

Influência da composição do meio para a produção de etanol, por *Zymomonas mobilis*

Fernanda Maria Pagane Guerreschi Ernandes^{1*}, Maurício Boscolo² e Crispin Humberto Garcia Cruz¹

¹Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual Paulista, Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. ²Departamento de Química e Ciências Ambientais, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: fernandaer@ig.com.br

RESUMO. A bactéria *Zymomonas mobilis* tem despertado 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*. A influência do pH, da temperatura, assim como a composição do meio de fermentação, são parâmetros que podem direcionar o metabolismo para a produção de etanol. O trabalho teve, como objetivo, avaliar a produção de etanol pela bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494, por meio da variação do pH, da temperatura e das concentrações de KCl, K₂SO₄, MgSO₄, CaCl₂ e sacarose, seguindo planejamento fatorial do tipo 2⁷⁻², de acordo com o modelo proposto por Box et al. (1978). Foi utilizado, como única fonte de carbono, o caldo de cana-de-açúcar, por ser barato e de fácil acesso na região de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo. De acordo com o planejamento experimental, a bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494 se adaptou no meio de fermentação que continha altas concentrações de sacarose, bem como suportou a variação do pH e da temperatura de fermentação. A maior produção de etanol foi de 8,89 mg mL⁻¹ e, de todas as variáveis testadas, apenas K₂SO₄ afetou significativamente ($p < 0,05$) sua produção.

Palavras-chave: *Zymomonas mobilis*, etanol, fermentação alcoólica, planejamento fatorial.

ABSTRACT. Influence of medium composition in the production of ethanol by *Zymomonas mobilis*. The production of ethanol using *Zymomonas mobilis* had been reported to be three to four times larger than with *Saccharomyces cerevisiae*. The influence of pH, temperature and composition of the means of fermentation are parameters that can direct the metabolism for the production of ethanol. The objective of this study was to evaluate the production of ethanol by *Zymomonas mobilis* CCT 4494, by variations of the initial pH, temperature and concentrations KCl, K₂SO₄, MgSO₄, CaCl₂ and sucrose, by a factorial experimental design of type 2⁷⁻², according to the model proposed by Box et al. (1978). For this, the broth of sugar cane was used as sole carbon source, because it is cheap and easily accessible in the region of São José do Rio Preto, São Paulo State. According to the experimental design, the bacteria *Zymomonas mobilis* CCT 4494 has adapted in the fermentation mean containing high concentrations of sucrose, and supported the change of pH and temperature of fermentation. The highest amount of ethanol produced was 8.89 mg mL⁻¹. This is not similar to the levels of secondary metabolites produced by *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

Key words: *Zymomonas mobilis*, ethanol, ethanol fermentation, factorial design.

Introdução

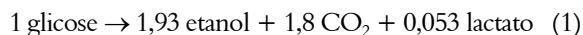
Embora os agentes de fermentação alcoólica mais utilizados sejam as leveduras, principalmente as do gênero *Saccharomyces*, existem estudos para selecionar outros microrganismos capazes de desdobrar carboidratos na produção de álcool.

As bactérias alcoólicas da espécie *Zymomonas mobilis* apresentam atributos tecnológicos que potencializam o seu emprego na fermentação

alcoólica em escala industrial, pois possuem habilidades promissoras de transformar açúcares em etanol e gás carbônico, em condições comparáveis àquelas exigidas pelas leveduras. Possuem, ainda, produtividade em etanol a partir de glicose acima de 97% do valor teórico máximo (SPRENGER, 1996).

Gibbs e DeMoss (1954) demonstraram que essa bactéria utiliza, para o catabolismo anaeróbio desses carboidratos, modificação da via de Entner-Duodoroff, podendo produzir mais do 1,9 mol de etanol por mol

de glicose fermentada e pequena quantidade de lactato, de acordo com a seguinte reação:



As condições simples para seu crescimento, a alta tolerância ao açúcar e a resistência a altas concentrações de etanol tornariam o microrganismo sério concorrente para as tradicionais leveduras, não fosse a pequena faixa de tipos de substrato, apesar de sua alta capacidade fermentativa. *Zymomonas mobilis* apresenta funções de cadeia de transporte de elétrons e bom crescimento em ambientes microaeróbicos, ocupando posição taxonômica claramente próxima dos organismos aeróbios *Glucanobacter* e *Acetobacter* (SPRENGER, 1996).

Rogers et al. (1984) realizaram estudos comparativos entre a bactéria *Zymomonas mobilis* e a levedura *Saccharomyces carlsbergensis* em relação à produção de etanol. Nesses estudos, os autores observaram uma série de vantagens na fermentação com *Zymomonas* em relação à levedura. Esta bactéria apresenta, aproximadamente, o dobro de velocidade de crescimento, produz etanol numa velocidade seis a sete vezes maior e o fator de conversão de glicose em etanol é 5% maior. Além disso, *Zymomonas mobilis* não requer controle adicional de oxigênio para manter sua viabilidade em altas concentrações de células (ROGERS et al., 1980). A capacidade dessa bactéria de crescer rapidamente na ausência de oxigênio sugere seu uso em processos de fermentação contínuo para a produção comercial de etanol.

Segundo Lyness e Doelle (1980), a fermentação quase quantitativa de glicose, frutose ou sacarose a etanol e dióxido de carbono é considerada característica importante do gênero *Zymomonas*. Quando glicose e frutose são utilizadas como fonte de carbono, é obtido rendimento superior a 95% em relação ao rendimento teórico, pois a fermentação produz quase exclusivamente etanol e CO₂. Quando sacarose, um substrato industrialmente disponível e de baixo custo é utilizado, e o rendimento de etanol representa 75-80% do valor teórico, pela formação de subprodutos como levana e sorbitol.

Dada a importância dos carboidratos no metabolismo de qualquer via celular, não é por acaso que eles são a principal matéria-prima nas fermentações. Devem estar presentes compostos nitrogenados, além de prebióticos (fatores de crescimento), como vitaminas e coenzimas. Também é indispensável a presença de fósforo, sob a forma de fosfatos, o qual costuma ser adicionado aos meios em que exerce ação tamponante ou inibidora de flutuações de pH (TANO; BUZATO, 2003).

Várias pesquisas estão sendo desenvolvidas para aumentar o rendimento de etanol juntamente com o emprego de técnicas mais econômicas de produção, recuperação e purificação, visando diminuir o custo total do processo. Em nível experimental, utilizam-se substratos de baixo custo, tais como sacarose, amido, amido hidrolisado, xarope de milho e melaços residuais da indústria açucareira.

Diversos subprodutos e matérias-primas da indústria de alimentos e/ou da agroindústria têm sido empregados para o crescimento de microrganismos, pela alta disponibilidade e pelo baixo custo. De acordo com o Relatório de Produção Agrícola do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2007 a cultura da cana-de-açúcar no Brasil cresceu 7% em relação ao ano anterior. O Estado de São Paulo, onde a produção de cana é mais relevante, corresponde à cerca de 60% de toda a produção nacional.

Diante dos fatores geográficos vantajosos para o plantio da cana-de-açúcar no Brasil, justifica-se que o caldo da cana, obtido da cana-de-açúcar, destaca-se como fonte alternativa para a produção de etanol a baixo custo, por ser abundante e de fácil disponibilidade, não só no país como na região de São José do Rio Preto, pertencente ao Estado de São Paulo. A cana-de-açúcar é, ainda, considerada matéria-prima adequada para as fermentações com *Zymomonas mobilis* em virtude de sua composição química (alto teor de açúcares, nitrogênio, vitaminas e sais minerais).

Material e métodos

Materiais e equipamentos

Neste trabalho foi utilizada uma cultura de bactérias *Zymomonas mobilis* CCT 4494, adquirida da Coleção de Culturas Tropicais (CCT) da Fundação André Tosello - Pesquisa e Tecnologia de Campinas, Estado de São Paulo. Essa cultura foi mantida em meio de manutenção e estocada a 4°C. O substrato utilizado para produção de etanol foi um preparado de Caldo de Cana-de-açúcar Clarificado (CCC). Utilizando-se refratômetro modelo Carl Zeiss, esse caldo foi ajudado em diferentes concentrações de sólidos totais (50; 150 e 250 g L⁻¹), sendo, em seguida, autoclavado.

A concentração celular, utilizada como inóculo, foi determinada por espectrofotometria. O espectrofotômetro utilizado para determinações fotométricas foi o modelo Cintra 5 UV-VIS *DoubleBeam*. As determinações de pH foram feitas em pHmetro Digimed modelo DM20.

A fermentação submersa se processou a 200 rpm e por 24h, em um shaker Marconi, modelo MA 830,

com controle de temperatura. Para o planejamento experimental, utilizou-se o software *Statística 7.0* (StatSoft), a partir de um delineamento do tipo 2^{7-2} . As variáveis independentes foram: X_1 = pH do meio de cultivo; X_2 = temperatura em °C; X_3 = KCl em g L⁻¹; X_4 = K₂SO₄ em g L⁻¹; X_5 = MgSO₄ em g L⁻¹; X_6 = CaCl₂ em g L⁻¹ e X_7 = Teor de Sólidos Totais (TST) g L⁻¹ (Tabela 1). Todos os reagentes utilizados (HCl; NaOH; KCl; K₂SO₄; MgSO₄ e CaCl₂) foram de grau analítico (Sigma-Aldrichi, EUA). As respostas analisadas foram produção de biomassa (Y_1) e etanol (Y_2) (Tabela 2). A determinação do etanol foi realizada em Cromatógrafo - HP-5890, Série II - detector FID (Flame Ionization Detector).

Tabela 1. Variáveis independentes, codificadas, estudadas na produção de etanol pela bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
X_1 - pH	4	6	8
X_2 - T°C	20	30	40
X_3 - KCl	5,0	11,5	18,0
X_4 - K ₂ SO ₄	5,0	11,5	18,0
X_5 - MgSO ₄	5,0	12,5	20,0
X_6 - CaCl ₂	1	6	11
X_7 - TST	50	150	250

Métodos

A cepa foi ativada por esgotamento em tubos inclinados, mantidos a 30°C, por 24h. Após esse período, foi feito um pré-inóculo, que continha 2% de sacarose (Sigma-EUA), como única fonte de carbono, e meio de nutrientes proposto por Rodriguez e Callieri (1986). O pré-inóculo foi mantido a 30°C, por 24h a 200 rpm. Foi utilizado, como inóculo da fermentação, um volume de pré-inóculo, de tal forma que a fermentação apresentasse concentração celular inicial de 0,28 mg mL⁻¹.

Assim como na determinação do inóculo inicial, na interrupção do cultivo a biomassa também foi determinada por espectrofotometria. O restante do meio líquido celular foi centrifugado a 3.100 g, a 4°C, durante 15 min. O sobrenadante obtido na centrifugação foi encaminhado para as determinações analíticas de: pH, Açúcares Totais (AT) (DUBOIS et al., 1956), Açúcares Redutores (AR) (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1952) e etanol.

Resultados e discussão

O delineamento experimental adotado (2^{7-2}), proposto inicialmente por Box et al. (1978), tem sido utilizado em sistemas que envolvem múltiplas variáveis independentes. Esse método de planejamento experimental tem sido utilizado por

diversos autores (OLIVEIRA et al., 2004; NETO et al., 2005; 2006; BORSARI et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007). A matriz do delineamento experimental adotado neste trabalho, mostrado na Tabela 2, ilustra as 32 combinações realizadas, pelo método, com a adição de três repetições no ponto central, indicadas pelas corridas 33, 34 e 35.

Tabela 2. Delineamento experimental em que X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 são, respectivamente, pH inicial, Temperatura (°C), KCl, K₂SO₄, MgSO₄, CaCl₂ e TST (g L⁻¹); Y_1 e Y_2 são etanol e biomassa (mg mL⁻¹).

Corridas	Variáveis independentes							Respostas	
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	Y_1	Y_2
01	1	1	1	-1	-1	1	-1	0,11	4,75
02	1	1	1	-1	-1	-1	1	0,16	5,09
03	-1	1	-1	1	-1	1	-1	0,86	4,48
04	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	3,38	0,58
05	1	1	-1	1	1	1	1	3,76	4,98
06	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	0,13	0,9
07	-1	1	1	1	-1	-1	-1	0,545	0,48
08	-1	-1	-1	1	1	1	1	0,32	0,98
09	1	-1	-1	-1	1	1	-1	0,08	4,95
10	1	1	1	1	1	1	-1	3,07	6,24
11	-1	-1	1	1	1	1	-1	2,90	0,56
12	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	0,10	6,62
13	1	-1	1	-1	1	-1	-1	0,06	3,99
14	-1	1	-1	-1	1	1	-1	0,51	0,97
15	1	1	1	1	1	-1	1	2,05	4,55
16	-1	1	1	1	-1	1	1	0,17	0,73
17	1	-1	-1	1	-1	1	-1	0,53	3,70
18	1	-1	-1	1	-1	-1	1	0,38	5,96
19	1	-1	1	1	-1	1	1	8,89	1,96
20	1	-1	-1	-1	1	-1	1	0,62	8,60
21	1	1	-1	-1	-1	1	1	0,64	8,00
22	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1,06	0,81
23	-1	1	-1	1	-1	-1	1	0,60	1,42
24	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	2,01	0,62
25	-1	-1	1	1	1	-1	1	0,53	0,51
26	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	0,91	1,81
27	-1	1	-1	-1	1	-1	1	0,81	0,94
28	1	1	-1	1	1	-1	-1	0,07	7,19
29	1	-1	1	-1	1	1	1	3,80	8,28
30	-1	1	1	-1	1	1	1	0,95	2,40
31	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	0,22	2,96
32	1	-1	1	1	-1	-1	-1	2,09	9,31
33*	0	0	0	0	0	0	0	0,93	7,70
34*	0	0	0	0	0	0	0	1,46	5,77
35*	0	0	0	0	0	0	0	3,17	5,18

*Pontos Centrais.

Pelo modelo estatístico proposto, foi possível calcular as estimativas dos efeitos, o grau de significância, as correlações entre as variáveis (p) e os coeficientes da regressão (Tabela 3). Segundo essa Tabela, para produção de etanol (Y_1), a variável independente X_4 (K₂SO₄) e as interações pH e KCl; pH e CaCl₂; pH e TST foram significativas ($p < 0,05$) e influenciaram de maneira positiva (Coeficiente > 0). Para a biomassa (Y_2), apenas a variável X_1 (pH) foi significativa. Entretanto, o baixo valor de p , encontrado para os interceptos (Y_1 e Y_2), indicou que os níveis foram bem escolhidos, e que os coeficientes de regressão da equação descrevem o experimento mais que 80% para ambos os casos ($r_{Y_1}^2 = 0,8775$ e $r_{Y_2}^2 = 0,8459$). O bom desempenho

do modelo adotado também pode ser confirmado por não haver desvio significativo de regressão, tanto para (Y_1 e Y_2) como para ($p > 0,05$).

Tabela 3. Tabela resumida com as estimativas dos efeitos, p e os coeficientes de regressão para as respostas: etanol (Y_1) e biomassa (Y_2).

Variáveis	Y_1		Y_2		p	Coeficientes
	Efeitos	p	Efeitos	p		
Intercepto*	1,368	0,000	1,368	3,942	0,000	3,942
X_1^*	0,657	0,153	0,329	4,814	0,000	2,407
X_2	-0,711	0,125	-0,356	-0,001	0,999	-0,001
X_3	0,698	0,132	0,349	-0,768	0,379	-0,384
X_4^*	1,122	0,026	0,561	-0,754	0,387	-0,377
X_5	0,350	0,427	0,175	0,109	0,899	0,054
X_6	0,820	0,083	0,410	-0,239	0,780	-0,119
X_7	0,445	0,318	0,223	0,181	0,832	0,091
$X_1X_3^*$	1,061	0,033	0,531	-0,461	0,592	-0,231
$X_1X_6^*$	1,100	0,028	0,550	-1,318	0,147	-0,659
$X_1X_7^*$	1,331	0,012	0,665	0,403	0,639	0,201

*Variáveis que influenciaram no processo fermentativo ($p < 0,05$).

Embora os valores de pH inicial tenham sido poucos inexpressivos para a produção de etanol, quando associados às variáveis KCl, CaCl_2 , TST, estas influenciaram o rendimento da produção. Para Tano e Buzato (2003), que avaliaram a produção de etanol em caldo de cana fermentado por *Zymomonas mobilis* com alta concentração inicial de açúcares ($150,0 \text{ g L}^{-1}$), alguns dos componentes presentes no caldo de cana-de-açúcar inibem o crescimento e a fermentação por *Zymomonas mobilis*. Os níveis relativamente elevados de alguns sais inorgânicos, especialmente cloreto de potássio e alguns íons como cálcio e magnésio, podem apresentar significativo efeito inibidor na fermentação alcoólica (HAN; WATSON, 1992; FALCÃO DE MORAIS et al., 1993; BEKERS et al., 2001). Tem sido descrito que o aumento da concentração de cloreto de sódio ou de potássio, no meio de cultivo, age, inibindo o crescimento celular ou diminuindo a produção de etanol. Vigants et al. (1996) relataram que a inibição do crescimento e o decréscimo na formação de etanol ocorrem pelo íon sódio, enquanto 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; ROGERS, 1998).

Entretanto, em nosso experimento, esse parâmetro aumentou a produção de biomassa, quando crescida em pH 8, chegando a valores superiores a $8,0 \text{ g L}^{-1}$. Apesar de o caldo de cana-de-açúcar ter propiciado condições favoráveis para o crescimento de *Zymomonas mobilis*, o mesmo não ocorreu para a formação de etanol. Resultados semelhantes também foram observados por Oliveira et al. (2007) que relata que, embora o caldo de cana-

de-açúcar produza em torno de 28,72% a menos de etanol em comparação à sacarose comercial, a produção de biomassa no caldo é 2,76 vezes maior que na sacarose comercial, o que poderia justificar produção acoplada de etanol e biomassa de *Zymomonas mobilis*.

A maior produção de etanol foi obtida sob as condições de cultivo de: 200 rpm por 24h; pH 8; Temperatura 20°C ; KCl 18 g L^{-1} ; K_2SO_4 18 g L^{-1} ; MgSO_4 , 5 g L^{-1} ; CaCl_2 11 g L^{-1} e TST 250 g L^{-1} . Este valor ainda é inferior aos relatados por outros autores como Rogers et al. (1982), que obtiveram produções de etanol superiores a 25 mg mL^{-1} com a mesma concentração do substrato utilizado em nosso trabalho. A Figura 1 apresenta dois cromatogramas correspondentes à produção de etanol referentes ao maior ($8,89 \text{ mg mL}^{-1}$) (corrida 19) e ao menor ($0,058 \text{ mg mL}^{-1}$) (corrida 13).

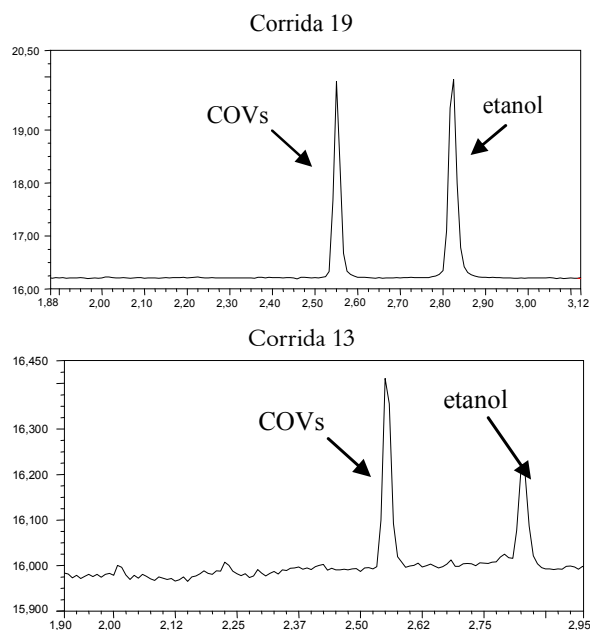


Figura 1. Cromatograma de Compostos Orgânicos Voláteis, obtido nos ensaios 19 e 13, utilizando-se o meio caldo de cana-de-açúcar, a partir de *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

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., podem ser responsáveis pela inibição da fermentação (FEIN et al., 1983). De acordo com a literatura, *Zymomonas mobilis* forma quantidades insignificantes de produtos secundários como acetaldeído, acetoína, ácido acético, glicerol, lactato, levana, manitol e sorbitol, e rendimentos altos em etanol. No entanto, dependendo do tipo de fermentação, os rendimentos em etanol podem ser reduzidos quando há

quantidades significativas de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs), liberados na fermentação (VIKARI; GISLER, 1986). Nos cromatogramas obtidos para determinação de etanol, podemos observar que, além da presença deste, há também outros compostos que, dependendo das condições fermentativas, apresentam-se em maiores ou menores concentrações em relação aos valores de etanol. A presença desses compostos pode justificar uma redução da produção de etanol, uma vez que há a possibilidade do desvio do metabolismo e também o efeito inibitório provocado por estes componentes. As Figuras 1 e 2 apresentam diferentes compostos (COVs e etanol), presentes no caldo de fermentação, que foi obtido após o processo fermentativo com *Zymomonas mobilis* CCT 4494 com o caldo de cana-de-açúcar.

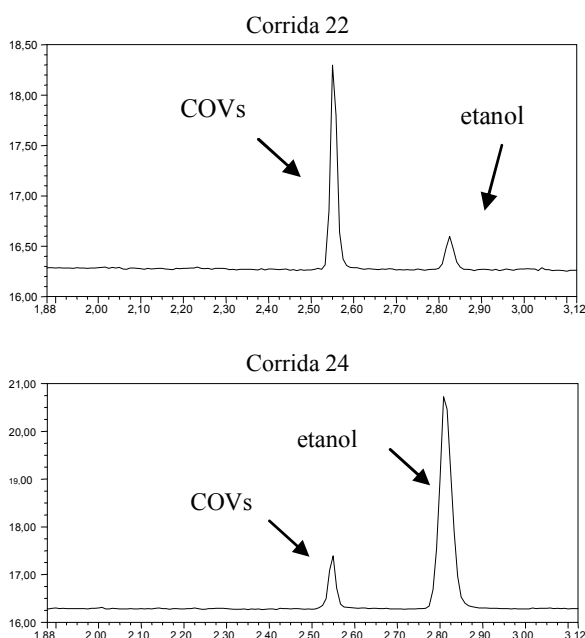


Figura 2. Cromatograma de Compostos Orgânicos Voláteis, obtidos em diferentes ensaios, utilizando-se o meio caldo de cana-de-açúcar, a partir de *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

Conclusão

O caldo de cana-de-açúcar apresenta grandes vantagens, por ser matéria-prima de baixo custo e disponível em grandes quantidades no Brasil. O uso de meios de cultivos com grandes concentrações de sais inorgânicos, assim como fontes de carbono, afetam diretamente a síntese de etanol, sendo a pressão osmótica parâmetro de extrema importância para o controle da produção de metabólitos microbianos. O caldo de cana, após a fermentação, também pode apresentar grande diversidade na sua composição química. Portanto, é difícil poder

determinar qual ou quais componentes provocam inibição do crescimento ou desvio metabólico da bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494. O modelo matemático proposto para o estudo da produção de etanol e biomassa pela bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494 apresentou-se satisfatório, pois conseguiu descrever mais de 80% do experimento. Contudo, ainda são necessários estudos mais detalhados da composição de meio, parâmetros físicos e químicos que viabilizem o uso de substratos alternativos, como o caldo de cana, para uso em biotecnologia, com correta suplementação com vitaminas e sais minerais.

Agradecimentos

À Fapesp, Fundação de Amparo a Pesquisa e ao CNPq, Conselho Nacional de Pesquisa, pelos auxílios recebidos para o desenvolvimento do trabalho.

Referências

- BEKERS, M.; LAUKEVICS, J.; KARSAKECICH, A.; VENTINA, E.; KAMINSKA, U. D.; VINA, I.; LINDE, R.; SCHERBAKA, R. Levan-ethanol biosynthesis using *Zymomonas mobilis* cells immobilized by attachment and entrapment. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 1, p. 979-986, 2001.
- BORSARI, R. R. J.; CELLIOGI, M. A. P. C.; BUZATO, J. B.; SILVA, R. S. S. F. Influence of carbon source and the fermentation process on levan production by *Zymomonas mobilis* analyzed by the surface response method. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 604-609, 2006.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building**. New York: John Wiley and Sons, 1978.
- 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.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K. Colorimetric method for determination sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- 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 Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 75-91, 1993.
- FEIN, J. E.; CHARLEY, R. C.; HOPKINS, K. A.; LAVERS, B.; LAWFORD, H. G. Development of a simple defined medium for continuous ethanol production by *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 1983.
- GIBBS, M.; DeMOSS, R. D. Anaerobic dissimilation of

- C14, labelled glucose and fructose by *Pseudomonas lindneri*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 27, n. 1, p. 689-694, 1954.
- HAN, Y. M.; WATSON, M. A. Production of microbial levan from sucrose, sugarcane juice end beet molasses. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 257-260, 1992.
- LYNESS, E. W.; DOELLE, H. W. Effect of temperature on sucrose to ethanol conversion by *Zymomonas mobilis* strains. **Biotechnology Letters**, v. 2, n. 1, p. 549-554, 1980.
- NELSON, N. A photometric adaptation of Somogy method for determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 153, n. 2, p. 375-380, 1944.
- NETO, D. C.; BUZATO, J. B.; CELLOGOI, M. A. C.; OLIVEIRA, M. R. Otimização da produção de etanol por *Zymomonas mobilis* na fermentação do melaço de cana-de-açúcar. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 1, p. 17-22, 2005.
- NETO, D. C.; BUZATO, J. B.; BORSATO, D. L. asparaginase production by *Zymomonas mobilis* during molasses fermentation: optimization of culture conditions using factorial design. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 28, n. 2, p. 151-153, 2006.
- OLIVEIRA, M. R.; CELLIGOI, M. A. P. C.; BUZATO, J. B.; SILVA, R. S. S. F. Estudo experimental de produção de sorbitol por *Zymomonas mobilis* em altas concentrações de sacarose. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 2, p. 134-140, 2004.
- OLIVEIRA, M. R.; SILVA, R. S. S. F.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, n. 2, p. 177-183, 2007.
- RODRIGUEZ, E.; CALLIERI, D. A. S. High yield conversion of sucrose into ethanol by a flocculent *Zymomonas* sp. isolated from sugarcane juice. **Biotechnology Letters**, v. 8, n. 10, p. 745-748, 1986.
- ROGERS, P. L.; LEE, K. J.; TRIBE, D. E. High productivity ethanol fermentations with *Zymomonas mobilis*. **Process Biochemistry**, v. 15, n. 4, p. 7-11, 1980.
- ROGERS, P. L.; LEE, K. J.; SKOTNICKI, M. L.; TRIBE, D. E. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 37-84, 1982.
- ROGERS, P. L.; SKOTNICKI, M. L.; LEE, K. J.; LEE, J. H. Recent developments in the *Zymomonas* process for ethanol production. **Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 273-288, 1984.
- SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, n. 1, p. 19-22, 1952.
- SPRENGER, G. A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 145, n. 3, p. 301-307, 1996.
- 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, n. 34, p. 242-244, 2003.
- 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.
- VIKARI, L.; GISLER, R. By-products in the fermentation of sucrose by different *Zymomonas* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 240-244, 1986.

Received on June 26, 2009.

Accepted on July 8, 2009.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.