

Pires, Renata Trindade

P667p Produção de etanol utilizando a bactéria *Zymomonas mobilis* / Renata Trindade Pires. — Jaboticabal : Fatec, 2010.

58f.

Orientador: Profa. Mariana Carina Frigieri

Trabalho (graduação) – Apresentado ao Curso de Tecnologia em Biocombustíveis, Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, 2010.

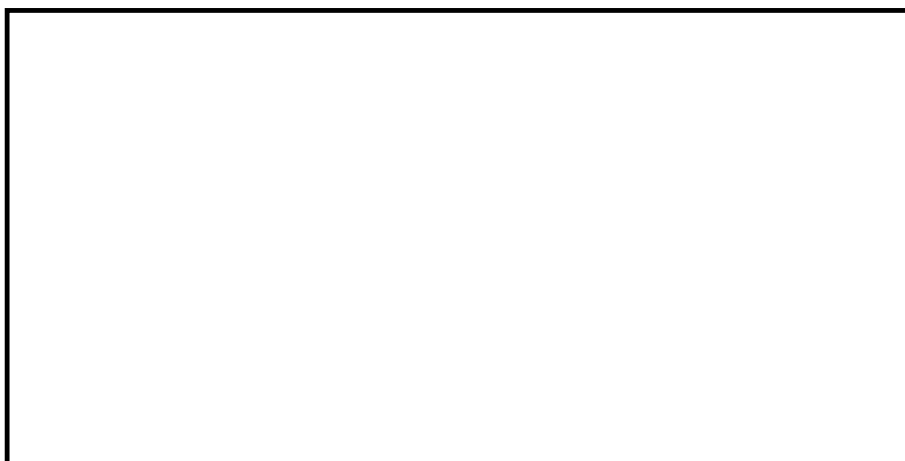
1. *Zymomonas mobilis*. 2. Fermentação. 3. Etanol. 4. *Saccharomyces cerevisiae*. I. Frigieri, Mariana Carina. II. Título.

CDU 662.6

**CENTRO ESTADUAL DE EDUCAÇÃO  
TECNOLÓGICA PAULA SOUZA**

**FACULDADE DE TECNOLOGIA DE JABOTICABAL**

**Curso de Tecnologia em Biocombustíveis**



**Jaboticabal – SP**

**CENTRO ESTADUAL DE EDUCAÇÃO  
TECNOLÓGICA PAULA SOUZA**

**FACULDADE DE TECNOLOGIA DE JABOTICABAL**

**Curso de Tecnologia em Biocombustíveis**

**PRODUÇÃO DE ETANOL  
UTILIZANDO A BACTÉRIA  
*Zymomonas mobilis***

**RENATA TRINDADE PIRES**

**Orientadora: Mariana Carina Frigieri**

**Trabalho apresentado a Faculdade de  
Tecnologia de Jaboticabal - Fatec, para  
obtenção do título de Tecnóloga em  
Biocombustíveis.**

**Jaboticabal – SP  
2º Semestre/2010**

**CENTRO ESTADUAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA PAULA SOUZA**

**Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal**

**Curso de Tecnologia em Biocombustíveis**

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

Título do Trabalho:

Autor(a):

Orientador(a):

Co-orientador(a):

Local de realização do TG (Departamento, Faculdade, Instituição):

Data da Defesa: ...../...../..... .

Aprovado Reprovado

Nome e assinatura da Banca Examinadora:

Prof<sup>(a)</sup> Dr.<sup>(a)</sup>.....

(Nome do presidente da banca)

Prof<sup>(a)</sup> Dr.<sup>(a)</sup>.....

(Nome do membro da banca)

Prof<sup>(a)</sup> Dr.<sup>(a)</sup>.....

(Nome do membro da banca)

Aprovado pelo CETG-FATEC em:...../...../.....

---

Assinatura do Coordenador do Curso

Sonhe com aquilo que você quiser.  
Seja o que você quer ser,  
Porquê você possui apenas uma vida  
E nela só se tem uma chance  
De fazer aquilo que quer[...]  
Clarice Lispector

**OFEREÇO**

A minha família por estar ao meu lado sempre me apoiando, ao meu namorado Henrique por sua dedicação e paciência e a Prof.<sup>a</sup> Mariana Carina Frigieri.

**DEDICO**

Ao meu pai Luís Antônio Pires *in memoriam*, por ter sido um grande homem e pela falta que faz em minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, pela minha existência.

A minha mãe Gilda, por ter o papel de pai e mãe em minha vida e desempenhá-lo tão bem e meu irmão Fábio pelo apoio.

Ao meu namorado Henrique por seu amor, carinho apoio e compreensão em todos os momentos.

A amiga e Prof<sup>a</sup> Mariana Carina Frigieri, pela dedicação e orientação.

A todos os professores e funcionários da FATEC, por nos auxiliar em momentos de dúvidas.

A FCAV UNESP Câmpus de Jaboticabal pela infraestrutura disponibilizada.

Ao Geraldo Alves de Oliveira e sua família, por me acolherem como parte desta e pela oportunidade de estágio.

A todos os companheiros da Usina Vale do Paraná, principalmente ao César e a Kelly, por ensinarem na prática as técnicas utilizadas em uma indústria.

Aos amigos que conquistei no curso de graduação e que serão lembrados ao longo de minha vida, em especial a Jackeline Garcia Delafiori Makino, Juliana Pelegrino Roviero, Taciana Oliva Factore e Thays Bizari pela companhia e presença ao decorrer desses três anos.

Ao Aylan Kener Meneghine por sua dedicação e disponibilidade em ajudar toda a turma.

A todos os amigos que passaram em minha vida e que mesmo distantes, não deixaram de ser inesquecíveis.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS .....	IX
LISTA DE TABELAS .....	X
RESUMO .....	XI
ABSTRACT .....	XII
1. INTRODUÇÃO .....	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 Gerais.....	15
2.2 Específicos.....	15
3. A CANA-DE-AÇÚCAR.....	16
3.1 História da cana-de-açúcar .....	16
3.2 Botânica.....	18
4. A IMPORTÂNCIA DO ETANOL EM COMPARAÇÃO AO COMBUSTÍVEL FÓSSIL, COMO FONTE RENOVÁVEL E MENOS POLUENTE (BALANÇO DE CARBONO).....	20
4.1 Participação do Brasil no mercado de créditos de carbono.....	24
5. DIFERENÇAS FISIOLÓGICAS E MORFOLÓGICAS ENTRE BACTÉRIAS E LEVEDURAS.....	28
6. O PROCESSO FERMENTATIVO DAS BACTÉRIAS .....	31
6.1 Conceito de energia e fermentação alcoólica.....	31
6.2 Processo fermentativo .....	35
7. VANTAGENS E DESVANTAGENS DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA UTILIZANDO A BACTÉRIA <i>Zymomonas mobilis</i> EM RELAÇÃO À FERMENTAÇÃO TRADICIONAL UTILIZANDO LEVEDURAS.....	42
8. CONCLUSÃO .....	48
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

a.C. – antes de Cristo

ATP - Trifosfato de Adenosina

CER - Certificados de Emissões Reduzidas

CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

MDL – Mecanismo de Desenvolvimento Limpo

ONU - Organização das Nações Unidas

ppm – parte por milhão

UNFCCC - United Nations Framework Convention on Climate Change

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Metodologia da Linha de Base .....	26
Figura 2 - Catabolismo da glicose.....	34
Figura 3 - Metabolismo dos carboidratos em <i>Zymomonas mobilis</i> . ....	37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Gases do Efeito Estufa – GHG.....	21
<b>Tabela 2.</b> Diferentes linhagens de <i>Zymomonas mobilis</i> encontradas em vários países e o pesquisador responsável pelo seu isolamento. ....	33
<b>Tabela 3.</b> Porcentagem de crescimento de linhagens de <i>Zymomonas mobilis</i> em diferentes valores de pH.....	38
<b>Tabela 4.</b> Porcentagem de crescimento de linhagens de <i>Zymomonas mobilis</i> em diferentes valores de temperatura de incubação (°C).....	39
<b>Tabela 5.</b> Estudo comparativo entre a bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> e a levedura <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> utilizando um meio de cultura com uma concentração inicial de glicose de 100,0 g/L com relação à produção de etanol.....	44
<b>Tabela 6.</b> Efeito da concentração inicial de açúcar sobre a produção de etanol por várias linhagens de <i>Zymomonas mobilis</i> .....	45

## RESUMO

Devido às constantes variações do preço do petróleo e à 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 auxílio de microrganismos, a partir da conversão de açúcares, para a substituição dos combustíveis de origem fóssil e produtos petroquímicos. As características de um processo para obtenção do álcool etílico são originadas dos microrganismos utilizados na fermentação. A bactéria *Zymomonas mobilis* revelou-se um microrganismo promissor, por seu metabolismo único e as suas eficientes características fermentativas na produção de etanol através de açúcares simples. As principais particularidades buscadas são: a alta conversão por unidade de substrato assimilado, alta capacidade de fermentação, termotolerância, estabilidade e tolerância às concentrações de etanol e de substrato e tolerância a baixos valores de pH. Pesquisadores têm comprovado que essa bactéria está se tornando um microrganismo ideal para o estudo e desenvolvimento de processos microbianos, pois apresenta inúmeras vantagens ao ser comparada à levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sendo esta um dos únicos microrganismos utilizados pelas indústrias sucroalcooleiras no Brasil.

**Palavras-chave:** *Zymomonas mobilis*, Fermentação, Etanol, *Saccharomyces cerevisiae*

## ABSTRACT

Due to the constant fluctuation of oil prices and to continuing concerns about greenhouse gas emissions that exacerbate global warming, the world has pursued new forms of energy coming from renewable sources. One of those alternatives is ethanol, which is produced with the aid of microorganisms from the conversion of sugars, for the replacement of fossil fuels and petrochemicals. The characteristics of a process for obtaining ethanol are originated from the microorganisms used in fermentation. The bacterium *Zymomonas mobilis* has proved to be a promising microorganism for its unique metabolism and its efficient fermentative characteristics in the production of ethanol by simple sugars. The main features sought are: a high per unit conversion of substrate assimilated, high fermentation capacity, thermal tolerance, stability and tolerance to ethanol and to substrate concentrations and tolerance to low pH. Researchers have demonstrated that this bacterium is becoming an ideal organism for the study and development of microbial processes, as it shows several advantages when compared to yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which is one of the only microorganisms used by the sugarcane industry in Brazil.

**Keywords:** *Zymomonas mobilis*, Fermentation, Ethanol, *Saccharomyces cerevisiae*.

# 1. INTRODUÇÃO

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 auxílio de microrganismos, a partir da conversão de açúcares oriundos da cana-de-açúcar, beterraba, milho, trigo, batata, mandioca etc. Os autores Ernandes, *et al.* (2010) relatam que “Embora os agentes de fermentação alcoólica mais utilizados sejam as leveduras, principalmente as do gênero *Saccharomyces*, existem estudos para selecionar outros microrganismos capazes de desdobrar carboidratos na produção de álcool.” Ainda, Ernandes e Cruz (2009) diz que: “Contudo, nos últimos 15 anos, a bactéria *Zymomonas mobilis* vem despertando muito interesse pelo seu potencial na produção de etanol, produzindo cerca de 1,9 mol de etanol por mol de glicose, com velocidade três a quatro vezes maior que *Saccharomyces cerevisiae*.”

O desenvolvimento de tecnologias e estudos na área são motivados nacionalmente e internacionalmente pela escassez e a dificuldade de extração dos combustíveis de origem fóssil; o interesse político-ambiental na substituição de combustíveis de origem fóssil por combustíveis renováveis; a intensificação de programas de pesquisa na busca de maneiras alternativas e mais eficiente de sintetizar o bioetanol; a reestruturação e a otimização da indústria convencional fermentativa para a produção de bioenergia e biomaterias utilizando 100% da sua matéria prima.

Baseado neste cenário tecnológico de mudanças, este trabalho propôs além de um entendimento sobre esta tendência, realizar uma revisão bibliográfica sobre uma maneira alternativa de fermentação alcoólica utilizando bactérias do gênero *Zymomonas mobilis*. O conteúdo para realização deste trabalho foi retirado de pesquisas bibliográficas, e websites. Sua conclusão foi baseada nas vantagens e

desvantagens da fermentação alcoólica utilizando bactérias comparadas ao método utilizado no Brasil que é fermentação alcoólica utilizando leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae*.

## 2. OBJETIVOS

Abaixo se define os objetivos gerais e específicos que foram alcançados com a realização deste trabalho.

### 2.1 Gerais

O objetivo desse trabalho foi conhecer um método alternativo para a fermentação alcoólica utilizando um microrganismo que no Brasil ainda não é muito estudado, a bactéria *Zymomonas mobilis*, além de analisar suas vantagens e desvantagens comparados com a levedura.

### 2.2 Específicos

- Obter informações sobre o histórico e as características fisiológicas de *Zymomonas mobilis*;
- Estudar bioquimicamente a transformação da sacarose para a obtenção de etanol por essas bactérias;
- Avaliar o desenvolvimento dos resíduos gerados;
- Comparar as vantagens e desvantagens desse modelo de fermentação ao da fermentação alcoólica utilizando leveduras.

## **3. A CANA-DE-AÇÚCAR**

### **3.1 História da cana-de-açúcar**

A cana-de-açúcar é um dos únicos produtos de origem agrícola destinado à alimentação que ao longo dos séculos foi alvo de disputas e conquistas, que mobilizou homens e nações, e que atualmente é cultivada trazendo grandes lucros aos cultivadores. A planta encontrou lugar ideal no Brasil, devido às condições climáticas e de solo. Durante o Império, o país dependeu basicamente do cultivo da cana e da exportação do açúcar. Antigamente, a cana-de-açúcar era trazida pelas caravelas onde fazia a travessia do Oceano Atlântico e era plantada em algumas covas nas terras abordadas, para servir de suprimentos às expedições posteriores. Sendo que naquele período da história, a exportação do açúcar rendeu ao Brasil cinco vezes mais que as divisas proporcionadas por todos os outros produtos agrícolas destinados ao mercado externo.

Há várias hipóteses e pesquisas sobre a origem da cana-de-açúcar, reportadas por diversos autores, entre elas, as ilhas do Arquipélago da Polinésia, a Nova Guiné e a Índia, são as regiões mais citadas, o que leva a crer que a cana-de-açúcar seja nativa do sudeste da Ásia, porém o seu centro de origem é incerto. “[...] a origem da tropical é a Guiné, tendo ido para a Índia por volta de 6000 a.C. E a subtropical se originou da tropical, tendo chegado a Pérsia no século VI, atingindo mais tarde a região mediterrânea por intermédio dos árabes,” segundo MacMARTIN (1971).

Segundo Cesnik e Miocque (2004) “As primeiras notícias sobre a cana-de-açúcar encontram-se nas escrituras mitológicas dos hindus, onde se declara que ela foi criada por Viswamitra, para o paraíso de Raja Ikkhakhu, e, quando esse paraíso foi destruído pelos demônios, foi permitido o uso da cana aos homens mortais da terra. As

Sagradas Escrituras também fazem referências sobre a cana, em Isaías, 43:24, e Jeremias, 6:20.”

A cana-de-açúcar teve crescente valorização como adoçante devido ao costume antigo de se adoçar chá, café e chocolate com mel, inicialmente era usada na forma de xarope. Segundo Mozambani, *et al.* (2006), foram os Árabes, na época das invasões que propagaram as culturas de cana no norte da África e sul da Europa. Sendo que nesse período, os chineses a levaram para Java e Filipinas. E as conquistas árabes no Ocidente disseminaram o cultivo da cana-de-açúcar nas margens do mar Mediterrâneo, a partir do século VIII. Porém, devido as suas exigências hídricas, solo e condições climáticas ela é uma planta típica de climas tropicais e subtropicais, e não obteve êxito de cultivo na Europa.

Segundo Mozambani, *et al.* (2006), no século XIV, a cultura foi propagada em escala modesta, por toda região mediterrânea e continuou a ser importada do Oriente. Através da guerra entre Veneza e os turcos houve a procura de outros centros abastecedores, surgindo assim culturas nas ilhas da Madeira, implantadas pelos portugueses, e nas Canárias, graças aos espanhóis. Mas foi na América que a cana-de-açúcar obteve excelentes condições para seu desenvolvimento. Alguns anos depois, as maiores plantações do mundo se concentraram nesse continente. Em 1493, na segunda expedição de Cristóvão Colombo foi introduzida a cana-de-açúcar segundo Cesnik e Miocque (2004). Anos mais tarde a planta foi levada, por outros navegantes, para as Américas Central e do Sul.

No Brasil há dúvidas sobre a data e a disseminação dessa cultura. “[...] As dúvidas sobre os primeiros trinta anos de colonização do Brasil são muitas e aumentam o fascínio em torno desse período nebuloso de exploração e conquista do país. O que se diz é que as primeiras canas foram introduzidas aqui em 1502,” de acordo com Corrêa (1926). Segundo Mozambani, *et al.* (2006) “[...] seu desenvolvimento se deu posteriormente, com a criação de engenhos e plantações com mudas trazidas pelos portugueses. Já em fins do século XVI, os Estados de Pernambuco e Bahia contavam com mais de uma centena de engenhos, tendo a cultura florescida de tal modo que o Brasil, até 1650, liderou a produção mundial de açúcar, com grande penetração no mercado europeu. Depois de 1615, a cultura atingiu o planalto paulista, com a região de Itu destacando-se, no século XVII, como o maior centro açucareiro de São Paulo. Em

1798, Frei Gaspar relatou que essa cultura já estava negligenciada em Santos e em São Vicente.”

Segundo Única (2010) “A cana ocupa cerca de 7 milhões de hectares ou cerca de 2% de toda a terra arável do país, que é o maior produtor mundial, seguido por Índia, Tailândia e Austrália. As regiões de cultivo são Sudeste, Centro-Oeste, Sul e Nordeste, permitindo duas safras por ano. Portanto, durante todo o ano o Brasil produz açúcar e etanol para os mercados interno e externo.”

De acordo com Mozambani, *et al.* (2006) “[...] No Brasil, depois de meados da década de 1970, a crise do petróleo tornou intensa a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, para utilização direta em motores a explosão ou em mistura com a gasolina. “[...] E contribuir na redução de dióxido de carbono atmosférico, um dos grandes vilões do aquecimento global do planeta”. (MIRANDA, 2008).

Segundo Única (2010) “Com o fim da regulamentação governamental, iniciou-se o regime de livre mercado, sem subsídios, com os preços do açúcar e etanol passando a ser definidos conforme as oscilações de oferta e demanda. Assim, os preços da cana passaram a depender de sua qualidade e da sua participação porcentual nos produtos finais. Para gerenciar e equilibrar produção e demandas setoriais, a iniciativa privada tem procurado criar instrumentos de mercado, como operações futuras, e desenvolver novas oportunidades para o açúcar e etanol, por meio da queda das barreiras protecionistas e do empenho em transformar o etanol numa ‘commodity’ ambiental.” Segundo Miranda (2008) “[...] A cana-de-açúcar está intimamente associada a nossa matriz energética, inclusive na co-geração de eletricidade e ainda promete uma nova geração de plásticos “verdes” e biodegradáveis. Sem dúvida a cana-de-açúcar pode ser considerada uma das maiores conquistas históricas da nação brasileira.”

### **3.2 Botânica**

As plantas possuem uma classificação taxonômica, onde recebe especificações: divisão, classe, ordem, família, tribo, subtribo, gênero e espécie, para facilitar o estudo de cada tipo. Segundo Mozambani, *et al.* (2006) “A cana-de-açúcar foi descrita por Linneu, em 1753, que a classificou como *Saccharum officinarum* e *Saccharum*

*spicatum*. Depois de Linneu, várias formas de classificação foram apresentadas. Nesse estudo a cana-de-açúcar está classificada segundo Croquist (1981).

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Liliopsida

Ordem: Graminales

Família: Poaceae

Gênero: *Saccharum*

Espécies: *Saccharum officinarum*, *Saccharum spontaneum*, *Saccharum sinensis*, *Saccharum barberi* e *Saccharum robustum*.”

No Brasil e no mundo, atualmente é cultivada um híbrido das espécies acima. “[...] Até 1925, eram plantados no Brasil os genótipos da espécie *Saccharum officinarum*, com centro de diversidade na Nova Guiné e centro de origem desconhecido.” (SCARPARI 2008). Segundo Cesnik e Miocque (2004) “Esta espécie é constituída pelas “canas nobres”. Esse nome advém do fato de elas apresentarem alto teor de açúcar e baixa porcentagem de fibra. Seus colmos são grossos (3,5cm ou mais de diâmetro) e enquadram-se na categoria de canas tropicais. São exigentes quanto ao clima e solo. São muito suscetíveis a doenças, como mosaico, mas resistentes a inúmeras outras. Possuem um sistema radicular reduzido e superficial.” Admite-se que a espécie *Saccharum officinarum* tenha surgido a partir de hibridações entre *Saccharum spontaneum*, *Miscanthus*, *Erianthus arundinaceus* e *Saccharum robustum* (DANIELS E ROACH, 1987). Devido à susceptibilidade dessa espécie, iniciaram-se os programas de melhoramento através da hibridação entre as diferentes espécies do gênero *Saccharum*. “[...] Portanto, a terminologia taxonômica atual dos cultivares de cana é *Saccharum spp.*, já que não se cultiva comercialmente canas que não sejam fruto de melhoramento” (SCARPARI, 2008).

## **4. A IMPORTÂNCIA DO ETANOL EM COMPARAÇÃO AO COMBUSTÍVEL FÓSSIL, COMO FONTE RENOVÁVEL E MENOS POLUENTE (BALANÇO DE CARBONO)**

Segundo Meneguello e Castro (2007), a produção de energia tem como objetivo o conforto das populações sendo utilizada para o desenvolvimento de suas atividades econômicas, mas esta tem sido uma atividade que tem agredido o meio ambiente, principalmente pelos países que não utilizam fontes renováveis de energia e se mantêm através da queima de combustíveis fósseis aumentando a emissão de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e outros gases na atmosfera. Essa emissão se intensificou a partir da revolução industrial, estudos demonstram que até 1970 a concentração de dióxido de carbono era de 270 ppm (partes por milhão), passando para 370 ppm nos dias de hoje. (PEARCE, 2002).

Os principais motivos que impedem os países de se desenvolverem sustentavelmente são, segundo Scheleder (1998), a questão econômica, o etanol tem sido uma alternativa para a substituição da gasolina, porém sua utilização depende da competitividade sendo influenciada diretamente pela evolução dos preços do petróleo no mercado internacional. Sendo que nos últimos 15 anos, o que tem afetado o Setor Sucroalcooleiro são os seguintes fatores:

- A diminuição nos custos de produção da gasolina devido a queda nos preços do petróleo;
- Efeitos compressórios nas tarifas públicas afetando os preços dos combustíveis;
- Centralização na produção do etanol, tendo problemas em abastecer todas as regiões do país;

- Substituição exagerada da gasolina, cujo preço de venda ao consumidor incorporava as parcelas que subsidiavam as diferenças de custo do álcool hidratado;

- Falta de ajuda do governo a partir de uma política tributária diferenciada (como por exemplo, o ICMS aplicado pelos Estados), reconhecendo as externalidades sociais e ambientais que estão ligadas com a produção e o consumo de álcool combustível.

Segundo Pearce (2002), a concentração de dióxido de carbono juntamente com outros gases emitidos pela queima de combustíveis fósseis tem intensificado o fenômeno denominado efeito estufa. De acordo com o autor o efeito estufa é um fenômeno natural provocado pelos gases conhecidos como "Gases do Efeito Estufa – GHG (*Green House Gas*)", é a partir desse fenômeno que a Terra se mantém aquecida, pois parte do calor emitido pelo Sol que chega à superfície terrestre é retido na atmosfera. Sem este efeito, a Terra congelaria, porém o grande problema que se enfrenta atualmente é o aumento excessivo desses gases na atmosfera aumentando assim a temperatura global. Este mesmo autor relata ainda que o aquecimento global tem provocado mudanças climáticas cada vez mais intensas que conseqüentemente tem provocado o derretimento de geleiras, aumentando assim o nível dos oceanos, em alguns lugares a intensificação de tempestades e em outros desertificações em áreas que eram produtivas e o aumento do número de descargas atmosféricas em algumas regiões da Terra o que causa sérios riscos às populações. Para Scarpinella (2002), sem este efeito a superfície terrestre sofreria grandes variações na temperatura o que dificultaria a sobrevivência de muitas formas de vida. Segundo este autor é demonstrado a seguir na Tabela 1 os principais gases causadores do efeito estufa e suas porcentagens na atmosfera.

**Tabela 1.** Gases do Efeito Estufa – GHG

Gás do efeito estufa - GHG	%
Dióxido de carbono – CO <sub>2</sub>	55
Clorofluorcarbono – CFC	20
Metano – CH <sub>4</sub>	15
Óxido Nitroso – N <sub>2</sub> O e outros	10

**Fonte:** (SCARPINELLA, 2002).

Além destes gases existem outros que intensificam o efeito estufa, porém em menores concentrações na atmosfera, são eles o hidrofluorcarbono (HFC), perfluorcarbono (PFC) e o hexafluoreto de enxofre (SF<sub>6</sub>). O autor afirma que a produção de energia é responsável por 57 % das emissões sendo a principal atividade humana geradora dos Gases do Efeito Estufa. O grande problema é a abundância excessiva das energias fósseis, sendo que as soluções deverão ser encontradas indo contra a dinâmica dos mercados atuais. Segundo Sachs (2007), as mudanças da revolução energética atuais vão depender, na maior parte, da capacidade dos estados nacionais e da Organização das Nações Unidas de definir e por em prática políticas públicas de âmbito nacional e internacional voltada aos três principais pontos desta questão: a redução do perfil da demanda energética, o aumento da eficiência na produção e uso final das energias e da substituição das energias fósseis por energias renováveis, incluindo o uso "limpo" das energias fósseis abundantes como o carvão, mediante o seqüestro dos gases de efeito estufa. Sendo que as soluções serão diferentes para cada país continuando a ter uma matriz energética futura sendo múltipla, tendo proporções variáveis das diversas fontes de energia. Para Pearce (2002), a humanidade tem se preocupado cada vez mais com os fenômenos ligados às alterações climáticas e algumas atitudes foram tomadas como:

- Em 1992 no Rio de Janeiro, ocorreu um dos primeiros esforços, em nível mundial, para tentar barrar estas mudanças, foi nesta data que aconteceu a Convenção das Nações Unidas sobre Mudança Climática, com patrocínio da "Organização das Nações Unidas – ONU". Naquela convenção as nações industrializadas concordaram com a proposta de estabilizar suas emissões de poluentes nos níveis de 1990 durante dez anos. Porém, segundo o autor, muitas nações não cumpriram a meta.

- Em 1997 em Kyoto no Japão, ocorreu outro encontro também patrocinado pela ONU, onde foi elaborado um documento conhecido como Protocolo de Kyoto em que os 20 países industrializados mais poluidores se comprometiam a reduzir seus níveis de emissão de Gases do Efeito Estufa em 5,2%, em média em relação aos níveis de emissão observados desde 1990, no período entre 2008 e 2012 (definido como primeiro período do compromisso). Segundo alguns estudos para que os países industrializados consigam atingir suas cotas de redução de Gases do Efeito Estufa criou-se um dispositivo chamado de "Mecanismo de Desenvolvimento Limpo – MDL", onde os países em desenvolvimento implantam atividades que subtraem carbono da atmosfera e

em troca recebem "Certificados de Emissões Reduzidas – CER" conhecidos como créditos de carbono que então devem ser comercializados com os países industrializados num mercado internacional, conhecido como "Mercado de Carbono" Rocha (2003). Esse mesmo autor destaca que os Mecanismos de Desenvolvimento Limpo têm dois principais objetivos: a redução das emissões de Gases do Efeito Estufa e/ou seqüestro de carbono e promover o desenvolvimento sustentável do país hospedeiro do projeto e podem ser divididos nas três principais modalidades demonstradas a seguir:

- Aumento na utilização das fontes renováveis e alternativas de energia. Como nas usinas a biomassa;
- Aumento na eficiência / conservação de energia. Como os projetos de modernização;
- Reflorestamento e estabelecimento de novas florestas. É nesta modalidade que está sendo implantados na maioria dos países que participam deste protocolo os projetos de seqüestro de carbono.

Para que os projetos sejam classificados como Mecanismos de Desenvolvimento Limpo os empreendedores precisam cadastrá-los e receber a aprovação junto à "*United Nations Framework Convention on Climate Change – UNFCCC*", que é a convenção permanente na ONU, encarregada dos estudos referentes à mudança do clima e da aprovação destes projetos.

Mas nem todos os especialistas são unânimes na aprovação ao Protocolo de Kyoto ou ao mercado de créditos de carbono, Khalili (2002) afirma que esse protocolo é algo contrário ao ambiente e mais precisamente a sua conservação, pois o carbono ao ser encarado como uma commodity ambiental, visa o lucro imediato, sendo que na verdade, esse mercado de carbono encara a preservação ambiental de uma forma capitalista e o autor questiona: "O mundo todo já tomou o rumo da degradação seguindo este sistema. Há exclusão social e fome por toda parte. Se o mercado financeiro internacional está falido, porque devemos continuar acreditando neste modelo?"

Segundo Sachs (2007), o princípio "poluidor pagador" relacionado ao mercado de crédito de carbono não discrimina entre o pagamento de uma multa, de uma compensação às vítimas da poluição ou da reestruturação do aparelho produtivo de maneira a evitar as poluições futuras. Esse mercado de créditos de carbono é foco de muitas críticas por parte de alguns movimentos ambientalistas, que são contra a possibilidade dada aos países industrializados do Norte de se omitirem quanto à

obrigação de reduzir as emissões de gases de efeito estufa mediante apoio a projetos que nem sempre são claros, financiados nos países do Sul, mediante o Mecanismo de Produção Limpa. Segundo o mesmo autor no que diz respeito à substituição das energias fósseis por energias renováveis, as soluções deverão ser diversas, com proporções diferentes atribuídas às variáveis fontes de energia, levando em consideração as configurações da disponibilidade em recursos naturais, de climas e do ritmo de progresso técnico de cada país. Devido à amplitude do tema restringimos a reflexão ao caso do Brasil.

#### **4.1 Participação do Brasil no mercado de créditos de carbono**

No Brasil o plano de agroenergia do Ministério da Agricultura brasileiro prevê como meta para um desenvolvimento sustentável uma rápida expansão da produção do etanol e um ritmo mais lento para o biodiesel. O BNDES (Banco Nacional de Desenvolvimento) estimava em 2007 que até 2010 cem novas usinas seriam construídas, agregando-se às 248 existentes na Região Centro-Sul e 88 no Nordeste (*Folha de S.Paulo*, 7.2.2007). Essa meta deve ser alcançada sem colocar em risco a segurança alimentar, as exportações agrícolas, e sem recorrer ao desmatamento para criar novas áreas de cultivo. O impacto ambiental da produção de biocombustíveis depende exclusivamente dos cultivos escolhidos, do manejo e de seu processamento. O resultado dessa produção pode levar tanto a uma redução de 90% das emissões de gases estufa quanto a um aumento de 20%, segundo a Agência Ambiental Européia de Copenhague (cf. ROSENTHAL, 2007). Projetos para participar do mercado de carbono estabelecido pelo Protocolo de Kyoto e receber os Certificados de Emissões Reduzidas, precisam se cadastrar e receber a aprovação junto à UNFCCC. A seguir são demonstrados alguns dados de usinas de cana-de-açúcar que deve evidenciar o quanto estará contribuindo para diminuir a emissão dos Gases de Efeito Estufa, na atmosfera.

Macedo (2004), enfatiza que no caso das usinas de cogeração de energia elétrica a partir da biomassa de cana-de-açúcar, emite carbono na fase da queima do combustível, porém ocorre o sequestro do carbono da fase do crescimento da cana pois esse é consumido pelos vegetais no processo de fotossíntese (PORTO, 2005), anulando o balanço das emissões e os créditos de carbono são gerados através das emissões que são evitadas pela geração de energia elétrica nestas usinas substituindo a utilização das

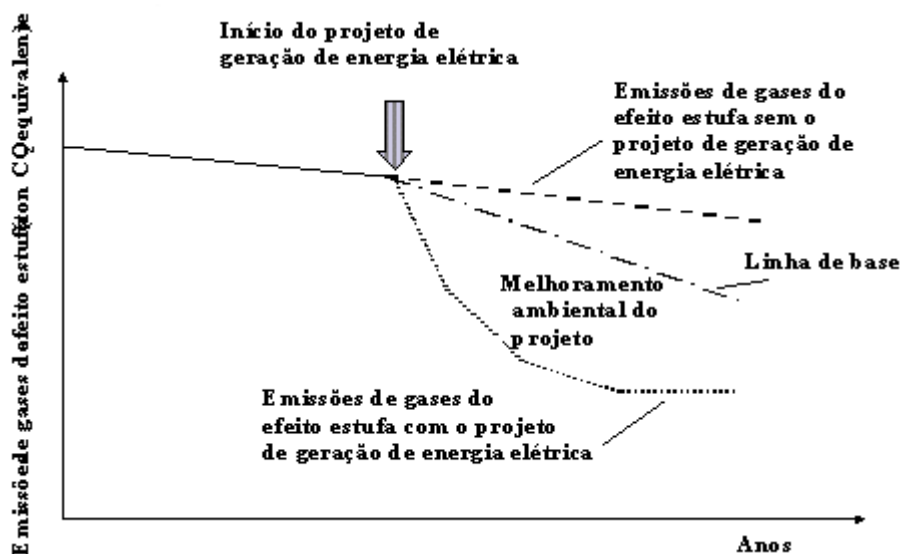
usinas térmicas a gás natural ou a óleo combustível, que possuem um balanço de emissões desfavorável.

Segundo Meneguello e Castro (2007) a *United Nations Framework Convention on Climate Change* analisadora dos projetos dos Mecanismos de Desenvolvimento Limpo, utiliza a metodologia chamada de "*Baseline Methodology*" (Metodologia da Linha de Base) para a análise dos projetos das usinas termoelétricas da biomassa de cana-de-açúcar que é demonstrada, de forma simplificada, na Figura 1, a seguir:

A linha superior (contínua e tracejada) está representando as emissões de Gases do Efeito Estufa, em consequência à produção e consumo de energia elétrica, levando em consideração que esta energia é gerada a partir da queima de combustíveis fósseis e o que ocorreria sem a implantação do projeto de geração de energia elétrica avaliado. A linha decresce porque é previsto que no futuro, com o aumento da eficiência devido às novas tecnologias de qualquer maneira haverá uma diminuição da quantidade de carbono emitido, para a mesma quantidade de energia elétrica gerada.

A linha traço-ponto está representando a previsão das futuras emissões que ocorreria sem a implantação do projeto de geração de energia elétrica avaliada e, porém neste caso considerando, além das tecnologias atuais como no item anterior, considera ainda as novas tecnologias que serão desenvolvidas que deverão diminuir ainda mais as emissões dos Gases do Efeito Estufa. Esta é a metodologia chamada de "Linha de Base" considerada para esse tipo de projeto.

A linha pontilhada está representando as emissões dos Gases do Efeito Estufa, de geração de energia elétrica avaliado após a implantação do projeto. É a diferença entre as linhas traço-ponto e pontilhada que determina a quantidade de Certificados de Emissões Reduzidas, a que a usina terá direito caso seu projeto seja aprovado e que futuramente poderá ser vendido no mercado de crédito de carbono. E depois de aprovado o projeto é avaliado continuamente monitorado para verificação se estão sendo atendidas todas as especificações iniciais. Isso ocorre durante todo o tempo de sua vida útil.



**Figura 1** - Metodologia da Linha de Base

**Fonte:** Açúcar Guarani (2005).

Algumas regras devem ser seguidas para cumprimento dessa metodologia como: a biomassa do projeto, nesse caso o bagaço da cana-de-açúcar deve ser fornecido pela mesma usina onde o projeto de geração de energia está sendo implantado e este não deve ser estocado por mais de um ano; deve existir documentação comprobatória demonstrando que o projeto não tenha participação do setor público e que não seja implantado por esse setor, apesar dos programas de promoção de energias renováveis existentes; e não deve haver aumento de produção de biomassa na usina com a implementação do projeto, essa última regra não inclui aumento da produção de energia em função do aproveitamento da palha da cana-de-açúcar que muitas vezes, é queimada na lavoura. No estado de São Paulo essa prática já possui legislação para sua eliminação segundo Meneguello e Castro (2007). Essa metodologia foi baseada nos seguintes documentos:

*Approved baseline methodology - AM0015 / Version 01, "Bagasse-based cogeneration connected to an electricity grid"* (UNFCCC, 2004). Esta metodologia para verificação e monitoração da Linha de Base, foi preparada pela empresa *Econergy International Corporation*, com base no projeto de geração de energia a partir do bagaço de cana-de-açúcar de uma usina localizada na cidade de Morro Agudo / SP.

*Toll for the demonstration and assessment of additionality* (UNFCCC, 2004), que apresenta as ferramentas necessárias para desenvolvimento do projeto.

O balanço energético calculado em um projeto desse tipo leva em consideração quatro grupos de fluxos de Gases do Efeito Estufa, na produção e utilização da cana-de-açúcar e seus derivados, que incluem:

- Grupo 1: Emissões associadas à fixação de carbono atmosférico no período de fotossíntese da planta e a utilização dos produtos da cana-de-açúcar. Segundo Macedo *et al.*, (2004) este grupo de fluxos é praticamente neutro, pois o carbono fixado é liberado novamente durante o seu ciclo de produção da cana-de-açúcar e na utilização final do etanol e do bagaço.

- Grupo 2: Fluxos negativos associados a utilização de combustíveis fósseis na produção de todos os insumos agrícolas e industriais para a produção de cana e etanol; e também na produção de equipamentos (agrícolas e industriais) construção de prédios e instalações, que contribuem para o aumento das emissões.

- Grupo 3: Fluxos de gases emitidos por outros setores além dos combustíveis fósseis, são principalmente o óxido nitroso ( $N_2O$ ) e o metano ( $CH_4$ ), também considerados negativos, pois contribuem para o aumento das emissões.

- Grupo 4: Fluxos positivos conhecidos como virtuais, que correspondem às emissões de Gases do Efeito Estufa que ocorreriam, na ausência de etanol e do bagaço excedente em substituição à gasolina automotiva e ao óleo combustível.

A principal deficiência na produção energética é a queima do bagaço feita atualmente na produção na cultura da cana-de-açúcar sendo pouco eficiente, existindo ainda muito potencial energético a ser explorado e estudado neste resíduo e a utilização de combustíveis fósseis no transporte e na produção dessa cultura.

## **5. DIFERENÇAS FISIOLÓGICAS E MORFOLÓGICAS ENTRE BACTÉRIAS E LEVEDURAS**

Divide-se em dois importantes grupos o mundo celular, onde é considerada a presença ou ausência de núcleo (região interna circundada por uma membrana que guarda o material genético). Denominam-se eucarióticas as células que contêm um núcleo definido, e procarióticas as células que não apresentam esse núcleo, (DIEHL, 2009). No sentido químico esses dois grupos possuem características similares no fato de apresentarem ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos e carboidratos, usando as mesmas reações químicas para metabolizar o alimento, formar proteínas e armazenar energia. De acordo com Tortora, *et al.* (2005), as principais diferenças entre ambos são a estrutura das paredes celulares e das membranas e a ausência de organelas (são estruturas celulares especializadas possuindo funções específicas).

No geral as células bacterianas apresentam características dos seres procarióticos, o material genético da célula é unido com o citoplasma sem uma membrana nuclear, sendo que o DNA desses microrganismos é organizado em uma única molécula em fita dupla (DIEHL, 2009). Grande parte de seu processo reprodutivo é feito por divisão binária simples, onde uma célula divide-se ao meio após atingir determinado tamanho. O formato desses microrganismos geralmente é esférico, espiralado ou cilíndrico. O diâmetro das bactérias varia de 0,5  $\mu\text{m}$  das esféricas para 19,0  $\mu\text{m}$  das cilíndricas. Por serem microrganismos tão pequenos a morfologia bacteriana podem ser melhor observadas quando as bactérias são coradas. O método mais utilizado de coloração é o Gram permitindo uma divisão de dois grandes grupos: gram-positivas e gram-negativas. Essa característica é diferenciada pela parede celular do microrganismo (ALTERTHUM, 2001).

A bactéria *Zymomonas mobilis* é um microrganismo único em seu meio por suas características únicas como: Gram-negativa, não esporulante e móvel, anaeróbia facultativa, sendo que, algumas linhagens são obrigatoriamente anaeróbias. Morfologicamente, apresenta-se na forma de bastonete curto e grosso com medidas de 2,0 a 6,0  $\mu\text{m}$  de comprimento e 1,0 a 1,4  $\mu\text{m}$  de largura. Podendo apresentar mobilidade, quando isso ocorre possui de um a quatro flagelos polares (FALCÃO DE MORAIS, 1983). Geralmente são encontradas em pares, mas também apareçam isoladas. Possuem rotas catabólicas simples comparadas a outros microrganismos. Gerando energia suficiente para o seu crescimento, *Zymomonas mobilis* na sua fermentação resulta em baixos rendimentos de biomassa, pois cataboliza substratos com altas taxas específicas de carbono, sendo que a maior parte deste substrato é incorporado no catabolismo do produto final, o etanol (TOMA *et al.*, 2003).

Por outro lado, os fungos são seres eucarióticos, esses microrganismos apresentam núcleo celular rodeado por uma membrana apresentando várias organelas de forma ordenada, e o seu DNA está organizado em estruturas no formato de multicromossomos (DIEHL, 2009). Até 1969 os fungos eram considerados vegetais, só a partir dessa época eles foram classificados em um reino separado devido a suas características próprias que os diferenciam das plantas. A principal diferença é que os fungos não sintetizam clorofila fazendo com que não consigam fazer fotossíntese e armazenam glicogênio como material de reserva ao invés do amido podendo ser encontrados na água, solo, ar, animais e vegetais. Morfologicamente, são nomeados de leveduras e bolores apresentando algumas diferenças em seu formato. Os bolores possuem uma forma mais filamentosa constituída de células multinucleadas denominadas de hifas e a esse conjunto de hifas é nomeado como micélio. As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* que são usadas para a fermentação alcoólica são unicelulares, podendo possuir três formas: esférica, elíptica e filamentosa seu tamanho varia de 1,0 a 5,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 5,0 a 30,0  $\mu\text{m}$  de comprimento (ALTERTHUM, 2001). Essa espécie de levedura possui 16 cromossomos e é muito empregada em estudos sobre funcionalidade gênica (FRIGIERI *et al.*, 2007; FRIGIERI *et al.*, 2008). A sua reprodução pode ser de três maneiras, sendo que o método mais utilizado é através de gemulação (brotamento). A nova célula brota e ocasiona uma protuberância na levedura-mãe 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 sexualmente formando um organismo diplóide a partir da fusão de duas células haplóides de *Mating Type* oposto (*Mat a* e *Mat  $\alpha$* ). O diplóide gerado em meio pobre nutricionalmente esporula e gera quatro esporos (tétrade), permitindo estudos sobre combinações genéticas, mutações e seleção (FRIGIERI, 2007). É dessa maneira que ocorrem as mudanças evolutivas e os melhoramentos genéticos dos microrganismos. A terceira reprodução é através da fissão, onde a levedura se alonga e o núcleo é dividido em duas células-filhas (LEÃO, 2005).

## **6. O PROCESSO FERMENTATIVO DAS BACTÉRIAS**

### **6.1 Conceito de energia e fermentação alcoólica**

O conceito de energia está relacionado a diversos campos do conhecimento, mas no geral se define na capacidade de realização de trabalho (LA ROVERE, 1985). Sendo assim, nossos antepassados sempre buscaram diferentes formas de obter energia para realização de suas atividades. Porém, devido ao aumento de gases do efeito estufa e as mudanças climáticas nos últimos anos a crescente busca por fontes energéticas mais sustentáveis resultando em um aumento nos estudos e processos direcionados à produção de energia através do uso de microrganismos. Há várias considerações relacionadas à utilização da energia microbiológica, principalmente por ela possuir vantagens sobre os combustíveis fósseis.

Segundo muitos estudiosos, houve um interesse em energia renovável a partir de 1973 devido à crise do petróleo, desde aquela época tenta se encontrar fontes de recursos orgânicos para a substituição dos produtos petroquímicos segundo Ernandes e Cruz (2009). Mas foi a partir da década de 70 que foi caracterizado diversos esforços para melhorar e criar novas fontes para a produção de etanol. Dentro os vários trabalhos desenvolvidos naquela época, a bactéria *Zymomonas mobilis* revelou-se um microrganismo promissor (JEREZ, 1993; ERNANDES, 2006). A ocorrência dessa bactéria *Zymomonas mobilis* foi verificada em muitos países promovendo fermentação de meios açucarados (DADDS e MARTIN, 1973; SWINGS e DE LEY, 1977). Na Europa essa bactéria foi encontrada em meios como, os vinhos de maçãs e de pêras (MILLIS, 1956) e em polpa de maçã (CARR e PASSMORE, 1971). Ainda na Europa, foi considerada como contaminante em indústrias de cerveja (DADDS e MARTIN, 1973). No México, ocasionou a fermentação da seiva do agave – planta com alto teor de

açúcar sendo utilizada para a produção de bebidas alcoólicas (CARR, 1974); na África, Ásia e Américas, fermentava vinhos de seiva de diversas palmas (DADDS e MARTIN, 1973).

No Brasil, um dos primeiros dados encontrados sobre a fermentação com essa bactéria foi em Pernambuco (nordeste brasileiro). O pesquisador Gonçalves de Lima foi quem começou a isolar diversas linhagens de *Zymomonas* a partir de caldo de cana-de-açúcar fermentado. O microrganismo responsável foi denominado através de estudos taxonômicos de *Zymomonas mobilis* variedade *recifensis* (GONÇALVES DE LIMA *et al.*, 1970; FALCÃO DE MORAIS, 1983; FALCÃO DE MORAIS *et al.*, 1993). Existem dados que desde a década de 50, o Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (DAUFPE) tem estudado a atividade antagonista de *Zymomonas mobilis* em infecções entéricas causadas por *Salmonella*, *Shigella* e *Escherichia coli*. Os resultados obtidos indicaram que essa bactéria também pode ser utilizada como agente terapêutico combatendo a enterocolite e cistite, pois em todos os casos estudados foi obtida a regressão dos sintomas (GONÇALVES DE LIMA *et al.*, 1970).

A seguir na Tabela 2 podem ser verificadas as diferentes linhagens de *Zymomonas mobilis* encontradas em vários países e o pesquisador responsável pelo seu isolamento, segundo Swings e De Ley (1977).

**Tabela 2.** Diferentes linhagens de *Zymomonas mobilis* encontradas em vários países e o pesquisador responsável pelo seu isolamento.

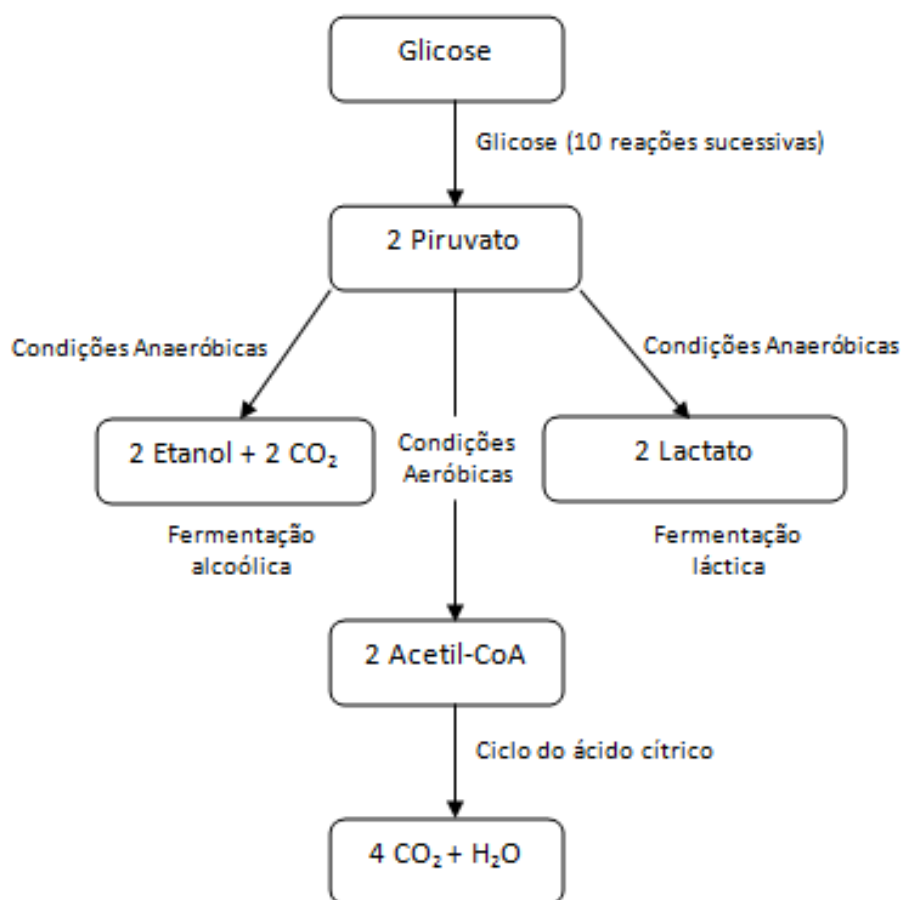
Linhagem	Nº de linhagem	Fonte	Local	Data de Publicação	Isolado por
<i>Zymomonas mobilis</i>	ATCC 10988 NCIB 8938 NRRL B-806	Agave	México	1924	Lindner
<i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>pomaceae</i>	NCIB 11200 ATCC 29192	Cidra	Bristol, U.K.	antes 1951	Barker e Kluyver
<i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>pomaceae</i>	1	Cidra	Bristol, U.K.	1950	Millis
<i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>pomaceae</i>	2	Cidra	Bristol, U.K.	1950	Millis
<i>Zymomonas mobilis</i>	AG 11	Agave	México	1950	Gonçalves de Lima et al.
<i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>pomaceae</i>	NCIB 8777 ATCC 29192	Agave	Bristol, U.K.	antes 1951	Carr
<i>Zymomonas anaerobia</i>	D-364	Cerveja	Bristol, U.K.	1966	Shimwell
<i>Zymomonas mobilis</i>	VP1, VP2, VP3, VP4	<i>Elaeis</i> sap	Kinshasa, Zaire	1969	Swings
<i>Zymomonas mobilis</i>	7.4	<i>Elaeis</i> sap	Kinshasa, Zaire	1969	Swings
<i>Zymomonas mobilis</i>	70.1, 70.2, 70.3, 70.7, 70.8, 70.9, 70.10, 70.11, 70.12, 70.14	<i>Elaeis</i> sap	Kinshasa, Zaire	1970	Swings
<i>Zymomonas mobilis</i>	CP1, CP2, CP4	caldo de cana-de- açúcar	Recife, Brasil	1970	Gonçalves de Lima et al.
<i>Zymomonas mobilis</i> var. <i>recifensis</i>	CP4	caldo de cana-de- açúcar	Recife, Brasil	1970	Gonçalves de Lima et al.

Fonte: Swings e De Ley (1977).

Segundo as leis fundamentais de conversões energéticas, os microrganismos têm a capacidade de produzir combustíveis tais como bioetanol, biodiesel, metano e hidrogênio, que atualmente está possuindo grande destaque no cenário mundial (BUCKLEY e WALL, 2006).

Segundo Ernandes e Cruz (2009), existem duas maneiras que a fermentação alcoólica pode ser analisada:

**Bioquímica:** sob a análise bioquímica, o processo da fermentação alcoólica é caracterizado como uma via catabólica, na qual as moléculas de açúcar são degradadas (glicose ou frutose), no interior das células de microrganismos (leveduras ou bactérias), até a formação de etanol e  $\text{CO}_2$ , onde há liberação de energia química e térmica. A via central do catabolismo da glicose utilizada é a glicólise, gerando como produto final desse processo o piruvato, podendo seguir vias metabólicas variadas como: fermentação alcoólica, láctica e respiração no ciclo de Krebs e cadeia respiratória, como pode ser verificado na Figura 2.



**Figura 2** - Catabolismo da glicose.

**Fonte:** Lehninger (2002).

Na fermentação alcoólica, que é o foco desse trabalho, resumidamente ocorre uma descaboxilação do piruvato, transformando em acetaldeído e posteriormente reduzido a etanol. A equação simplificada da fermentação alcoólica é apresentada da seguinte maneira:



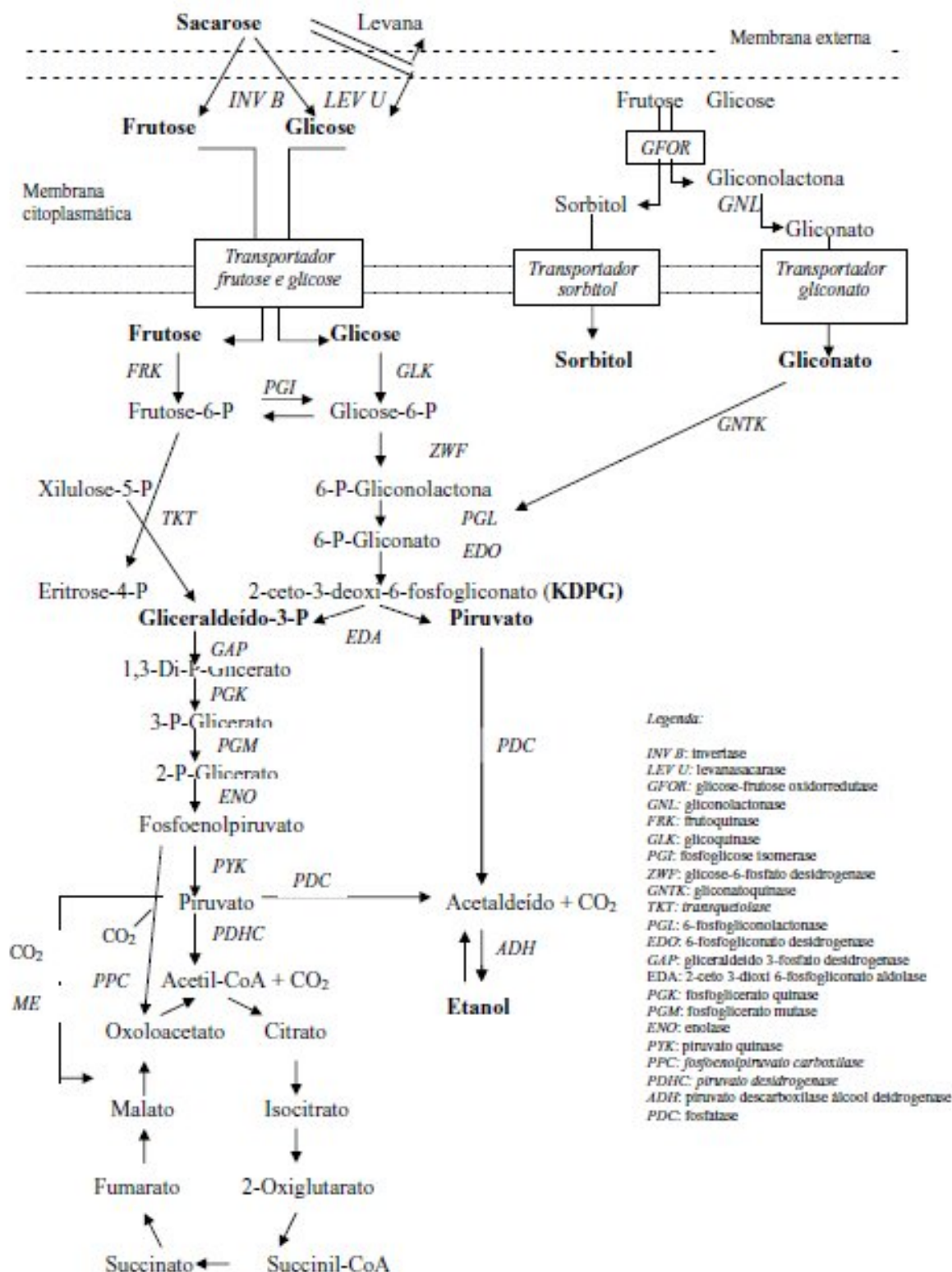
**Microbiológica:** ocorre a fermentação a partir de microrganismos principalmente pelas leveduras, porém alguns tipos de bactérias têm um futuro promissor para a produção de álcool. Cerca de 500 espécies de leveduras são estudadas e conhecidas pelo homem. Dentre elas, as principais como produtoras de etanol, são espécies do gênero *Saccharomyces*, *Schizosaccharamyces*, *Pichia* e outras. A espécie que tem maior destaque no Brasil de levedura alcoólica é a *Saccharomyces cerevisiae*, possuindo um largo espectro de utilização, sendo empregada na produção de pães, bebidas alcoólicas, etanol e muitos outros produtos. Entre as bactérias uma das mais importantes é a *Zymomonas mobilis* capaz de desdobrar carboidratos na produção de álcool. Essa espécie apresenta atributos tecnológicos que potencializam o seu emprego na fermentação alcoólica em escala industrial, há estudos comprovando que essa bactéria consegue transformar açúcares em etanol e gás carbônico, em condições comparáveis àquelas exigidas pelas leveduras. Tendo a vantagem de possuir uma produtividade em etanol a partir de glicose acima de 97% do valor teórico máximo (SPRENGER, 1996).

## 6.2 Processo fermentativo

Segundo Doelle *et al.* (1993), *Zymomonas mobilis* tem causado um grande interesse no mundo científico, biotecnológico e industrial por ser uma bactéria única dentro do mundo microbiano, com crescimento, produção de energia e resposta às condições de cultura extremamente peculiares. Os autores afirmam que a habilidade da bactéria em conduzir a produção de energia a favor da formação do produto, responder à manipulação e variação física e química do ambiente, e a pouca formação de resíduos tornam-a um microrganismo ideal para o estudo e desenvolvimento de processos

microbianos. Para esse processo são indispensáveis na composição do meio de cultura açúcares fermentáveis com glicose, frutose e, em alguns casos, sacarose. Com esse processo de fermentação da glicose e frutose gera quantidades praticamente equimolares de etanol e CO<sub>2</sub>, formando colônias de coloração branca ou creme (ERNANDES e CRUZ, 2009).

Na ilustração da Figura 3, é demonstrada o metabolismo de açúcares de *Zymomonas mobilis*, aparece como uma “via metabólica” com algumas ramificações. Segundo Ernandes e Cruz (2009): “A sacarose é metabolizada a glicose e frutose pela ação das enzimas invertase (INV B) e levanasacarase (LEV U). As duas hexoses entram na célula via sistema de difusão facilitada (GLF) ou são convertidas pela GFOR (glicose-frutose oxirredutase), uma enzima contendo NADP (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato) que existe apenas na bactéria *Zymomonas mobilis*. A enzima GFOR madura está localizada no periplasma, oxida glicose a gliconolactona e reduz frutose a sorbitol. Gliconolactona é, então, convertida pela gliconolactonase (GL), outra enzima periplasmática, em ácido glicônico (gliconato). Ambas as enzimas são os principais constituintes do periplasma, formando aproximadamente 20 a 30% das proteínas deste compartimento. O ácido glicônico é consumido pelas células e pode ser completamente degradado (como um co-substrato) a etanol e ácido acético. O sorbitol é produzido para neutralizar o efeito prejudicial de estresse osmótico.”



**Figura 3** - Metabolismo dos carboidratos em *Zymomonas mobilis*.

Fonte: Sprenger (1996).

Estudos demonstram que a fermentação de 1 mol de glicose dá origem a 1,6 de etanol, 1,8 moles de CO<sub>2</sub> e pequena quantidade de outros subprodutos com lactato, acetaldeído, ácido acético, glicerol, acetoína, dihidroxicetona, sorbitol, manitol, levana e ácido glicônico. Comprovam ainda que as condições ideais para o crescimento desse tipo de bactéria são temperaturas que variam de 30 a 36°C e intervalos de pH entre 5 e 7. Seguindo esses padrões e cultivadas em meio complexo, podem ter um rendimento de conversão de 98% da glicose presente em etanol, CO<sub>2</sub>, lactato e alguns outros subprodutos, seguindo um balanço metabólico simples. Sendo que utiliza apenas 2% da glicose presente no meio para formar biomassa. As Tabelas 3 e 4 mostram em diferentes valores de pH e temperatura de incubação, respectivamente a porcentagem de crescimento de linhagens de *Zymomonas mobilis* (SWINGS e DE LEY, 1977).

**Tabela 3.** Porcentagem de crescimento de linhagens de *Zymomonas mobilis* em diferentes valores de pH.

pH inicial	% de crescimento de linhagens
3,05	0
3,5	43
3,7	71
3,85	90
5,7	100
4,5	87
8,0	0

**Fonte:** Swings e De Ley (1977).

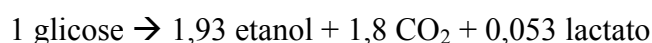
**Tabela 4.** Porcentagem de crescimento de linhagens de *Zymomonas mobilis* em diferentes valores de temperatura de incubação (°C).

Temperatura de incubação(°C)	% de crescimento de linhagens
30	100
34	97
36	97
38	74
40	5

**Fonte:** Swings e De Ley (1977).

Além dos açúcares a maioria das cepas requer alguns fatores de crescimento como ácido pantotênico, biotina e, ocasionalmente, vitamina B<sub>12</sub>, riboflavina, tiamina, ácido lipóico e ácido fólico. Quando há adição de altas quantidades de extrato de levedura há um aumento na produção de células, porém neste caso não tem relação de produtividade de etanol, levana ou sorbitol (CROMIE e DOELLE, 1980). Outros autores como Belaich e Senez (1965) estudaram o efeito de pantotenato no crescimento de *Zymomonas mobilis* e observaram que há redução da velocidade específica de crescimento da bactéria quando há limitação desta substância. Os autores citam que o pantotenato é uma vitamina essencial, pois necessita desta substância para produzir compostos orgânicos essenciais para o crescimento celular, produzindo, conseqüentemente, etanol.

Gibbs e DeMoss (1954) demonstraram que essa bactéria utiliza, para o catabolismo anaeróbio desses carboidratos, uma modificação da via de Entner-Duodoroff, podendo produzir mais de 1,9 mol de etanol por mol de glicose fermentada e pequena quantidade de lactato, de acordo com a seguinte reação:



Lyness e Doelle (1980), demonstram que quando são utilizadas glicose e frutose como fonte de carbono, se obtêm um rendimento maior que 95% em relação ao rendimento teórico, pois se produz quase exclusivamente etanol e CO<sub>2</sub> e uma quantidade muito pequena de subproduto, porém quando é utilizado sacarose, um substrato industrialmente disponível e de baixo custo, o rendimento de etanol diminui

para 75-80% do valor teórico, devido à um aumento na formação de subprodutos como levana e sorbitol. Vários autores consideram ser *Zymomonas mobilis* um excelente produtor de etanol, pois apresenta um ciclo de fermentação muito mais rápida e com maior eficiência comparada a levedura; apresenta ainda maior tolerância a elevadas concentrações de glicose, de sacarose e de etanol; tolera pH entre 2,5 e 7,5 e apresenta bom rendimento na conversão do açúcar em etanol. Sendo que esta produção de etanol é favorecida numa faixa de pH entre 4,5 e 7,0. Essa faixa do pH é ideal para o crescimento da bactéria varia devido a cepa utilizada (SWINGS e DE LEY, 1977; VIKARI e GISLER, 1986; CALAZANS *et al.*, 1989).

Wisbeck *et al.* (1997), em trabalhos realizados com diferentes linhagens desta bactéria, relatam o alto rendimento de conversão dos açúcares em etanol, chegaram em valores acima de 90%, porém eles citam o problema que essas bactérias tem com concentrações iniciais altas de glicose, em processo em batelada, levando a redução significativa de produção devido à inibição pelo substrato. Já Erzinger (1996) mostrou que este problema pode ser contornado pela troca do processo em batelada para o uso de fermentação em regime descontínuo alimentado.

Outro aspecto que tem sido muito estudado é a eliminação da centrifugação do processo, etapa que acaba muitas vezes sendo a mais onerosa tanto na fermentação de batelada ou contínua, pois em ambos os casos, as células encontram-se livremente dispersas no mosto para ser fermentado e após o término dessa etapa estas células são recuperadas através da centrifugação e retornam aos fermentadores, essas pesquisas tem o intuito da aplicação de métodos de imobilização de células. Seguem muitas linhas de pesquisa como: substratos orgânicos, e recentemente inorgânicos, objetivando como produto final o etanol. Em regimes de cultivo, o descontínuo e o contínuo a bactéria *Zymomonas mobilis* é uma das mais estudadas.

Segundo Ingram e Buttke (1984), já existem vários países pesquisando a obtenção de etanol utilizando essas bactérias e com diferentes substratos, como por exemplo: no Canadá, em Biohol, existe em funcionamento uma planta piloto para a produção de etanol utilizando serragem hidrolisada por via ácida e fermentação por *Zymomonas mobilis* e no Japão, Austrália e Nova Zelândia existem várias plantas-piloto operando em sistema contínuo utilizando diferentes linhagens de *Zymomonas* para a produção de etanol, sempre utilizando o mesmo microrganismo e segundo esses autores,

este microrganismo pode ser especialmente útil em países como o Brasil e a Índia, levando em consideração a característica termotolerante de *Zymomonas mobilis*.

## **7. VANTAGENS E DESVANTAGENS DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA UTILIZANDO A BACTÉRIA *Zymomonas mobilis* EM RELAÇÃO À FERMENTAÇÃO TRADICIONAL UTILIZANDO LEVEDURAS.**

Segundo Kosaric e Vardar-Sukan (2001), as características de um processo para obtenção do álcool etílico são originadas pelos microrganismos utilizados na fermentação. As principais particularidades buscadas são: a alta conversão por unidade de substrato assimilado, alta capacidade de fermentação, termo tolerância, estabilidade e tolerância às concentrações de etanol, substrato e baixos valores de pH. Sendo assim os microrganismos mais utilizados são as leveduras e as bactérias para a produção industrial do etanol, entre eles se destacam as *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum* (*carlsbergensis*), *Schizosaccharomyces pombe* e *Kluyveromyces* e as bactérias *Zymomonas mobilis*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium thermohydrosulfuricum* e *Thermoanaerobacter athanolicus*. Sendo dentre essas opções a *Saccharomyces cerevisiae* a mais utilizada na produção do etanol (DIEHL, 2009). Mas, novos métodos estão sendo pesquisados e desenvolvidos para a obtenção de etanol, um deles emprega a bactéria *Zymomonas mobilis*, apresentando alta capacidade de fermentação (MEDIGAN, 2000), podendo fermentar açúcares duas vezes mais rápido do que as leveduras (NAJAFPOUR, 2007). Nos últimos anos vários pesquisadores têm proposto a substituição da clássica *Saccharomyces cerevisiae* pela *Zymomonas mobilis*, alegando suas inúmeras vantagens e suas características superiores às leveduras (BAI, 2008).

A seguir são listadas vantagens e desvantagens apontadas por vários autores:

**Vantagens:**

O que torna essa bactéria um microrganismo ideal para pesquisas e desenvolvimento de processos microbianos para a produção de etanol é: habilidade em acoplar e desacoplar a produção de energia a favor da formação do produto, responder à manipulação física e química do ambiente, bem como sua limitada formação de produtos (ERNANDES e CRUZ, 2009);

Suas rotas catabólicas comparadas a outros microrganismos são mais simples, pois não tem a variedade de alternativas metabólicas, otimizando o processo. Gerando energia suficiente para o crescimento, *Zymomonas mobilis* cataboliza substratos com altas taxas específicas de carbono e resulta em baixos rendimentos de biomassa isso se deve porque a maior parte deste substrato é incorporado no catabolismo do produto final, o etanol (TOMA *et al.*, 2003);

Condições simples para seu crescimento, e possui características primordiais referente a um microrganismo de fermentação alcoólica que é a alta tolerância ao açúcar e a resistência a altas concentrações de etanol comparadas às tradicionais leveduras. (SPRENGER, 1996);

Em estudos comparativos para a produção de etanol entre a bactéria *Zymomonas mobilis* e a levedura *Saccharomyces carlsbergensis* foram observados uma série de vantagens na fermentação com *Zymomonas* em relação à levedura, entre elas: a bactéria apresenta aproximadamente o dobro de velocidade de crescimento, produz etanol numa velocidade seis a sete vezes maiores e o fator de conversão de glicose em etanol é 5% maior e esse microrganismo não requer controle adicional de oxigênio para manter sua viabilidade em altas concentrações de células, essa capacidade sugere seu uso em processos de fermentação contínuo para a produção comercial de etanol. (ROGERS *et al.*, 1980); Os detalhes desses resultados citados acima podem ser observados na TAB. 5.

**Tabela 5.** Estudo comparativo entre a bactéria *Zymomonas mobilis* e a levedura *Saccharomyces carlsbergensis* utilizando um meio de cultura com uma concentração inicial de glicose de 100,0 g/L com relação à produção de etanol.

	<i>Zymomonas mobilis</i>	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>
Tempo de processo (h)	2,51	5,64
$\mu_p$ ( $h^{-1}$ )	5,44	0,82
$Y_{x/s}$	0,028	0,043
$Y_{p/s}$	0,465	0,460

Velocidade específica de produção de etanol ( $\mu_p$ ), fator de conversão de glicose em células ( $Y_{x/s}$ ) e em etanol ( $Y_{p/s}$ ).

**Fonte:** Rogers *et al.* (1984).

- Maior tolerância a variações de pH e a elevadas temperaturas, segundo Ernandes e Cruz (2009), tolera pH entre 2,5 e 7,5 porém a produção de etanol é favorecida numa faixa de pH entre 4,5 e 7,0, sendo que o pH ideal para o crescimento varia de acordo com a cepa da bactéria utilizada;
- A fermentação da bactéria *Zymomonas mobilis* produz a partir de 1 mol de glicose, 1,6 de etanol, 1,8 moles de CO<sub>2</sub> gerando pequena quantidade de outros subprodutos como lactato, acetaldeído, ácido acético, glicerol, acetoína, dihidroxicetona, sorbitol, manitol, levana e ácido glicônico. E, se cultivadas em meio complexo, podem converter 98% da glicose presente em etanol, CO<sub>2</sub>, lactato e outros, seguindo um balanço metabólico simples, pois apenas 2% da glicose são utilizados para formar biomassa (ERNANDES, *et al.*, 2010);
- Wisbeck (1997) relata em trabalhos realizados com diferentes linhagens desta bactéria, rendimentos em etanol superiores a 90%;
- E mesmo em regime descontínuo são encontrados na literatura, utilizando glicose como fonte de carbono, apesar da inibição causada pela concentração de substrato, altas concentrações de etanol podem ser obtidas passando dos 95% (ROGERS *et al.*, 1982).

#### **Desvantagens:**

- A principal desvantagem da utilização da bactéria *Zymomonas mobilis* na produção de etanol apontada por muitos pesquisadores é a pequena faixa de tipos de substrato, utilizando apenas sacarose, glicose e frutose como fonte de carbono, apesar de sua alta capacidade fermentativa (SPRENGER, 1996);

- Um dos fatores mais importante em processos fermentativos industriais é a elaboração de meios de cultivo de baixo custo. O melaço de cana-de-açúcar é um subproduto da indústria do açúcar, sendo utilizado para a produção de etanol por algumas usinas por apresentar uma alta concentração de sacarose, além de outras substâncias importantes para processos fermentativos (RHEE *et al.*, 1984). Pesquisas utilizando esse substrato constataram diminuição da produção de etanol, uma das razões pode ter sido causada pelo excesso de fonte de nitrogênio. A Tabela 6 mostra o efeito da concentração inicial de açúcar na produção de etanol por várias linhagens de *Zymomonas mobilis*. Entretanto, a alta concentração de extrato de levedura proporcionou um aumento na concentração de biomassa, uma vez que a *Zymomonas* utiliza esse composto não apenas como fonte de nitrogênio, mas também como blocos para biossíntese, implicando em uma menor necessidade de energia, o que justificaria a diminuição na produção de etanol e, conseqüentemente, a menor formação de ATP (NETO, *et al.*, 2005);

**Tabela 6.** Efeito da concentração inicial de açúcar sobre a produção de etanol por várias linhagens de *Zymomonas mobilis*.

Açúcar inicial	Produção de etanol	Rendimento teórico
(% v/v)	(% v/v)	(%)
3	1-25	65-1
5	2-0	62-5
7	2-5	55-8
10	3-05	47-66
15	3-35	34-9

**Fonte:** Gunasekaran, Karanakaran e Kasthuribai (1986).

- Para Ernandes e Cruz (2009) ao utilizar sacarose como carboidrato para a fermentação houve uma diminuição no rendimento fermentativo, segundo os autores isto é devido, à formação de subprodutos como levana e sorbitol. Segundo Loos (1994), afirma que a sacarose ou mistura de glicose e frutose levam a formação desses subprodutos, pois, a frutose, formada da hidrólise da sacarose, não é primariamente transportada para o interior das células, mas sim utilizada na formação de levana e frutooligômeros pela ação da enzima

levanasacarase, o que representa um rendimento de etanol de 75-80% do valor teórico, o que antes ultrapassava o valor de 95%;

- Ernandes, *et al.* (2010) apontam como responsáveis pela inibição da fermentação a presença de outros compostos químicos no meio de fermentação, como ácido acético, fórmico ou propiônico, furfural, fenol, indol, nitratos, clorofenolatos, ácidos alifáticos, aromáticos etc.;
- Ernandes e Cruz (2009) ainda descrevem o problema com processo em batelada, mesmo utilizando glicose a alta concentração desse substrato leva a significativa redução da produtividade;
- Tano e Buzato (2003) também observaram que alguns dos componentes presentes no caldo de cana-de-açúcar inibem o crescimento e a fermentação por *Zymomonas mobilis*, eles sugerem que os níveis relativamente elevados de alguns sais inorgânicos, apresentam um efeito inibidor significativo na fermentação, especialmente cloreto de potássio e alguns íons como cálcio e magnésio, além da competição de outros microrganismos que progrediram nele. Borsari (2004) afirma através de suas pesquisas que a adição de caldo de cana de açúcar não foi estatisticamente significativa para formação de levana, mas estimulou a produção de biomassa, sorbitol e etanol. Vigants *et al.* (1996) também aponta que a inibição do crescimento e o decréscimo na formação de etanol ocorrem pelo íon sódio, acrescentando ainda que o íon cloreto é responsável pela formação de filamentos em *Zymomonas mobilis*. Vários estudos têm descrito que, na permeabilização celular, os cofatores solúveis essenciais para a conversão de ácido glucônico em etanol são liberados, cessando a formação de etanol (CHUN e ROGERS, 1998);
- Porém para Ernandes, *et al.* (2010), é difícil poder determinar qual ou quais componentes provocam inibição do crescimento ou desvio metabólico da bactéria *Zymomonas mobilis*, pois o caldo de cana, após ser fermentado, também pode apresentar grande diversidade na sua composição química, dificultando essa determinação.

#### **Possíveis soluções para as desvantagens:**

- Em relação ao problema com altas concentrações iniciais de glicose, no processo em batelada que estaria levando a significativa redução da produtividade devido

à inibição pelo substrato, Erzinger (1996) mostrou que este problema pode ser resolvido pelo uso de fermentação em regime descontínuo alimentado, onde haveria um maior controle na quantidade do substrato;

- A levana um dos principais subprodutos que diminui o rendimento da produção do etanol é formada através de reações de transfrutossilacção e é constituída, basicamente, de unidades de frutose ligadas em  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 6). A *Zymomonas mobilis* é um dos vários grupos de bactérias que a sintetizam, em um meio fermentativo à base de sacarose, extrato de levedura e sais minerais, características de um substrato de uma indústria produtora de etanol. Porém esse subproduto tem valores comerciais, na indústria de alimentos. A levana pode ser empregada como fixador de cores e sabores, espessante e estabilizante em géis para sobremesas, em temperos prontos para salada, em pudins, sorvetes e derivados do leite, em bebidas, coberturas para produtos de confeitaria e ainda como invólucro de embutidos. Nos alimentos funcionais, também conhecidos como produtos probióticos, a levana representa um eficiente aditivo que pode influenciar de modo benéfico o funcionamento do trato intestinal e, conseqüentemente, o balanço nutricional do organismo humano. Além disso, sua hidrólise produz frutose que tem poder adoçante superior à sacarose (ERNANDES e CRUZ, 2005);
- Segundo Oliveira, *et al.* (2004), quando as células de *Zymomonas mobilis* são colocadas em alta concentração de açúcares elas passam por condições de estresse, a enzima Glicose-frutoseoxirredutase (GFOR) fornece à célula uma alta concentração de sorbitol (um novo soluto para a célula), para contrapor os efeitos de desidratação provocada pela alta osmolaridade externa (SPRENGER, 1996). O sorbitol protege a célula contra o estresse salino até 2%, pois nessa condição a bactéria é incapaz de crescer (LOOS; *et al.*, 1994). Mas assim como a levana, o sorbitol apresenta uma ampla aplicação nas indústrias de alimentos, cosméticos, têxtil e farmacêutica (OLIVEIRA, *et al.*, 2004).

## 8. CONCLUSÃO

A partir da Revolução Industrial a intensificação do consumo de combustíveis fósseis tomou um rumo irreversível. Sem pensar nas conseqüências o ser humano está causando danos ao meio ambiente e conseqüentemente a si próprio, o fato é que a geração de energia por essa via é finita e tende ao seu esgotamento. A conscientização das pessoas tem impulsionado pesquisas e desenvolvimento de novas tecnologias no mundo todo, fazendo com que haja reestruturação da tradicional indústria para geração de energias renováveis, focando em uma sustentabilidade econômica e ambiental.

Os estudos relacionados com microrganismos para obtenção de biocombustíveis além de sustentabilidade têm procurado utilizar 100% de sua matéria-prima para que não haja perda de energia. Sabe-se que no Brasil a produção de etanol de cana-de-açúcar empregando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* utiliza apenas um terço de sua energia total, desperdiçando mais da metade com a queima do bagaço.

Neste contexto, a fermentação com novos microrganismos está tendo destaque no cenário mundial. Conclui-se com este trabalho que a fermentação alcoólica utilizando a bactéria *Zymomonas mobilis*, principalmente quando se usa glicose como matéria-prima apresenta inúmeras vantagens devido às altas taxas de produção de etanol, a tolerância do microrganismo em altas concentrações de substrato e produto, produção em uma maior faixa de variações de temperatura e pH, além de ser mais fácil de manipular geneticamente.

O que ainda precisa ser melhorado é a produção de etanol utilizando essa bactéria quando o substrato é a sacarose, matéria-prima mais abundante nas indústrias sucroalcooleiras no Brasil, pois há uma diminuição na produtividade da fermentação pela geração de subprodutos como a levana e o sorbitol, mesmos estes tendo valores comerciais o foco é o biocombustível. Mas se sabe com essa revisão de literatura que novos processos estão sendo desenvolvidos, o que ainda falta é investimentos por parte

do governo, dos próprios empresários e donos de usinas para que haja um incentivo de pesquisas nesta área.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTERTHUM, F. **Elementos de microbiologia**. Biotecnologia Industrial – Fundamentos. Vol. 1. Edgard Blucher Ltda. São Paulo, 2001.

Açúcar Guarani. **Como medir os benefícios ambientais do projeto da Guarani?** 2005. Disponível em: <<http://www.acucarguarani.com.br>>. Acesso em 02 de set. de 2010.

BAI, F. W; ANDERSON W. A.; MOO-YOUNG, M. **Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks**. *Biotechnology Advances* 26, 89 – 105, 2008.

BELAICH, J. P.; SENEZ, J. C. **Influence of aeration and of pentothenate on growth of *Zymomonas mobilis***. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 89, p. 1195-1200, 1965.

BORSARI, R. R. J. **Avaliação das diferentes condições de cultivo para a produção de levana por CP4**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2004.

BUCKLEY, M.; WALL, J. **Microbial energy conversion**. American Society for Microbiology, 2006.

CARR, J. G.; PASSMORE, S. M. **Discovery of the “cider-sickness” bacterium *Zymomonas anaerobia* in apple pulp**. *Journal of the Institute of Brewing*, London, v. 77, p. 462-466, 1971.

CARR, J. G. Genus *Zymomonas*. In: \_\_\_\_\_. *Bergey's: Manual of determinative bacteriology*. 8. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1974, p. 8-21.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento da Cana-de-açúcar**. Embrapa. 2004.

CHUN, U. H.; ROGERS, P. L. **The simultaneous production of sorbitol from fructose and gluconic acid from glucose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis***. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 29, n. 1, p. 19-24, 1998.

CORRÊA, P. M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926. v. 1, Cap. 13.

CROMIE, S.; DOELLE, H. W. **Relationship between maintenance energy requirements, mineral salts and efficiency of glucose to ethanol conversion by *Zymomonas mobilis***. *Biotechnology Letters*, Kew, England, v. 2, p. 357- 362, 1980.

DADDS, M. J.; MARTIN, P. A. **The genus *Zymomonas* a review**. *Journal of the Institute of Brewing*, London, v. 79, p. 386-391, 1973.

DIEHL, F. C. **Análise, Controle e Otimização Operacional de um Reator de *Zymomonas mobilis* com Multiplicidade de Equilíbrios**. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre, 2009.

DOELLE, H. W.; KIRK, L.; CRITTENDEN, R.; TOH, H. ***Zymomonas mobilis* – Science an industrial application**. *Critical Reviews in Biotechnology*, London, v. 13, p. 57- 98, 1993.

ERZINGER, G. S. **Influência da concentração de glicose e etanol sobre a atividade de glicose-frutose oxidoreductase em *Zymomonas mobilis* ATCC 29191**. 1996. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ERNANDES, F. M. P. G. BOSCOLO, M. CRUZ, C. H. G. **Influência da composição do meio para a produção de etanol, por *Zymomonas mobilis***. Maringá, v. 32, n. 1, p. 21-26, 2010. Disponível em: <periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciTechnol/article/viewFile/.../7454>. Acesso em: 16 de ago. de 2010.

ERNANDES, F. M. P. G. CRUZ, C. H. G. **Levana Bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 26, n. 1, p. 71-82, jan./mar. 2005. Disponível em: <http://www.ibilce.unesp.br/departamentos/eng/crispin/Levana\_Bacteriana.pdf>. Acesso em: 16 de ago. de 2010.

ERNANDES, F. M. P. G. CRUZ, C. H. G. ***Zymomonas mobilis*: um microrganismo promissor para a fermentação alcoólica**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 30, n. 2, p. 361-380, abr./jun. 2009. Disponível em: <www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/viewFile/.../2249>. Acesso em: 16 de ago. de 2010.

ERNANDES, F. M. P. G. **Produção de levana por *Bacillus subtilis* e *Zymomonas mobilis* utilizando três meios de cultura sintéticos e um alternativo (caldo de cana-deaçúcar)**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

FALCÃO DE MORAIS, J. O. **Isolamento de *Zymomonas mobilis* em mostos de caldo de cana de fermentações industriais**. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 14, p. 6-10, 1983.

FALCÃO DE MORAIS, J. O.; RIOS, E. M. M. M.; CALAZANS, G. M. T.; LOPES, C. E. ***Zymomonas mobilis* research in the Pernambuco Federal University**. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v. 31, p. 75-91, 1993.

FRIGIERI MC, THOMPSON GM, PANDOLFI JR, ZANELLI CF, VALENTINI SR. **Use of a synthetic lethal screen to identify genes related to *TIF51A* in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Genet Mol Res.* Mar 28;6(1):152-65. 2007

FRIGIERI MC, JOÃO LUIZ MV, APPONI LH, ZANELLI CF, VALENTINI SR. **Synthetic lethality between eIF5A and Ypt1 reveals a connection between translation and the secretory pathway in yeast.** *Mol Genet Genomics* 280(3):211-21. 2008.

GIBBS, M.; DEMOSS, R. D. **Anaerobic dissimilation of C<sup>14</sup>, labelled glucose and fructose by *Pseudomonas lindneri*.** *Journal of Biology Chemistry*, Bethesda, v. 207, p. 689-694, 1954.

GONÇALVES DE LIMA, O.; ARAÚJO, J. M.; SCHUMACHER, I. E.; SILVA, E. C. **Estudos de microrganismos antagonistas presentes nas bebidas fermentadas usadas pelo povo do Recife.** *Revista do Instituto de Antibióticos*, Recife, v. 10, p. 3-15, 1970.

INGRAM, L. O.; BUTTKE, T. M. **Effects of alcohols on microrganismos.** *Advance Microbiology and Physiology*, Bethesda, v. 25, p. 256-300, 1984.

JEREZ, M. C. D. **Estudo comparativo de diferentes métodos e condições de fermentação de melaço de cana- de- açúcar por *Zymomonas mobilis*.** 1993. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

LEÃO, R. M. **Fermentação alcoólica – Ciência e tecnologia.** Fermentec. Piracicaba, 2005.

LOOS, H.; KRÄMER, R.; SAHM, H.; SPRENGER, G. A. **Sorbitol promotes growth of *Zymomonas mobilis* in environments with high concentrations of sugar: Evidence for a physiological function of glucosefructose oxidoreductase in osmoprotection.** *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 176, p. 7688-7693, 1994.

KHALILI, A. E. **Quem será beneficiado pelos créditos de carbono?** Revista Eletrônica Comciência. Disponível em: <<http://www.comciencia.br>>. Acesso em 10 de set. 2010.

KOSARIC, N.; VARDAR-SUKAN, F. **Potential source of energy and chemical products.** The biotechnology of ethanol: classical and future applications. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2001.

LEHNIGER, A. L. **Princípios de bioquímica.** São Paulo: Edgard Bluncher, 2002.

LYNESS, E. W.; DOELLE, H. W. **Effect of temperature on sucrose to ethanol conversion by *Zymomonas mobilis* strains.** *Biotechnology Letters*, Kew, England, v. 2, p. 549-554, 1980.

MACEDO, I. C.; LEAL, M. R. L. V.; SILVA, J. E. A. R. **Balanco das emissões de gases do efeito estufa na produção e no uso do etanol no Brasil.** São Paulo-SP: Governo do Estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, 2004.

MacMARTIN, A. The role of the Portuguese in the early establishment of cane sugar industries. **Agromonia Moçambicana**, Lourenço Marques, v.5, pág 211-218, 1971.

MEDIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms.** 9 ed. Prentice Hall. Inc. Upper Saddle River, New Jersey, 2000.

MENEGUELLO, L. A.; CASTRO, M. C. A. A. **O Protocolo de Kyoto e a geração de energia elétrica pela biomassa da cana-de-açúcar como mecanismo de desenvolvimento limpo.** Araraquara, 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S151870122007000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151870122007000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 02 de set. de 2010.

MILLIS, N. F. **A study of the cider-sickness *Bacillus*: a new variety of *Zymomonas anaerobia*.** *Journal of General Microbiology*, London, v. 15, p. 521-528, 1956.

MIRANDA, L. L. D.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. **Cana-de-açúcar**. Campinas, S.P. 2008.

MOZAMBANI, A. E.; PINTO, A. S.; SEGATO, S. V.; MATTIUZ, C. F. M. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba, 2006.

NAJAFPOUR, G. D. *Biochemical engineering and biotechnology*. 1 ed. Elsevier B. V., Amsterdam, 2007.

NETO, D. C.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C.; OLIVEIRA, M. R. **Otimização da produção de etanol por *Zymomonas mobilis* na fermentação do melaço de cana-de-açúcar**. Semina: Ciências Exatas e Tecnológica, Londrina, v. 26, n.1, p. 17-22, jan./jun. 2005.

OLIVEIRA, M. R.; CELLIGOI, M. A. P. C.; BUZATO, J. B.; SILVA, R. S. S. F. **Estudo Experimental da Produção de Sorbitol por *Zymomonas mobilis* em Altas Concentrações de Sacarose**. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 25, n. 2, p. 197-202, jul./dez. 2004. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semexatas/article/view/1574/1325>>. Acesso em: 12 de out. de 2010.

PEARCE, F. **O aquecimento global**. São Paulo-SP: Publifolha, 2002. 72p.

PORTO, L. M. **Modelagem de processo industrial de fermentação alcoólica contínua com reatores de mistura ligados em série**. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

RHEE, S. K.; PAGAN, R. J.; LEFEBVRE, M. F.; ROGERS, P. L. **Ethanol production from desalted molasses using *Saccharomyces* and *Zymomonas mobilis***. *Journal of Fermentation Technology*, Osaka, v. 62, p. 297-300, 1984.

SCHELEDER, E. M. M. **A Questão do Álcool Combustível**. Departamento Nacional de Desenvolvimento Energético – DNDE. Brasília, 1998.

TANO, M. S.; BUZATO, J. B. **Fermentação contínua usando baixa concentração de açúcar da cana e *Zymomonas mobilis* CP4 para produção de etanol**. Semina: Ci. Exatas Tecnol., Londrina, v. 22, p. 47-50, dez. 2001.

TOMA, M. M.; KALNENIEKS, U.; BERZINS, A.; VIGANTS, A.; RIKMANIS, M.; VIESTURS, U. **The effect of mixing on glucose fermentation by *Zymomonas mobilis* continuous culture**. *Process Biochemistry*, London, v. 38, p. 1347-1350, 2003.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8.ed. São Paulo: Artmed, 2005.

ROACH, B. T.; DANIELS, J. **A review of the origin and improvement of sugarcane**. In: COPERSUCAR INTERNATIONAL SUGARCANE BREEDING WORKSHOP, 1987. Piracicaba: Copersucar, 1987. P. 1-31.

ROCHA, M. T. **Aquecimento global e o mercado de carbono: uma aplicação do modelo CERT. 2003. 214 f.** Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2003.

ROGERS, P. L.; LEE, K. J.; SKOTNICKI, M. L.; TRIBE, D. E. **Ethanol production by *Zymomonas mobilis***. *Advances in Biochemical Engineering*, New York, v. 23, p. 37-84, 1982.

ROSENTHAL, E. Scientists are taking second look at biofuels – **Dutch efforts verge on nightmare**. *International Herald Tribune*, 2007.

SACHS, I. **A revolução energética do século XXI**. São Paulo, 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010340142007000100004&script=sci\\_arttext&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010340142007000100004&script=sci_arttext&lng=en)>. Acesso em: 04 de set. de 2010.

SCARPARI, M. S. **PREDPOL: um modelo de previsão da maturação da cana-de-açúcar visando planejamento otimizado.** 2007. 120 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

SCARPINELLA, G. A. Reflorestamento no Brasil e o Protocolo de Quioto. 2002. 162 f. Dissertação (Mestrado) Programa Interunidades de Pós Graduação em Energia, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2002.

SEGATO, S. V.; PINTO, A. S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J. C. M. **Atualização em produção de cana-de-açúcar.** 2006.

SPRENGER, G. A. **Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes.** *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 145, p. 301-307, 1996.

SWINGS, J.; DE LEY, J. **The biology of *Zymomonas*.** *Bacteriological Reviews*, Baltimore, v. 41, p. 1-46, 1977.

UNFCCC - United Nations Framework Convention on Climate Change **"Toll for the demonstration and assessment of additionality"**. 2004. 9f. United Nations.

ÚNICA. **Setor Sucroenergético – Histórico.** Disponível em: <<http://www.unica.com.br/content/show.asp?cntCode=9E97665F-3A81-46F2-BF69-26E00C323988>>. Acesso em: 25 de set. de 2010.

VIGANTS, A.; ZIKMANIS, P.; BEKERS, M. **Sucrose medium osmolality as a regulator of anabolic and catabolic parameters in *Zymomonas* culture.** *Acta biotechnologica*, v. 16, n. 4, p. 321-327, 1996.

WISBECK, E.; SILVEIRA, M. M.; NINOW, J.; JONAS, R. **Evaluation of the flocculent strain *Zymomonas mobilis* ZI-81 for the production of sorbitol and gluconic acid.** *Journal Basic of Microbiology*, Berlin, v. 6, p. 445- 449, 1997.