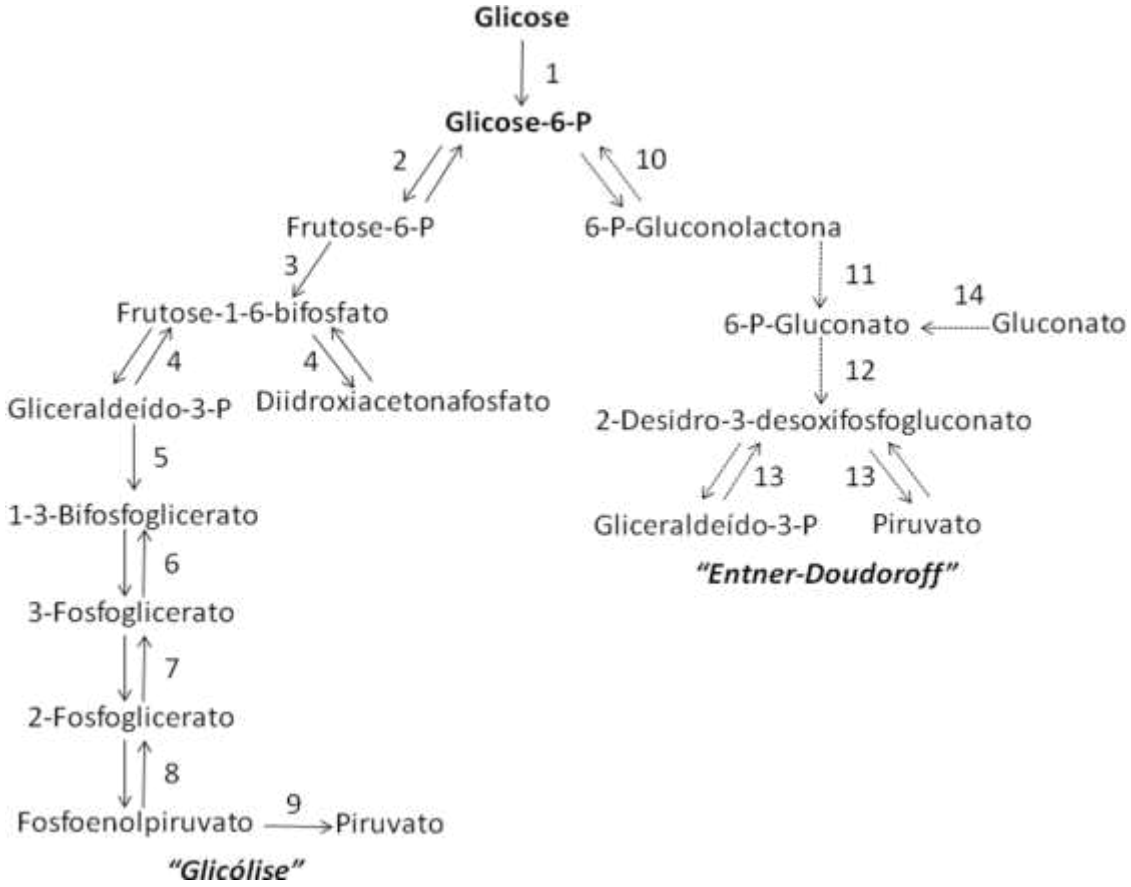

Figura 3. As setas que não possuem linha pontilhada representam a via da Glicólise, as que possuem linha pontilhada, representam a via Entner-Doudoroff. Os números representam as enzimas envolvidas nas respectivas vias e são identificadas na Tabela 1 (FACINCANI, 2002, p. 8, adaptado).

Tabela 1. Enzimas envolvidas nas vias glicolíticas da Glicólise e Entner-Doudoroff.

1 – glucoquinase (E.C. 2.1.12)	**8** – 2-fosfo-D-glicerato hidrolase (E.C. 4.2.1.11)
2 – fosfoglicose isomerase (E.C. 5.3.1.9)	**9** – piruvato quinase (E.C. 2.7.1.40)
3 – fosfofrutoquinase (E.C. 2.7.1.11)	**10** – glicose-6-fosfato desidrogenase (E.C. 1.1.1.49)
4 – frutose-1-6-bifosfato aldolase (E.C. 4.1.2.1.3)	**11** – 6-fosfogluconolactonase (E.C. 3.1.1.31)
5 – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (E.C. 1.2.1.1.2)	**12** – 6-fosfogluconato desidratase (E.C. 4.2.1.12)
6 – 3-fosfoglicerato quinase (E.C. 2.7.2.3)	**13** – 2-desidro-3-desoxifosfogluconato aldolase (E.C. 4.1.2.14)
7 – fosfoglicerato mutase (E.C. 5.4.2.1)	**14** – gluconoquinase (E.C. 2.7.1.12)

FONTE: adaptado de FACINCANI, 2002, p. 8.

A investigação do complexo enzimático *Z. mobilis* demonstrou que a sacarose é metabolizada a glicose e frutose pelas enzimas invertase (ou β-D-frutofuranosidase, E.C.3.2.1.26) e levanasacarase (E.C. 2.4.1.10) e ao serem convertidas, estas duas hexoses entram na célula por difusão facilitada ou são convertidas por oxirredução pela enzima GFOR (glicose-frutose oxirredutase, E.C. 1.1.1.99) a gliconolactona e sorbitol, respectivamente. A GFOR está localizada no periplasma e em seu sítio ativo está fortemente ligada ao seu cofator NADP(H) (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato), responsável pelo transporte de hidrogênio desta reação. Gliconolactona é convertida pela enzima periplásmica gliconolactonase (GL, E.C. 3.1.1.17) em ácido glicônico (gliconato) e, este é convertido em etanol e ácido acético. As enzimas GFOR e GL, constituem aproximadamente 20 a 30% das proteínas do periplasma dessa bactéria e a enzima GFOR se encontra presente somente no perisplasma da bactéria *Z. mobilis* sendo induzida preferencialmente por glicose (ERZINGER *et al.*, 2003; VIGNOLI *et al.* 2006; MARQUEZ, 2007; SEVERO JR, 2008; ERNANDES *et al.*, 2009; ERNANDES e GARCIA-CRUZ, 2009). A via metabólica da fermentação utilizando sacarose como substrato por *Z. mobilis* pode ser verificada na Figura 4.

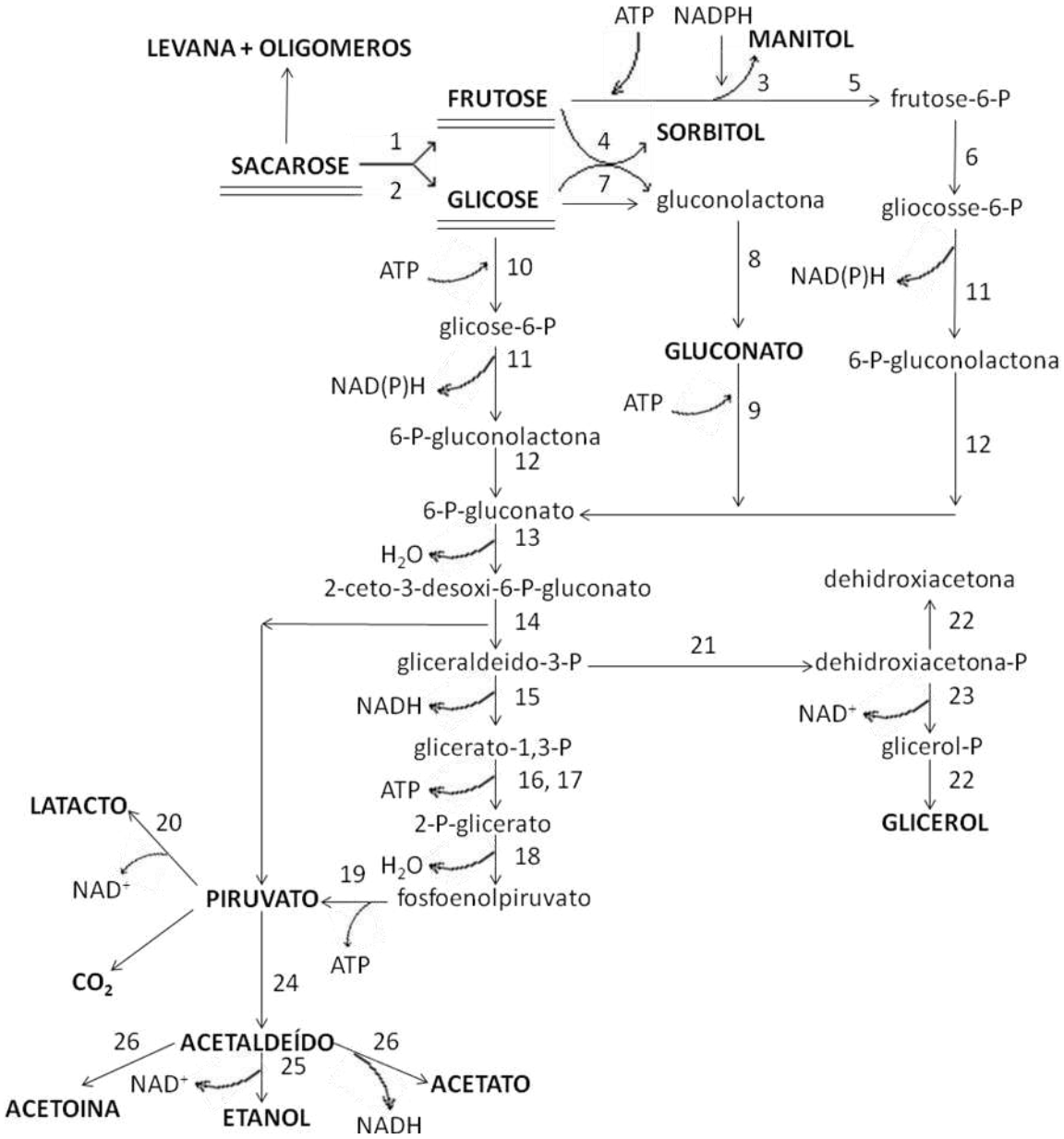

Figura 4. Vias metabólicas de formação de produtos da fermentação de carboidratos por *Z. mobilis*. As enzimas envolvidas que são representadas por números nessa via, estão identificadas na Tabela 2 (RANZAN, 2010).

Tabela 2. Enzimas envolvidas nas vias metabólicas de *Z. mobilis*

1. Levanasacarase (E.C. 2.4.1.10)	**14.** 2-ceto-3-desoxi-6-P gluconato aldolase (E.C. 4.1.2.14)
2. Invertase (E.C.3.2.1.26)	**15.** Gliceraldeído-P desidrogenase (E.C. 1.2.1.1.2)
3. Manitol desidrogenase (E.C. 1.1.1.67)	**16.** Fosfoglicerato quinase (E.C. 2.7.2.3)
4. Glicose-frutose oxirredutase (E.C. 1.1.1.99)	**17.** Fosfoglicerato mutase (E.C. 5.4.2.1)
5. Frutoquinase (E.C. 2.7.1.4)	**18.** Enolase (E.C. 4.2.1.11)
6. Glicose-6-P isomerase (E.C. 5.3.1.9)	**19.** Piruvato quinase (E.C. 2.7.1.40)
7. Glicose desidrogenase (E.C. 1.1.1.118)	**20.** Lactato desidrogenase (E.C. 1.1.1.27)
8. Gluconolactonase (E.C. 3.1.1.17)	**21.** Triose-P isomerase (E.C. 5.3.1.1)
9. Gluconato quinase (E.C. 2.7.1.12)	**22.** Fosfatase (E.C. 3.1.3.1)
10. Glucoquinase (E.C.2.1.12)	**23.** Glicerol-P desidrogenase (E.C. 1.1.1.8)
11. Glicose-6-P desidrogenase (E.C. 1.1.1.49)	**24.** Fosfatase (E.C. 3.1.3.2)
12. 6-P-gluconolactonase (E.C. 3.1.1.31)	**25.** Piruvato descarboxilase (E.C. 1.2.4.1)
13. 6-P-gluconato desidrogenase (E.C. 4.2.1.12)	**26.** Álcool desidrogenase (E.C. 1.1.1.1)

FONTE: adaptado de RANZAN, 2010, p. 151.

O metabolismo de *Z. mobilis* chama a atenção por causa de seu balanço energético que resulta na formação de uma molécula de ATP por glicose, equivalente a metade que *S. cerevisiae* produz, garantindo assim maior rendimento na produção de etanol e baixa produção de biomassa (SEVERO JR, 2008).

Viikari (1988) ressalta que utilizando glicose como fonte de carbono, a produção de etanol representava 95% do valor máximo teórico, havendo a formação de outros produtos como acetoína, acetaldeído, glicerol, ácido acético e ácido lático, porém em pequenas concentrações. Com a utilização de sacarose ou frutose como fonte de carbono o rendimento de etanol diminui. O mesmo autor destaca que utilizando frutose como substrato o rendimento fica em aproximadamente 90% do valor máximo teórico, havendo a formação dos mesmos subprodutos observados na utilização da glicose, além de formar também diidroxiacetona e

manitol. Com o uso de sacarose o rendimento diminui ainda mais ficando por volta de 75-80% do valor máximo teórico. Porém, com o uso de sacarose são formados como subprodutos principalmente sorbitol e levana.

Devido a alto rendimento gerado pela utilização de glicose, *Z. mobilis* seria um organismo muito interessante na obtenção de etanol de segunda geração utilizando produtos da hidrólise de hemicelulose e celulose.

Produção de etanol e fatores envolvidos

Quanto à produção de etanol, *Z. mobilis* pode produzir mais que 1,9 mol de etanol por mol de glicose com velocidade entre três a quatro vezes superior a *S. cereviseae*, sendo portanto avaliada em atributos tecnológicos como uma ótima opção para a realização do processo fermentativo no setor sucroalcooleiro. Além da produção de etanol é obtido também 1,8 mol de CO_2 e 0,053 mol de lactato. Como dito anteriormente, a eficiência na conversão de glicose em etanol por este microrganismo é maior que 95% do valor teórico máximo, resultado este devido a uma modificação em sua via metabólica Entner Doudoroff (ERNANDES e GARCIA-CRUZ, 2009). A membrana plasmática de *Z. mobilis* é rica em lipídeos e essa riqueza é relacionada com sua resistência acentuada a concentração de etanol. Atribui-se dois mecanismos para explicar esta resistência, onde o primeiro está envolvido com os altos níveis de lipídeos cíclicos da membrana desta bactéria e, o segundo, é relacionado com a associação dos fosfoslipídeos de membrana a elevada quantidade de ácido cis-vacênico (TANO *et al.*, 2000).

S. cerevisiae, metaboliza glicose gerando ao final do processo etanol, gás carbônico (CO_2). Durante o metabolismo primário das hexoses, ou seja, monossacarídeos constituídos por 6 carbonos (glicose), apresenta rendimento estequiométrico de 0,511 g de etanol (aproximadamente 2,0 mol de etanol por mol de glicose) por grama de hexose e um rendimento que nunca excede 90 a 93% (SOUZA, 2005). Durante as reações secundárias, resultam em redução do rendimento teórico devido a presença de fibras, gomas, leveduras selvagens, dentre outros, afetando em 90% o rendimento industrial (DIEHL, 2009). Ao passo que a fermentação ocorre, o produto da fermentação (etanol) passa a ocasionar estresse na levedura. Os fenômenos de interesse relacionados a este fato ocorrem a partir da concentração de 15 g/L, onde se observa efeito inibitório na reprodução celular e, ao atingir 112 g/L, as células não apresentam reprodução. O substrato também pode ocasionar inibição, porém este

é mais tóxico quando comparada com a inibição pelo produto, por causa da inativação de algumas enzimas de vital importância e alteração na rota metabólica Este efeito inibitório é relatado em concentrações superiores a 150 g/L (PORTO, 2005; CAMÊLO, 2009).

Em estudos que envolvam a substituição de um microrganismo por outro é de extrema importância estimar parâmetros como pH, temperatura e composição do meio fermentativo, pois estes dados serão muito importantes quando se avaliar uma maior ou menor produção de etanol. Em seus estudo, Ernandes *et al.* (2010) avaliou outras variáveis além das 3 anteriormente citadas. Ele estudou e registrou a influência na produção de etanol pelo microrganismo *Z. mobilis* quanto as variações nas concentrações de sacarose, KCl, K_2SO_4, $MgSO_4$ e $CaCl_2$. Houve influencia positiva entre a interação de pH e KCl; pH e $CaCl_2$; pH e teor de sólidos totais na produção de etanol. Somente K_2SO_4 afetou significativamente ($p < 0,05$) a produção de etanol quando estudada de forma independente. Da combinação das variáveis, registrou-se uma produção de etanol de 8,89 mg/mL. Também relataram neste trabalho que este microrganismo é um forte concorrente para as leveduras por requerer condições simples para o seu crescimento e possuir tolerância a meios concentrados em açúcares e etanol, porém sua limitação é a pequena faixa de substratos que ele utiliza no processo fermentativo.

As cepas de *Z. mobilis* possuem características incomuns como sobreviver a pH muito ácido, situados entre 3,5 a 4 e a capacidade em sobreviver em meios contendo até 10% de etanol e temperaturas em torno de 30ºC, características essas que são incomuns entre as bactérias. As bactérias do gênero *Zymomonas* tem alta tolerância à concentrações de glicose, crescendo em meio com 20% de glicose e outras em até 40%. Ressalta-se que bactérias acéticas são hábeis a crescer em pH 4 e 4,5 e meios com 20% de glicose, apresentando crescimento rápido em meio com 50% de glicose. (SEVERO JR, 2008).

Metabólitos indesejáveis à fermentação utilizando sacarose como substrato: Sorbitol e Levana

Sorbitol é um poliol da família dos álcoois poli-hídricos, sendo utilizado na indústria alimentícia. Devido a sua capacidade em reter umidade, é muito utilizado como um agente umectante, mantendo os alimentos frescos por mais tempo, sendo usado ainda como espessante, edulcorante, inibidor de cristalização, plastificante, anticongelante (reduz o ponto de congelamento) e crioprotetor. Ele também é um açúcar abundantemente encontrado em

vegetais superiores (LEITE, 2003; RICHTER e LANNES, 2007; PRATES e ASCHERI, 2010). Quanto ao problema da alta produção de sorbitol durante a fermentação, Barros e Celligoi (2006) relatou que quando ocorre o tratamento prévio do meio açucarado promovendo a inversão da sacarose, ocorre uma queda na produção deste composto de 60,4 g/L para 19,14 g/L em uma concentração de 300 g/L de sacarose.

Vignoli *et al.* (2006) avaliou a produção de sorbitol em relação a concentração de substrato e tempo de fermentação. Eles relataram que a concentração de sacarose no meio não influenciou a produção de sorbitol, porém quando a variável foi o tempo de cultivo, observou-se o aumento na produção de sorbitol. Em comparação com outros estudos, onde a concentração de 650 g/L de açúcares compreendidos em glicose e frutose foram suficientes para ocasionar a produção do osmoprotetor sorbitol, eles concluíram que a faixa escolhida por eles na adição de sacarose no meio (200 g/L) não estava dentro da concentração que influenciaria a produção deste osmoprotetor. O tempo maior de fermentação foi de 36 horas e a concentração de sorbitol foi de 50 g/L. Ao relacionar estes dados com a atividade da enzima GFOR, pode-se concluir que a concentração de 200 g/L de sacarose não foi suficiente para ativar a conversão eficiente de frutose em sorbitol pela enzima GFOR na via metabólica de *Z. mobilis*. Provavelmente, a frutose deve ter sido utilizada na via de formação de etanol. Este é um ponto interessante a considerar, uma vez que a concentração de sacarose utilizada neste experimento pode levar a menos formação de sorbitol e maior rendimento de etanol.

Levana apresenta alta massa molecular e é constituída por unidades de frutose ligadas por ligações β(2→6) produzidas durante reação de transfrutosilação, com o auxílio da enzima levanasacarase extracelular. Na indústria de alimentos a levana é utilizada como fixador de cores e sabores, espessante e estabilizante em géis para sobremesas, em temperos prontos para salada, pudins, sorvetes e derivados do leite, além de atuar como agente hipocolesterolêmico e anticarcinogênico no organismo humano (ERNANDES e GARCIA-CRUZ, 2005). Tano e Buzato (2002) relatam que existe uma relação direta entre a taxa de formação de levana e o pH. Durante o cultivo de 48 horas de *Z. mobilis*, foi quantificado as porcentagens iniciais de levana e suas concentrações finais nos pH 5.4, 5.9 e 6.3, sendo obtidos, respectivamente, os valores de 1,09, 1,68 e 2,52% e 1.66, 2.54 e 3.83 g/L.

Conclusão

Com a intensificação nas pesquisas que visam transformar os resíduos agroindustriais em etanol de segunda geração, *Z. mobilis* parece ser um microrganismo viável para a fermentação do hidrolisado obtido desses resíduos, dentre eles o bagaço de cana-de-açúcar (TAYLOR *et al.*, 2009). A sacarificação enzimática ou ácida libera os substratos necessários para a realização da fermentação por este microrganismo, sendo assim, trabalhos futuros devem estudar mais detalhadamente fatores relacionados quanto aos rendimentos e possíveis soluções que possibilitem melhores condições na condução da fermentação alcoólica (GUILMAN *et al.*, 2000).

Outro fator que deve ser verificado é a questão do melhoramento genético deste microrganismo, assim como aquele ocorrido com as células de *S. cerevisiae*, buscando o desenvolvimento de cepas promissoras que poderão competir com as células de leveduras nas indústrias sucroalcooleiras. Podemos concluir também, que as pesquisas que envolvem a otimização de variáveis combinadas, como pH, temperatura, nutrientes orgânicos e inorgânicos, devem ser melhor compreendidas e divulgadas, com o intuito de estabelecer uma padronização eficaz em que *Z. mobilis* possa realizar o processo sob condições ideais.

Referências

ABUD, A. K .S. **Estudo do controle de qualidade do processo de produção de L-asparaginase por *Zymomonas mobilis*.** Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE. , Rio de Janeiro, RJ, 2005.

ALEGRE, R. M.; WENDT, R. Levan production by isolated mutants of *Zymomonas mobilis*. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v.7, n.1, jan./jun., 2005

BARROS, M.; CELLIGOI, M.A.P.C. Synthesis of by *Zymomonas mobilis* under high osmotic pressure. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, 2006.

BRINGHENTI, L., CABELLO, C.; URBANO, L.H. Fermentação alcoólica de substrato amiláceo hidrolisado enriquecido com melaço de cana. **Ciência e Agrotecnologia.**, Lavras, v.31, n.2, mar./abr., 2007.

BUSSO, C. **Caracterização funcional da proteína Coq10p de *Saccharomyces cerevisiae* na atividade respiratória da coenzima Q.** Tese (Doutor em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2010.

CAMÊLO, A. C. R. **Investigação do comportamento dinâmico na produção contínua de etanol por *Zymomonas mobilis*.** Tese (Doutor em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, RJ, 2009.

CANILHA, L.; MILAGRES, A. M. F.; SILVA, S. S.; SILVA, J. B. A.; FELIPE, M. G. A.; ROCHA, G. J. M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrolise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de "desconstrução" da fibra vegetal. **Revista Analytica**, n.44, dez.-jan., 2009/2010.

CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; ALMEIDA e SILVA, J. B. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1ª parte – as leveduras. **Revista Analytica**, n.25, out./nov., 2006.

CASOTTI, J. F.; CAMILIOS NETO, D.; BRUZON, G.; MACHADO, R. A. M.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C. Uso de matérias da agroindústria – garapa e extrato de levedura – na produção de asparaginase por *Zymomonas mobilis* CP4. **Ciências Agrárias**, Londrina, v.28, n.4, out./dez., 2007.

CHERUBIN, R. A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica.** Tese (Doutor em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, 2003.

CUNHA, A. F. **Construção de floculantes condicionais de *Saccharomyces cerevisiae* para aplicações industriais.** Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, p. 5, 2004.

DARÉ, R. M. **Avaliação de coeficientes de rendimento e modelagem do processo fermentativo de produção de etanol.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2008.

DÁRIO, M. G.; SANTO, J. C. A. E.; SCHLOGL, P. S.; DURVAL, E. H.; MÜLLER, G.; MACHADO, L. O., TRICHEZ, D.; ALVES JR, S. L.; STAMBUK, B. U. A engenharia genética de leveduras como propulsora da otimização da fermentação de sacarose. **ALCOOLbrás**, n. 127, ano XII, 2010.

DIEHL, F. C. **Análise, controle e otimização operacional de um reator de *Zymomonas mobilis* com multiplicidade de equilíbrios.** Dissertação (Mestre em Engenharia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2009.

ERNANDES, F. M. P. G. e GARCIA-CRUZ, C. H. *Zymomonas mobilis:* um microrganismo promissor para a fermentação alcoólica. **Ciências Agrárias**, Londrina, v.30, n.2, abr./jun., 2009.

ERNANDES, F. M. P. G. **Utilização de diferentes substratos para a produção de etanol, levana e sorbitol por *Zymomonas mobilis.*** Tese (Doutor em Engenharia e Ciência dos Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, 2009.

ERNANDES, F. M. P. G.; BOSCOLO, M.; GARCIA-CRUZ, C. H. Influência da composição do meio para a produção de etanol, por *Zymomonas mobilis*. **Acta Scientiarum. Technology**, Maringá, v.32, n.1, 2010.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Levana bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção. **Ciências Agrárias**, Londrina, v.26, n.1, jan./mar., 2005.

ERZINGER, G. S.; SILVEIRA, M. M.; COSTA, J. P. C. L.; VITOLO, M.; JONAS, R. Activity of glucose-fructose oxidoredutase in fresh and permeabilised cells of *Zymomonas mobilis* grown in different glucose concentrations. **Brazilian Journal of Microbiology,** v. 34, 2003.

FACINCANI, A. P. **Estudo de isoenzimas do metabolismo de carboidratos e clonagem e expressão e expressão da enolase de *Xylella fastidiosa*.** Dissertação (Mestre em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, p. 8, 2002.

FERREIRA JR, A. C.; HESPANHOL, A. N. Os efeitos das políticas voltadas ao setor sucroalcooleiro no estado de São Paulo. **Geografia em Atos**, n.6, v.1, Presidente Prudente, dez., 2006.

FLEXOR, G. A conturbada trajetória do álcool combustível no Brasil e seus desafios atuais. **Observatório de Políticas Públicas para a Agricultura**, n.2, jun., 2007.

FONSECA, V. M.; BRAGA, S. R. Para além da geopolítica do etanol – novos discursos e velhas práticas do setor canavieiro no Brasil. **Revista Pegada**, v.9, n.1, jun., 2008.

FRAGIORGE, E. J. **Avaliação genotóxica de herbicidas imidazolinonas em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.** Tese (Doutorado em Genética Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2006.

FRIGIERI, M. C. **Análise da interação funcional entre as proteínas eIF5A e Ypt1 em *S. cerevisiae*.** Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2007.

GUILMAN, F.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C. Comparação da produção de etanol por *Zymomonas mobilis* em meio de melaço de cana-de-açúcar puro e pré-tratado com invertase. **Ciencias Biológicas e da Saúde**, Londrina, v.20/21, n.2, jun., 1999-2000.

KUYPER, M.; TOIRKENS, M. J.; DIDERICH, J. A.; WINKLER, A. A.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. K. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Federation of European Microbiological Societies**, v.5; 925-934, 2005.

LEHNINGER, A. L. **Lehninger princípios de bioquímica.** São Paulo, 3.ed, 2002.
LEITE, V. M. Absorção e translocação de boro em cafeeiro – uma revisão. **Revista Eletrônica Agronomia**, 2ª ed., n.4, dez., 2003.

LORA, B. A. **Potencial de geração de créditos de carbono e perspectiva de modernização do setor sucroalcooleiro do estado de São Paulo através do mecanismo de desenvolvimento limpo.** Dissertação (Mestre em Energia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2008.

MALVESSI, E. **Produção de sorbitol e ácidos orgânicos por *Zymomonas mobilis*.** Tese (Doutor em Ciências) – Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, Porto Alegre, RS, 2008.

MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. Avaliação da produção dos compostos majoritários da fermentação de mosto de uva por leveduras isoladas da região da "Serra Gaúcha" (RS). **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.3, 453-458, jul./set., 2004.

MARQUES, F. **O alvo é o bagaço.** Pesquisa FAPESP, 2009. Disponível em: <http://revistapesquisa.fapesp.br/?art=3934&bd=1&pg=3&lg=>. Acessado em: 17 jun. 2011.
MARQUEZ, L. D. S. **Produção de açúcar invertido pelo uso de invertase imobilizada em resinas.** Dissertação (Mestre em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, SP, 2007.

MARTINS, C. A. P. **Avaliação do efeito do inoculo e do perfil de alimentação do mosto na produção em escala piloto e industrial de etanol.** Dissertação (Mestre em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, p. 13, 2009.

NAVES, R. F.; FERNANDES, F. S.; PINTO, O. G.; NAVES, P. L. F. Contaminação microbiana nas etapas de processamento e sua influência no rendimento fermentativo em usina alcooleira. **Enciclopédia biosfera**, Goiânia, v.6, n.11, 2010.

NETO, D. C.; BUZATO, CELLIGOI, M. A. P. C.; OLIVEIRA, M. R. **Ciências Exatas e Tecnológica**, Londrina, v.26, n.1, jan./jun., 2005.

PORTO, L. M. **Modelagem de processo industrial de fermentação alcoólica contínua com reatores de mistura ligados em série.** Tese (Doutor em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2005.

PRATES, M. F. O.; ASCHERI, D. P. R. Secagem de soluções filmogênicas de amido de fruta-de-lobo (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) e propriedades físicas dos filmes em função do plastificante e da temperatura. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.28, n.2, jul/dez., 2010.

PROSDOCIMI, F. **Introdução a bioinformática.** Curso on-line, 2007. Disponível em: < http://biotec.icb.ufmg.br/chicopros/FProsdocimi07_CursoBioinfo.pdf>. Acessado em: 7 mar. 2011.

QUEIROZ, A. **Apostila de bioinformática.** Disciplina de bioinformática. 2002. Disponível em: <http://genfis20.esalq.usp.br:8008/web/downloads/introducao_a_bioinformatica.pdf>. Acessado em: 7 mar. 2011.

RANZAN, C. **Fermentação contínua de *Zymomonas mobilis*: modelagem, ajuste de parâmetros e inferências a partir do consumo de hidróxido de sódio.** Dissertação (Meste em Engenharia) Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, p. 151, 2010.

RAVANELI, G. C.; MADALENO, L. L.; PRESOTTI, L. E.; MUTTON, M. A.; MUTTON, M. J. R. Spittlebug infestation in sugarcane affects ethanolic fermentation. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.63, n.6, nov./dec., 2006.

RIBEIRO, C. A. F; HORII, J. Potencialidade de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para fermentação do caldo de cana. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.56, n.2, 1999.

RICHTER, M.; LANNES, S. C. S. Ingredientes usados na indústria de chocolates. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.3, jul./set., 2007.

SAFFI, J.; REVERS, L. F.; HENRIQUES, J. A. P. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.21, jul./ago., 2001.

SANTOS, L. Doce e amargo açúcar: concentração de renda e relações de trabalho na produção agroindustrial canavieira do Brasil. **Revista Crase.edu**, v.1, n.1, 2010.

SEVERO JR, J.B. **Síntese biocatalítica do sorbitol e ácido lactobiônico com separação simultânea por eletrodiálise.** Dissertação (Mestre em Ciências em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2008.

SILVA, C. G. M.; STAMFORD, T. L. M.; ANDRADE, S. A. C.; SOUZA, E. L.; ARAÚJO, J. M. Production of ethanol from mesquite (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.) pods mash by *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v.13, sept., 2010.

SILVA, E. A. A.; VON PINHO, E. V. R.; VIEIRA, M. G. G. C.; CARVALHO, M. L. M.; MACHADO, J. C. Alterações dos padrões de isoenzimas em sementes de milho infectadas por fungos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.9, Brasília, sept., 2000.

SOUZA, D. P. **Avaliação de aditivos químicos e microbianos como inibidores da síntese de etanol em silagens de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.).** Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, 2006.

SOUZA, M. V. F. **Interação de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus fermentum* na produção de cachaça artesanal.** Dissertação (Mestre em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2005.

SOUZA, M. A. C.; GALVÃO, C. M. A.; ATALA, D. I. P. Modelagem e simulação da dinâmica populacional de leveduras nas dornas de fermentação do processo de produção de bioetanol. **ALCOOLbrás**, n.127, 2010.

SWINGS, J.; de LEY, J. The biology of *Zymomonas*. **American Society for Microbiology**, v.41, n.1, 1977.

TANO, M. S.; BUZATO, J. B. Effect of the presence of initial ethanol on ethanol production in sugar cane juice fermented by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, 242-244, 2003.

TANO, M. S.; BUZATO, J. B. Fermentação contínua usando baixa concentração de açúcar da cana e *Zymomonas mobilis* CP4 para produção de etanol. **Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v.22, dez., 2001.

TANO, M. S.; BUZATO, J. B. Influência do pH inicial do caldo de cana-de-açúcar na produção de levana por *Zymomonas mobilis* ATCC 31821. **Ciências Exatas e Tecnológica**, Londrina, v.23, n.1, dez., 2002.

TANO, M. S.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C. Sugar cane juice fermentation by *Zymomonas mobilis* CP4 subjected to inhibition by ethanol and high initial concentration of substrate. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, apr., 2000.

TAYLOR, M. P.; ELEY, K. L.; MARTIN, S.; TUFFIN, M. I.; BURTON, S. G.; COWAN, D. A. Thermophilic ethanologenesis: future prospects for second-generation bioethanol production. **Trends in Biotechnology**, v.27, n.7, may., 2009.

UNICA – UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Tecnologia flex para aviões a pistão promete reduzir custos e emissões de CO_2.** 2011. Disponível em: < http://www.unica.com.br/noticias/show.asp?nwsCode=%7B0840B689-20DF-44AD-A55F-341E5E1E642B%7D>. Acessado em: 4 mar. 2011.

VEIGA FILHO, A. A.; RAMOS, F. Proálcool e evidências de concentração na produção e processamento de cana-de-açúcar. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.36, n.7, 2006.

VIGNOLI, J. A.; CELLIGOI, M. A. C.; SILVA, R. S. F.; BARROS, M. The production of sorbitol by permeabilized and immobilized cells of *Zymomonas mobilis* in sucrose. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, n.4, jul., 2006.

VIGNOLI, J. A.; CELLIGOI, M. A. P. C.; SILVA, R. S. F. Development of a statistical model for sorbitol production by free and immobilized *Zymomonas mobilis* in loofa sponge *Luffa cylindrical*. **Process Biochemistry**, v.41, jun., 2006.

VIIKARI, L. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis.* **Critical Reviews in Biotechnology,** v.7, n.3, jan, 1988.