

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

THANIA OBERG MAGALHÃES

Características e vantagens da *Zymomonas mobilis* na indústria de etanol

Lorena
2016

THANIA OBERG MAGALHÃES

Características e vantagens da *Zymomonas mobilis* na indústria de etanol

Monografia apresentada como requisito parcial para a conclusão de Graduação do Curso de Engenharia Bioquímica – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Segato

Lorena
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Magalhães, Thania Oberg
Características e vantagens da *Zymomonas mobilis*
na indústria de etanol / Thania Oberg Magalhães;
orientador Fernando Segato. - Lorena, 2016.
43 p.

Monografia apresentada como requisito parcial
para a conclusão de Graduação do Curso de Engenharia
Bioquímica - Escola de Engenharia de Lorena da
Universidade de São Paulo. 2016
Orientador: Fernando Segato

1. Etanol. 2. Etanol de segunda geração. 3. Etanol
celulósico. 4. *Z. mobilis*. 5. Bactérias
etanologênicas. I. Título. II. Segato, Fernando,
orient.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, em primeiro lugar.

Agradeço à minha família por todo o apoio, incentivo aos estudos e, principalmente, ao amor incondicional que me deram.

À minha irmã, Thalita, por ter me incentivado a correr atrás dos meus sonhos e por tornar tudo isso possível.

Ao João por todo o apoio, paciência e compreensão, por me ajudar nas horas mais difíceis e por estar sempre ao meu lado.

Aos meus amigos de Lorena por fazerem desse período um dos mais especiais da minha vida.

A todos os meus professores que me ajudaram não só na minha formação acadêmica, mas me ensinaram valores humanos e éticos.

E agradeço ao meu orientador, Segato, por todo o apoio na elaboração deste trabalho.

RESUMO

Devido às crescentes preocupações com processos industriais que prejudicam o meio ambiente e a busca pelo desenvolvimento sustentável, a produção de bioetanol se torna uma alternativa viável por ser uma fonte energética renovável e limpa. Sendo o bioetanol de segunda geração um processo ainda mais sustentável por utilizar tecnologias que aproveitam a biomassa lignocelulósica para a produção do etanol. A *Z. mobilis* mostra-se, neste caso, um interessante microrganismo nesse processo de produção, principalmente o de segunda geração. Vários estudos com esta bactéria foram e ainda são realizados desde a década de 80 devido às suas singulares características que a tornam excelente produtora de bioetanol. Dentre estas características podemos destacar: alta velocidade específica para consumo de açúcar e produção de etanol; alto rendimento de etanol e baixa produção de biomassa; condições de crescimento simples, não requer o controle de adição de oxigênio no meio de fermentação; é tolerante ao etanol; estudos demonstraram que não há problemas com contaminações ou infecções com bacteriófagos no meio; as técnicas desenvolvidas para manipular geneticamente outras bactérias podem ser utilizadas na *Z. mobilis*; linhagens recombinantes desenvolvidas para consumir os açúcares dos resíduos lignocelulósicos para produção de etanol de segunda geração; e potencial uso de suas enzimas para biotransformações. Essas vantagens mostram a importância do uso desse microrganismo na produção de etanol. Por isso é preciso mais incentivo nessa área por parte dos governos, universidades e indústrias, com mais estudos e testes em escala industrial, para que seja uma alternativa realmente viável no mercado, principalmente o mercado brasileiro, pois é o segundo maior produtor de bioetanol do mundo.

Palavras-chave: etanol, etanol de segunda geração, etanol celulósico, *Z. mobilis*, bactérias etanologênicas.

ABSTRACT

Due to growing concerns about industrial processes that damage the environment and the search for sustainable development, the production of bioethanol becomes a viable alternative because it is a clean and renewable energy source. The second-generation bioethanol is an even more sustainable process by applying technologies that use lignocellulosic biomass for ethanol production. In this case, *Z. mobilis* is an interesting microorganism in the process of bioethanol production, especially second generation. Several studies have been performed about this bacterium since 80's due to its unique characteristic that make it excellent for producing ethanol. Among these characteristics we can highlight: high specific rate for consumption of sugar and ethanol production; high yields of ethanol and low production of biomass; simple growth conditions, not requiring addition control of oxygen at the fermentation broth; it is ethanol tolerant; studies have been shown the absence of broth contaminations and infections with bacteriophages; the techniques developed to genetically manipulate other bacteria can be used on *Z. mobilis*; recombinants strains developed to consume sugars from lignocellulosic residues for production of second-generation ethanol; and potentially use of its enzymes for biotransformation. These advantages demonstrate the importance of this microorganism in the ethanol production. It is necessary more encouragement in this area by Governments, universities and industries, with further studies and tests on an industrial scale, to be a truly viable alternative on the market, especially the Brazilian market, once it is the second largest producer of ethanol in the world.

Keywords: ethanol, second-generation ethanol, cellulosic ethanol, *Z. mobilis*, ethanologenic bacteria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da parede celular das plantas	11
Figura 2 - Esquema simples de produção de etanol celulósico.....	12
Figura 3 - Histórico da <i>Z. mobilis</i>	13
Figura 4 - Catabolismo da glicose	18
Figura 5 - Via Entner-Doudoroff	20
Figura 6 - Transformação de piruvato a etanol	21
Figura 7 - Metabolismo de carboidratos na <i>Z. mobilis</i>	22
Figura 8 - Histórico de culturas recombinantes para produção de etanol.....	28
Figura 9 - Processo geral para produção de combustíveis e químicos por <i>Z. mobilis</i>	31
Figura 10 - Vias metabólicas da <i>Z. mobilis</i> para síntese de produtos com alto valor agregado.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características da <i>Z. mobilis</i>	15
Tabela 2 – Comparação entre <i>Zymomonas</i> e levedura para produção de etanol.....	16
Tabela 3 - Importantes características para produção de etanol	17
Tabela 4 - Estudo comparativo entre a bactéria <i>Z. mobilis</i> e a levedura <i>S. carlsbergensis</i>	32
Tabela 5 – Pontos críticos apresentados para não utilizar processos com <i>Zymomonas</i> para produção de etanol	34
Tabela 6 - Características da <i>Z. mobilis</i> para produção de etanol e produtos de alto valor agregado.....	35

SUMÁRIO

OBJETIVO.....	7
INTRODUÇÃO.....	7
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
1. Produção de bioetanol.....	10
1.1. Histórico.....	10
1.2. Substratos.....	11
1.3. Etanol de segunda geração.....	11
1.4. Produção de bioetanol com <i>Zymomonas mobilis</i>	12
2. <i>Zymomonas mobilis</i>	13
2.1. Histórico.....	13
2.2. Características.....	14
2.3. Vantagens.....	15
3. Fermentação alcóolica.....	18
3.1. Ponto de vista bioquímico.....	18
3.2. Ponto de vista microbiológico.....	19
4. Via Entner - Doudoroff.....	19
5. Substratos estudados para produção de bioetanol pela <i>Z. mobilis</i>	22
6. Estratégias para melhorar as culturas de <i>Z. mobilis</i>	24
6.1. Deleção de genes específicos.....	25
6.2. Sequenciamento do genoma de diferentes culturas de <i>Z. mobilis</i>	25
6.3. Transcriptoma ou expressão de genes da <i>Z. mobilis</i>	26
6.4. Melhoramento de cultura por mutagênese convencional.....	26
6.5. Melhoramento de cultura por mutagênese com transposon.....	27
6.6. Melhoramento de cultura por evolução adaptativa em laboratório (ALE – <i>Adaptative Laboratory Evolution</i>).....	27
6.7. Tecnologia do DNA recombinante e o aumento da gama de substratos utilizados pela <i>Z. mobilis</i>	28
6.8. Outros bioprodutos com valor agregado produzido pela <i>Z. mobilis</i>	30
7. Justificativas finais das vantagens da <i>Z. mobilis</i> e sua comparação com leveduras.....	32
7.1. Estudo comparando a <i>Z. mobilis</i> com uma levedura.....	32
7.2. Pontos críticos apontados pelo uso da <i>Z. mobilis</i> em escala industrial.....	33
CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS.....	36

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é realizar uma revisão bibliográfica da bactéria *Zymomonas mobilis*, apresentando seu potencial uso na indústria de bioetanol. Para isso será apresentado o histórico de uso da *Z. mobilis*, suas atuações na produção de etanol, as vantagens dessa bactéria em relação às leveduras e o que encontramos atualmente no mercado (versões geneticamente modificadas).

INTRODUÇÃO

O interesse no desenvolvimento de processos sustentáveis para produção de químicos, combustíveis e materiais a partir de fontes renováveis vem aumentando ao longo dos anos. Isso ocorre devido às crescentes preocupações com o uso de fonte energética não-renovável, como os combustíveis fósseis, associadas aos problemas ambientais (LEE et al., 2012). Com o aumento do interesse no desenvolvimento de processos sustentáveis, o termo “biotecnologia industrial” está cada vez mais forte e bem definido nos campos acadêmico, governamental e nas empresas. Esse termo apareceu no início dos anos 80 com os avanços na engenharia genética (FERRANDIZ-GARCIA, 1981). A biotecnologia industrial pode ser formalmente definida como bioconversão, tanto por via da fermentação microbiana, cultivo celular ou biocatálise, de matérias-primas orgânicas extraídas de biomassa ou seus derivados para químicos, materiais e/ou energia. Esses processos biotecnológicos são referenciados como “química verde” ou “biotecnologia branca” (MAURY et al., 2005). Tais processos tem por objetivo fornecer alternativas economicamente competitivas, ambientalmente amigáveis e autossuficientes para poder competir com os processos petroquímicos. Processos que exploram a biotecnologia industrial têm ganhado a atenção global devido ao aumento dos custos com matérias-primas, restrições ambientais e a diminuição da autossuficiência na indústria petroquímica (OTERO et al., 2007). É por isso que a utilização da biossíntese de combustíveis e produtos químicos a partir de microrganismos tem-se mostrado uma interessante alternativa quando comparado à forma tradicional de produção (HE et al., 2014).

O melhor exemplo de um processo biotecnológico é a produção de bioetanol (ou etanol a base de fermentação microbiológica). A produção desse biocombustível serviu como suporte para muitas abordagens biotecnológicas, principalmente ferramentas e análises desenvolvidas nessa área, o que permitiu o planejamento de uma biorefinaria (uma plataforma de processos integrados que converte a biomassa em um variado portfólio de produtos) (OTERO et al., 2007). Os biocombustíveis produzidos por

microrganismos possuem propriedades similares aos combustíveis a base de petróleo. Porém, é preciso lembrar que para atingir um alto rendimento de produção de biocombustíveis, o suficiente para que possa ser usado em escala comercial, é preciso modificar geneticamente o metabolismo dos microrganismos. Esse processo não se baseia apenas em uma única matéria-prima ou microrganismo hospedeiro e seu objetivo deve ser alcançado de modo a otimizar esse organismo e a via que utiliza para maximizar a produção, permitindo a competição com os combustíveis convencionais (PERALTA-YAHYA, 2012).

Na década de 70, a crise mundial do petróleo deu impulso nessa área de produção de bioetanol, pois os governos passaram a investir em combustíveis alternativos. No Brasil o bioetanol foi estudado e introduzido no mercado com o programa Pró-álcool, criado pelo governo. O programa tinha como objetivo estabilizar o preço internacional da cana-de-açúcar o qual era altamente sensível ao subsídio por outros produtores nacionais (NOVACANA, 2015). A maior parte do etanol produzido no Brasil é proveniente da cana-de-açúcar. Devido ao ótimo clima do país, é possível obter o crescimento dessa planta durante duas estações do ano (AFTA, 2000). Contudo, o bioetanol pode ser obtido de outras fontes, como é o caso dos Estados Unidos que utiliza o milho, uma matéria-prima menos eficiente. Sendo o Brasil o segundo maior produtor de bioetanol do mundo e os EUA, o primeiro (NOVACANA, 2016).

Como um processo biotecnológico, a produção de etanol é feita a partir do amido ou da fração de sacarose de algumas plantas como milho, cana-de-açúcar, beterraba e grãos. O etanol produzido a partir desses substratos é denominado “etanol de primeira geração”. Contudo, para aumentar a produtividade e expandir a gama de matérias-primas, é de extrema importância melhorar a eficiência de produção de etanol a partir de resíduos agrícolas e outras fontes de carboidratos de baixo valor agregado, como palha de milho e trigo, bagaço da cana, papéis não-recicláveis ou culturas dedicadas como *switchgrass*, pois possuem um enorme potencial em termos de carboidratos disponíveis. O etanol proveniente dessas fontes é denominado “etanol de segunda geração” ou “etanol celulósico”, pois esses carboidratos são diferentes de amido e sacarose, eles consistem de uma matriz complexa de celulose, hemicelulose, pectina e lignina (VAN MARIS et al., 2006).

Os microrganismos mais utilizados e difundidos para fermentar esses tipos de substratos e produzir etanol são as leveduras, principalmente a *Saccharomyces cerevisiae*. Este microrganismo é capaz de fermentar hexoses, como glicose, frutose, manose e galactose (BARNETT et al., 1990). A *S. cerevisiae* é um microrganismo eucarioto e anaeróbio facultativo, utiliza a via da glicólise e a fermentação para a

produção de etanol. A fermentação ocorre em condições anaeróbias ou mesmo em condições aeróbias, dependendo da quantidade de glicose presente no meio (BARNETT, 1976). Contudo, apesar de ser o microrganismo mais utilizado na produção de etanol, a levedura *S. cerevisiae* não é a única opção economicamente viável para esse tipo de processo. A bactéria *Zymomonas mobilis* possui interessantes características devido à sua especial via de metabolismo da glicose, a Entner-Doudoroff. Esse microrganismo é uma plataforma ideal para engenharia metabólica e produção em larga escala de bioprodutos, tanto quanto a *Escherichia coli* e a *S. cerevisiae*, baseando-se nas novas biorefinarias de biomassa. É uma candidata a produção de bioetanol, possuindo algumas vantagens como, por exemplo, maior taxa específica de absorção de açúcar, alto rendimento de etanol, baixa produção de biomassa, não exige adição controlada de oxigênio durante a fermentação, entre outros fatores. (HE et al., 2014). Estudos extensivos com *Z. mobilis* ao longo dos últimos trinta anos fez com que essa bactéria se tornasse um promissor microrganismo para produção de etanol em larga escala (ROGERS et al., 2007). Em um artigo publicado em 1993, Doelle et al. (1993), descreveu a *Z. mobilis* como:

A *Z. mobilis* é, sem dúvida, a bactéria mais singular no mundo microbiano. Conhecida desde 1912 sob os nomes de *Thermobacterium mobilis*, *Pseudomonas linderi*, e *Z. mobilis*, revisões sobre a sua singularidade foram publicadas em 1977 e 1988. A bactéria *Z. mobilis* não só exibe uma extraordinária singularidade na sua bioquímica, mas também no seu comportamento de crescimento, produção de energia e resposta às condições de cultivo, bem como técnicas de cultivo usadas. Esta singularidade causou grande interesse no mundo científico, biotecnológico e industrial. Sua habilidade de acoplar e desacoplar produção de energia em favor da formação de produto, de responder física e quimicamente às manipulações do ambiente, assim como sua restrita formação de produto, torna-a um microrganismo ideal para o desenvolvimento de processos microbiológicos.

Mas é importante lembrar que, em relação ao etanol de segunda geração, ambos os microrganismos não possuem a habilidade nativa de fermentar o principal componente da fração hemicelulósica da biomassa, as pentoses (HAHNHAGERDAL et al., 1993; FELDMANN et al., 1992). Todavia, estudos mais recentes e extensivos em níveis tanto fundamentais, quanto aplicados, poderão fornecer a base para a biotecnologia industrial no futuro. Estratégias de melhoramento de culturas, como mutagênese convencional e transposon, engenheiramento da via metabólica, etc., e diferentes produtos com valor agregado estão recebendo maior atenção nos últimos anos. Sendo que, diferentes técnicas genéticas, como plasmídeos vetoriais, sistemas de expressão, sistema de transposon, gene knockout, genes de transformação, entre outros, podem ajudar no

melhoramento genético da *Z. mobilis* na indústria biotecnológica (ROGERS et al., 2007). O desenvolvimento do genoma e do transcriptoma da *Z. mobilis* ajudará no futuro a engenharia metabólica e a biologia sintética no melhoramento de culturas para aplicações industriais (JANG, 2012).

Neste trabalho será apresentado as características de cada microrganismo, leveduras e *Z. mobilis*, histórico de uso da *Z. mobilis*, suas atuações na produção de etanol, as vantagens da bactéria em relação às leveduras e o que encontramos atualmente no mercado (versões geneticamente modificadas).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Produção de bioetanol

1.1. Histórico

Devido à crescente preocupação com a segurança do fornecimento de petróleo e a mudança climática global, os biocombustíveis estão recebendo maior atenção no mundo inteiro. Na maioria dos países em desenvolvimento, como o Brasil, a indústria de bioetanol é vista com uma oportunidade para aumentar o crescimento da economia e criar ou manter empregos, principalmente na zona rural. Sua maior vantagem é a possibilidade de misturá-lo com a gasolina, em pequenas proporções (5% a 25% por volume), de forma a não prejudicar o engenho da combustão e não causar mudanças significativas (PANDEY, 2008).

O primeiro relato que se tem do uso de etanol como combustível data de 1826, quando Samuel Morey usou o etanol como o primeiro protótipo americano com engenho de combustão interna. Contudo, voltou-se a ter o interesse por esse tipo de combustível apenas na década de 70 com a crise mundial do petróleo. O governo brasileiro lançou, nessa época, o programa Pró-álcool que tinha como estratégia substituir grande parte do petróleo importado. Já nos Estados Unidos tivemos o *Energy Tax Act* de 1978 que isentava o imposto de consumo da gasolina misturada (10% de bioetanol misturado com gasolina v/v) e, mais tarde, um programa federal americano que garantia empréstimos para o investimento na construção de plantas alcooleiras. Até hoje, o Brasil e os EUA são os maiores produtores e usuários de etanol combustível no mundo. Apesar do brilhante futuro desse biocombustível, o ambiente e o seu desempenho econômico variam bastante de uma via de produção para outra. O seu desenvolvimento dependerá da possibilidade de desenvolver matérias-primas sustentáveis, tecnologias eficientes e prevenir potenciais riscos como obstáculos ambientais e competição com alimentos (PANDEY, 2008).

1.2.Substratos

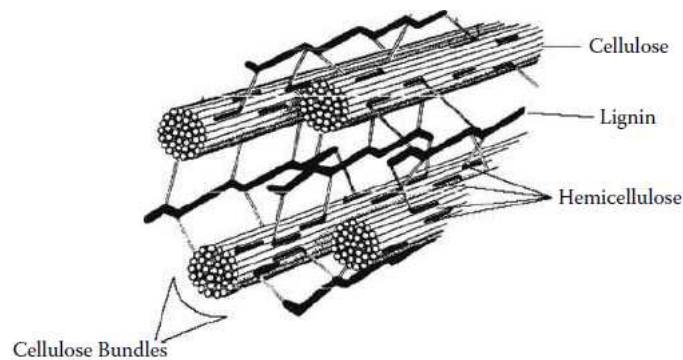
O bioetanol pode ser produzido por uma grande variedade de substratos, monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos. A maior parte da indústria utiliza como matéria-prima o caldo da cana-de-açúcar, da beterraba ou melão e amido do milho, do trigo, da cevada e da mandioca. Há também os modernos processos de produção de etanol com o uso da biomassa lignocelulósica, sendo que esta apresenta baixo custo para a produção, pois possui grande disponibilidade e é proveniente dos resíduos agrícolas e da silvicultura, como bagaço, palha e resíduos da planta. (PANDEY, 2008). Esse etanol produzido pelo bagaço, palha e resíduos da planta é denominado etanol de segunda geração ou etanol celulósico.

1.3.Etanol de segunda geração

A tecnologia do etanol de segunda geração é nova e está em constante aperfeiçoamento, sendo que já existem algumas plantas capazes de utilizar essa tecnologia em escala industrial. Outra vantagem também desta tecnologia é a possibilidade de aumentar a eficiência da produção sem expandir a área de produção. Por exemplo, no caso da cana-de-açúcar há um aumento do rendimento de um hectare de cana em 50% (NOVACANA, 2016).

Um dos maiores gargalos na produção do etanol celulósico é o pré-tratamento, pois a biomassa utilizada para a sua produção é um material lignocelulósico. Esse material é composto, principalmente, por celulose, hemicelulose e lignina, como demonstrado na figura 1. Para que se obtenha açúcares mais simples, capazes de serem utilizados no processo de fermentação, é preciso romper o arranjo fortemente cristalino da celulose, dissolvendo a lignina e hidrolisando a hemicelulose e a celulose (NOVACANA, 2016).

Figura 1 - Estrutura da parede celular das plantas



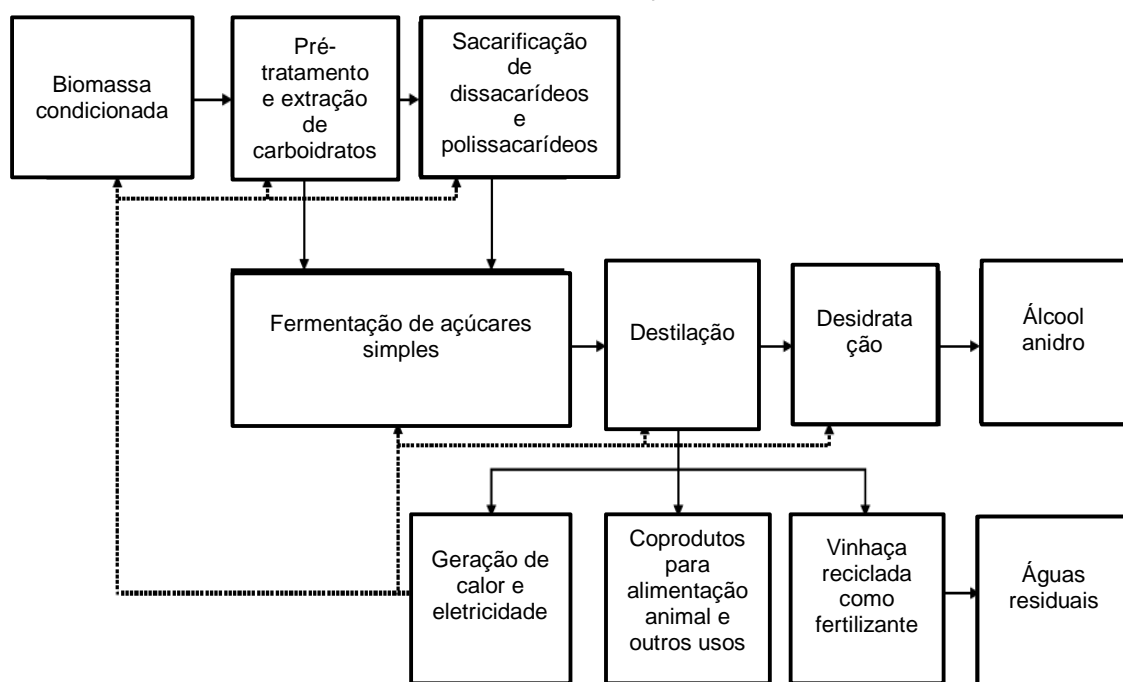
Fonte: (PANDEY, 2008; SHLESER, 1994).

No Brasil, a biomassa lignocelulósica utilizada é a da cana-de-açúcar e boa parte

é usada pelas próprias usinas como fonte de energia. Porém, mesmo usando como fonte de energia e como suplemento na ração animal, ainda existe um grande excedente. Esse excedente pode ser utilizado para produzir hidroximetilfurfural, papel e celulose, madeira prensada, etanol, entre outros. (CUNHA et al., 2005; ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009). Em relação à produção de etanol celulósico, existem hoje, no Brasil, apenas duas plantas capazes de produzi-lo: a da GranBio, em Alagoas, e a da Raízen, em São Paulo, sendo consideradas pioneiras no mundo (NOVACANA, 2016). Já nos EUA a biomassa utilizada é a do milho e há quatro plantas produtoras, pertencentes às indústrias Abengoa, Poet-DSM, Quad County Corn e DuPont (UNICA, 2014). Sendo que a planta da DuPont, inaugurada em 2015, é a maior produtora de etanol celulósico do mundo, com capacidade para produzir 30 milhões de galões por ano. Seu etanol de segunda geração é proveniente do bagaço do milho (SETOR ENERGÉTICO, 2015).

O esquema a seguir (Figura 2), ilustra de forma simples como é o processo de produção de etanol celulósico.

Figura 2 - Esquema simples de produção de etanol celulósico



Fonte: Adaptado de (GNANSOUNOU et al., 2005).

1.4. Produção de bioetanol com *Zymomonas mobilis*

Devido a sua importância apresentada, a busca por melhorias e melhor aproveitamento do processo de produção de bioetanol é fundamental. Como apresentado, o etanol de segunda geração fornece uma série de vantagens, como melhor aproveitamento do plantio, aumentando a eficiência sem expandir a área de produção.

É uma tecnologia que está em constante aperfeiçoamento. E uma forma de melhorarmos é por meio de microrganismos adequados para a fermentação desses açúcares da biomassa lignocelulósica e que sejam capazes de apresentar alto rendimento de produto, baixa produção de biomassa, entre outros fatores. Para isso, as *Z. mobilis* e suas linhagens melhoradas são uma interessante e promissora alternativa.

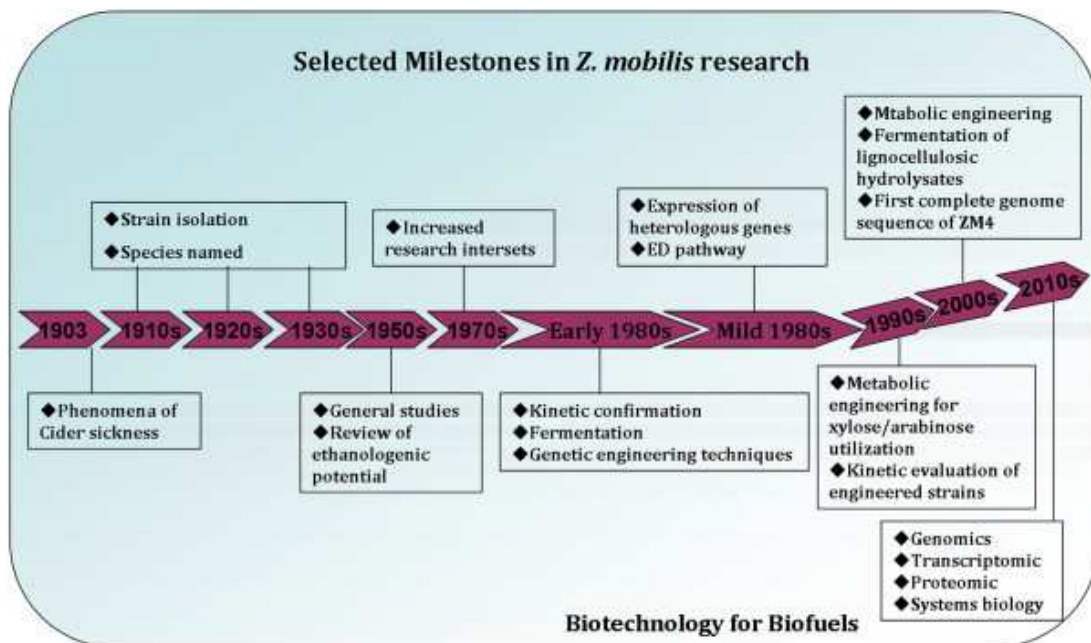
Algumas plantas produtoras de etanol de segunda geração, como a da DuPont nos EUA, já utilizam a *Z. mobilis* no seu processo (NREL, 2015).

2. A *Zymomonas mobilis*

2.1. Histórico

A figura 3 ilustra os marcos ao longo da história com pesquisas relacionadas à *Z. mobilis*.

Figura 3 - Histórico da *Z. mobilis*



Fonte: (HE et al., 2014)

Podemos observar que os primeiros estudos com a *Zymomonas* se dá no início do século XX, com o fenômeno da “doença da cidra”. Essa doença nada mais era do que a fermentação secundária realizada por essas bactérias encontradas naturalmente no suco da maçã. Foi a partir do estudo desse fenômeno que as primeiras espécies de *Zymomonas* passaram a ser isoladas. Desde então, houveram vários estudos relacionados com essa bactéria a partir de bebidas derivadas da seiva de várias espécies de palmeiras (vinho de palma). Pode-se concluir, a partir destes estudos, que a

Zymomonas se adapta bem a um ambiente rico em frutose, sacarose, glicose, aminoácidos e outros fatores de crescimento presente na seiva de palmeira. Além de serem resistentes ao etanol, crescerem em pH baixo e em condições anaeróbias. No Brasil, essa bactéria foi isolada a partir do caldo de cana-de-açúcar fermentado também no início do século passado.

Foi, então, na década de 50 que a *Zymomonas* começou a se tornar famosa entre os bioquímicos devido a descoberta do seu mecanismo Entner-Doudoroff (ED) utilizado para catabolizar anaerobicamente a glicose (DE LEY; SWINGS, 1977). Nesse período surgiram vários estudos gerais sobre esse microrganismo, bem como revisões sobre o seu potencial etanologênico. Na década de 70, houve um aumento nas pesquisas sobre esta bactéria, sendo que, Swings e DeLey publicaram, em 1977, a *Biologia da Zymomonas*, no qual traz extenso conteúdo sobre o histórico das culturas isoladas, sua forma de detecção, isolamento, identificação do gênero, a taxonomia da *Zymomonas* e as descrições fenotípicas da bactéria. São microrganismos não usuais, uma vez que fermentam os açúcares anaerobicamente pela via ED, seguido por piruvato descarboxilação para produzir etanol e dióxido de carbono (fermentação alcoólica). Durante a fermentação ocorre a formação de ácido láctico, traços de acetaldeído e acetona (DE LEY; SWINGS, 1977).

Nos anos 80, os principais estudos publicados foram referentes à cinética da fermentação na produção de etanol, por Rogers e Lee (1979,1983), onde descrevem um modelo cinético da fermentação, assumindo que os fatores limitantes são: substrato, inibição por produto e inibição por substrato a altos níveis de concentração. Outros tipos de estudos publicados também na década de 80 foram o desenvolvimento da engenharia genética para a *Z. mobilis*, a clonagem de genes heterólogos e a caracterização das enzimas da via ED. O detalhamento destes estudos será descrito posteriormente. Na década de 90 temos o uso da engenharia metabólica para que a *Z. mobilis* passe a utilizar a xilose e arabinose como substratos e avaliação cinética dessas culturas geneticamente modificadas. Nos anos 2000, os estudos são mais voltados para a engenharia metabólica, a fermentação de hidrolisados lignocelulósicos, permitindo a sua eficiente conversão e capacidade em tolerar os inibidores produzidos por muitos processos de pré-tratamento e a primeira sequência completa do genoma da *Z. mobilis* linhagem ZM4 que também será discutido posteriormente. E, nos últimos anos, temos estudos focados no genoma, transcriptoma e proteoma da *Z. mobilis* bem como a biologia dos sistemas (HE et al., 2014; ROGERS et al., 2007).

2.2.Características

As características da *Z. mobilis* foram sendo definidas ao longo dos anos. É uma

bactéria gram-negativa e anaeróbia facultativa, conseguindo crescer bem em condições aeróbias. É uma das poucas bactérias anaeróbias facultativas capazes de degradar a glicose pela via ED; sendo esta encontrada em restrito grupo de bactérias gram-negativas como *Rhizobium*, *Pseudomonas* e *Agrobacterium* (SWINGS; DE LEY, 1977). Sua reprodução é, normalmente, por divisão binária simples (ALTERTHUM, 2001). São quimiorganotróficas, o que possibilita crescer em meio com glicose. (FALCÃO, 1982; BERTASSO, 1996; RANZAN, 2010). Não é patogênica para seres humanos e nem animais (RANZAN, 2010; LIMA; SCHUMACHER; ARAÚJO, 1972). Sua resistência à grande variedade de antibióticos foi amplamente divulgada e estudada na literatura (SWINGS; DE LEY, 1977; RANZAN, 2010).

Na tabela 1, podemos encontrar um resumo das principais características da *Z. mobilis*:

Tabela 1 - Características da *Z. mobilis*

-
1. Gram-negativa.
 2. Formato de bastonete com dimensões 1,0-2,0 a 4,0-5,0 µm.
 3. Possuem motilidade e normalmente ocorre em pares.
 4. Não produz esporos, cápsulas, lipídios intracelulares ou glicogênio; nenhuma fase de repouso conhecida.
 5. Anaeróbio facultativo.
 6. Metaboliza glicose ou frutose para equimolar as quantidades de etanol e CO₂ usando a via ED.
 7. Muitas culturas podem utilizar sacarose, sendo normalmente acompanhado pela formação de levana; no entanto, uma ampla variedade de outros açúcares e lipídeos não são utilizados.
 8. Para o seu crescimento, a faixa de pH ótima é de 6,0 a 7,0 e de temperatura ótima é 25 a 31,5 °C.
 9. O conteúdo de guanina (G) e citosina (C) do DNA celular é, aproximadamente, 47,5 a 49,5%, com uma temperatura média *T_m* 89,3 a 89,5 °C.
-

Fonte: (GUNASEKARAN et al, 1990)

2.3.Vantagens

No início dos anos 80, quando um grupo australiano liderado por P. L. Rogers reportaram estudos mostrando o grande potencial da *Z. mobilis* para produção de etanol, as pesquisas com essa bactéria se intensificaram porque, nesta época, com a crise do petróleo, aumentou-se a procura por combustíveis alternativos e de fontes renováveis (BARATTI; BU'LOCK, 1986). Os estudos apresentados por Rogers mostravam que a *Z.*

mobilis era capaz de produzir etanol em uma taxa específica maior que a das leveduras, fazendo com que obtivesse uma alta produtividade em cultura contínua com células de reciclo (SKOTNICKI et al., 1981).

Em um desses estudos foram feitas comparações entre vários subgêneros de *Z. mobilis* disponíveis na época. Eles observaram que, quando se tinha sacarose no meio de crescimento, havia a produção de levana (polímero de frutose), sendo que esta não tinha utilidade na produção de etanol. Analisaram entre os subgêneros a sensibilidade a altas temperaturas, capacidade de flocular e crescer em meios sólidos e a propensão a modificações genéticas. A partir dessas análises, eles selecionaram a linhagem CP4 de *Z. mobilis* como um microrganismo promissor para a produção de etanol (SKOTNICKI et al., 1981).

Quando a *Zymomonas* cresce em meio com glicose, produz bioprodutos como glicerol, succinato, acetato, lactato, acetoína e butanodiol (AMIN; VAN DEN EYNDE; VERACHTERT, 1983).

A tabela 2, mostra alguns parâmetros da produção de etanol relativos a *Z. mobilis* e leveduras.

Tabela 2 – Comparação entre *Zymomonas* e levedura para produção de etanol

Parâmetros	<i>Z. mobilis</i>	Levedura
Conversão de açúcar para etanol (%)	96	96
Máxima concentração de etanol (%)	12	12
Rendimento de ATP (por mols de glicose) (ED x Embden – Meyerhoff)	1	2
Taxa de produção de etanol (g g ⁻¹ h ⁻¹) ^a	5,67	0,67
Produtividade volumétrica de etanol (g g ⁻¹ h ⁻¹) ^b	200	29
Faixa de pH para produção de etanol	3,5 - 7,5	2 – 6,5
Temperatura ótima (°C)	25 – 30	30 - 38

^a Fermentação em batelada de células com 10% de glicose

^b Cultura contínua com células de reciclo

Fonte: (PANESAR; MARWAHA; KENNEDY, 2006)

Podemos perceber, pela tabela 2, que a *Z. mobilis* apresenta uma taxa de produção de etanol e uma produtividade volumétrica bem maior que de leveduras usadas neste mesmo processo. Apesar das leveduras serem os microrganismos mais usados para produção de etanol, elas apresentam uma série de desvantagens como, por exemplo, possuírem um limite de tolerância ao etanol (WANG, 2008; YOU; ROSENFELD; KNIPPLE, 2003), e produzirem o glicerol como principal subproduto durante a

fermentação tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias. O glicerol é um subproduto indesejado na produção de etanol, pois interfere no rendimento (NISSEN et al., 2000; WANG, 2008). Além disso, sob condições aeróbicas, a concentração de oxigênio tem que ser controlada para minimizar a produção de glicerol (BIDEAUX et al., 2006; WANG, 2008), o que aumenta o custo de produção. É importante lembrar também que a linhagem selvagem da *Saccharomyces cerevisiae* não assimila pentoses provenientes da matéria-prima de lignocelulose, pois não possui a via de assimilação de xilose e os níveis adequados da enzima da via pentose-fosfato. Somente com a engenharia genética para criar culturas recombinantes capazes de metabolizar xilose e arabinose (WYMAN, 1996; WANG, 2008).

A tabela 3 descreve importantes fatores para escolher um microrganismo para produzir bioetanol.

Tabela 3 - Importantes características para produção de etanol

Características	Requisito
Rendimento de etanol	>90% do rendimento teórico
Tolerância ao etanol	>40 g/L
Produtividade de etanol	>1 g. g ⁻¹ .h ⁻¹
Crescimento robusto e requisitos para crescimento simples	Formulação do meio barata
Capaz de crescer em hidrolisados insolúveis	Resistência à inibidores
Condições de crescimento da cultura retardada contaminantes	pH ácido ou altas temperaturas

Fonte: Adaptado de (DIEN et al., 2003).

Entre todas essas características citadas na tabela 3, o rendimento de etanol é a mais importante, pois a matéria-prima para o substrato representa mais de um terço do custo da produção (DIEN et al., 2003). Devido a esse fato, a *Z. mobilis* se tornou o microrganismo mais promissor para substituir a levedura, uma vez que possui um rendimento de etanol de 97% do valor teórico (WANG, 2008), alcançando entre 5 a 10% maior rendimento que a levedura (WYMAN, 1996; WANG, 2008). Além disso, se observarmos a tabela 2 a produtividade de etanol da *Z. mobilis* é bem alta, podendo ser cinco vezes maior do que a da *S. cerevisiae*. Outras vantagens da *Z. mobilis* na produção de etanol são: tolerância a altas concentrações de açúcares, baixo custo de produção e a habilidade de fermentar açúcares a baixo pH, pois é tolerante à ácido, podendo fermentar numa faixa de pH 3,5 a 7,5 (ROGERS; LEE; TRIBE, 1979; WANG, 2008) e, assim, as fermentações são, geralmente, resistentes à contaminação bacteriana. Como dito

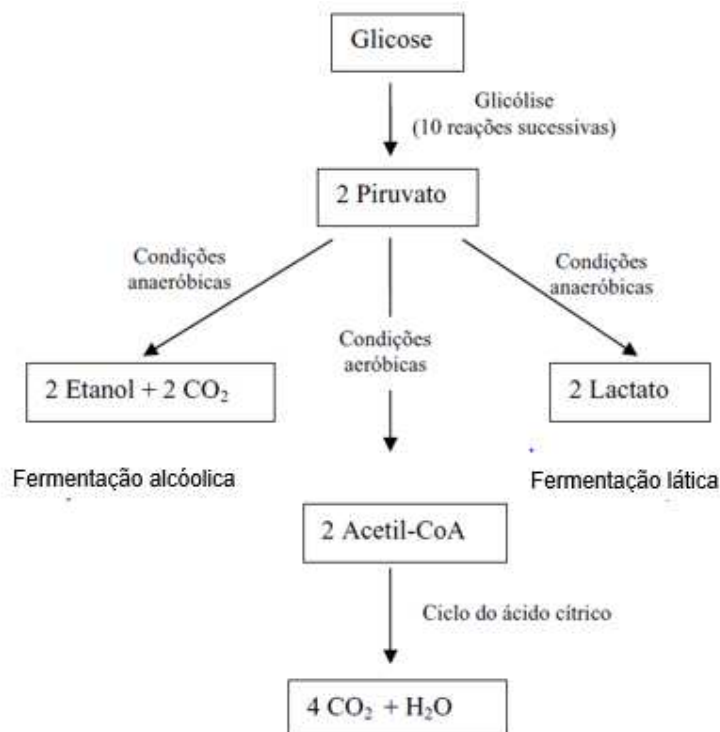
anteriormente, a *Z. mobilis* é capaz de crescer em condições aeróbias e anaeróbias. Contudo, o crescimento aeróbico não resulta em altas taxas de crescimento celular quando comparado ao anaeróbico. Assim, não há necessidade de controlar a concentração de oxigênio para manter a viabilidade celular, reduzindo o custo de produção (WYMAN, 1996; WANG, 2008; ROGERS et al., 1980).

3. Fermentação alcóolica

3.1. Ponto de vista bioquímico

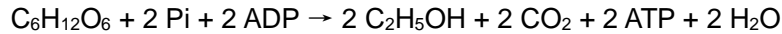
A fermentação alcóolica no ponto de vista bioquímico corresponde à degradação de moléculas de açúcar (glicose ou frutose) no interior das células dos microrganismos (leveduras ou bactérias) até a formação de etanol e CO₂ com liberação de energia química e térmica. A glicólise é a via central do catabolismo da glicose e o piruvato, o produto final do processo. O piruvato pode seguir nas seguintes vias metabólicas: fermentação alcóolica, fermentação láctea ou ciclo de Krebs e cadeia respiratória, conforme esquematizado na figura 4 (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009).

Figura 4 - Catabolismo da glicose



Fonte: (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009; NELSON; COX, 2011)

A equação da fermentação alcóolica fica:



3.2. Ponto de vista microbiológico

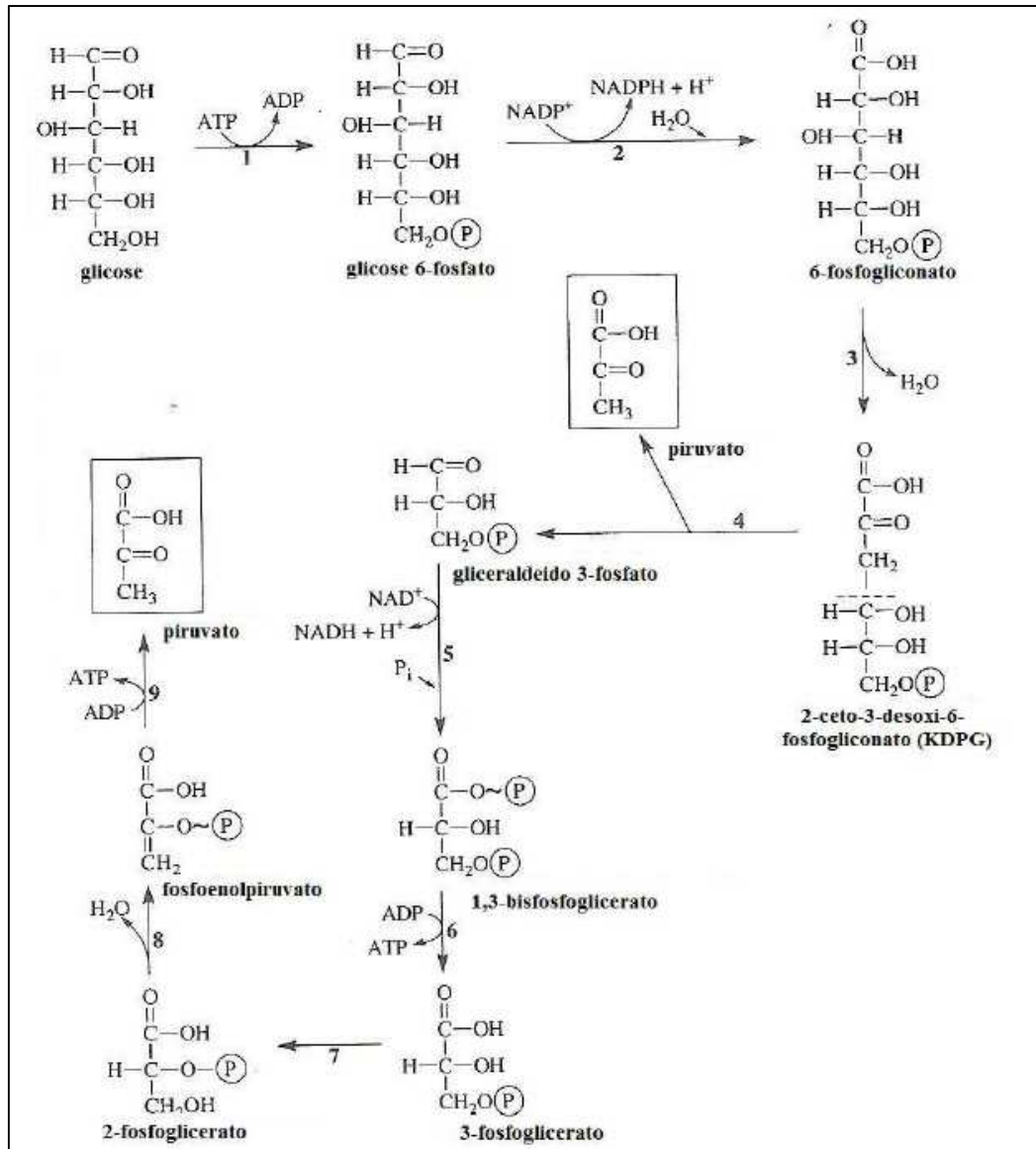
No ponto de vista microbiológico, a fermentação alcoólica pode ser realizada por leveduras e alguns tipos de bactérias. A espécie mais importante de levedura alcoólica é a *S. cerevisiae* e possui ampla utilização pela indústria, por exemplo, na produção de pães, bebidas alcoólicas, etanol, etc. Entre as bactérias, a *Z. mobilis* é a que apresenta características e habilidades mais promissoras na produção de etanol, pois consegue catabolizar açúcares em etanol e dióxido de carbono em condições comparáveis às exigidas pelas leveduras (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009; SPRENGER, 1996). Diferentemente das leveduras, que utilizam a via glicolítica, a *Z. mobilis* utiliza a via Entner-Doudoroff para consumir açúcar e produzir etanol. Ela pode produzir até 1,9 mol de etanol por mol de glicose fermentada e uma pequena quantidade de lactato, conforme a reação: **1 glicose → 1,93 etanol + 1,8 CO₂ + 0,053 lactato** (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009).

4. Via Entner - Doudoroff

A via Entner-Doudoroff é uma variante da via glicolítica, pois permite metabolizar a glicose sem a glicólise ou a via das pentoses-fosfato. Nessa via, a glicose-6-fosfato é oxidada a 6-fosfogliconato e NADPH; o 6-fosfogliconato é desidratado e seu produto é clivado liberando um piruvato e formando gliceraldeído-3-fosfato. O gliceraldeído-3-fosfato é oxidado a 1,3-bifosfoglicerato e um fosfato é incorporado. Ocorre então a liberação de um ATP e a formação de 3-fosfoglicerato. Este passa pelas mesmas etapas da glicólise até formar o piruvato, liberando dois ATPs (TORTORA et al., 2006; MADIGAN et al., 2016). As enzimas regulatórias chave da glicólise, fosfofrutoquinase e a hexoquinase alostérica não estão presentes nessa via. As etapas finais da via ED são idênticas as da glicólise, sendo possível que ambas as diferenças e similaridades entre a *Z. mobilis* e a levedura possam existir no fluxo glicolítico de regulação.

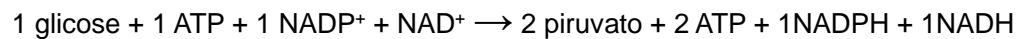
A figura 5 mostra o esquema geral da via Entner-Doudoroff.

Figura 5 - Via Entner-Doudoroff



Fonte: adaptado de (TORTORA et al., 2006).

No geral temos:

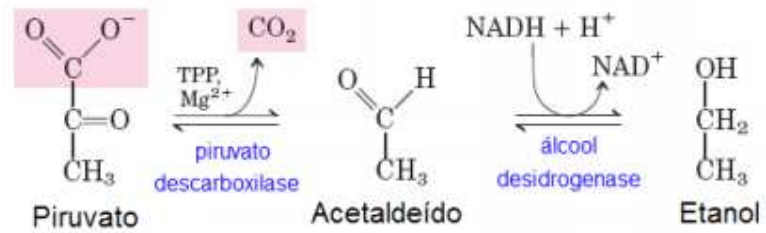


O balanço final fica:



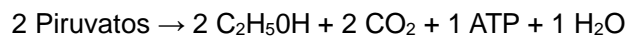
Na fermentação alcóolica, o piruvato é descarboxilado a acetaldeído e depois reduzido a etanol, conforme figura 6 (NELSON; COX, 2011; SCOPES et al., 1985).

Figura 6 - Transformação de piruvato a etanol



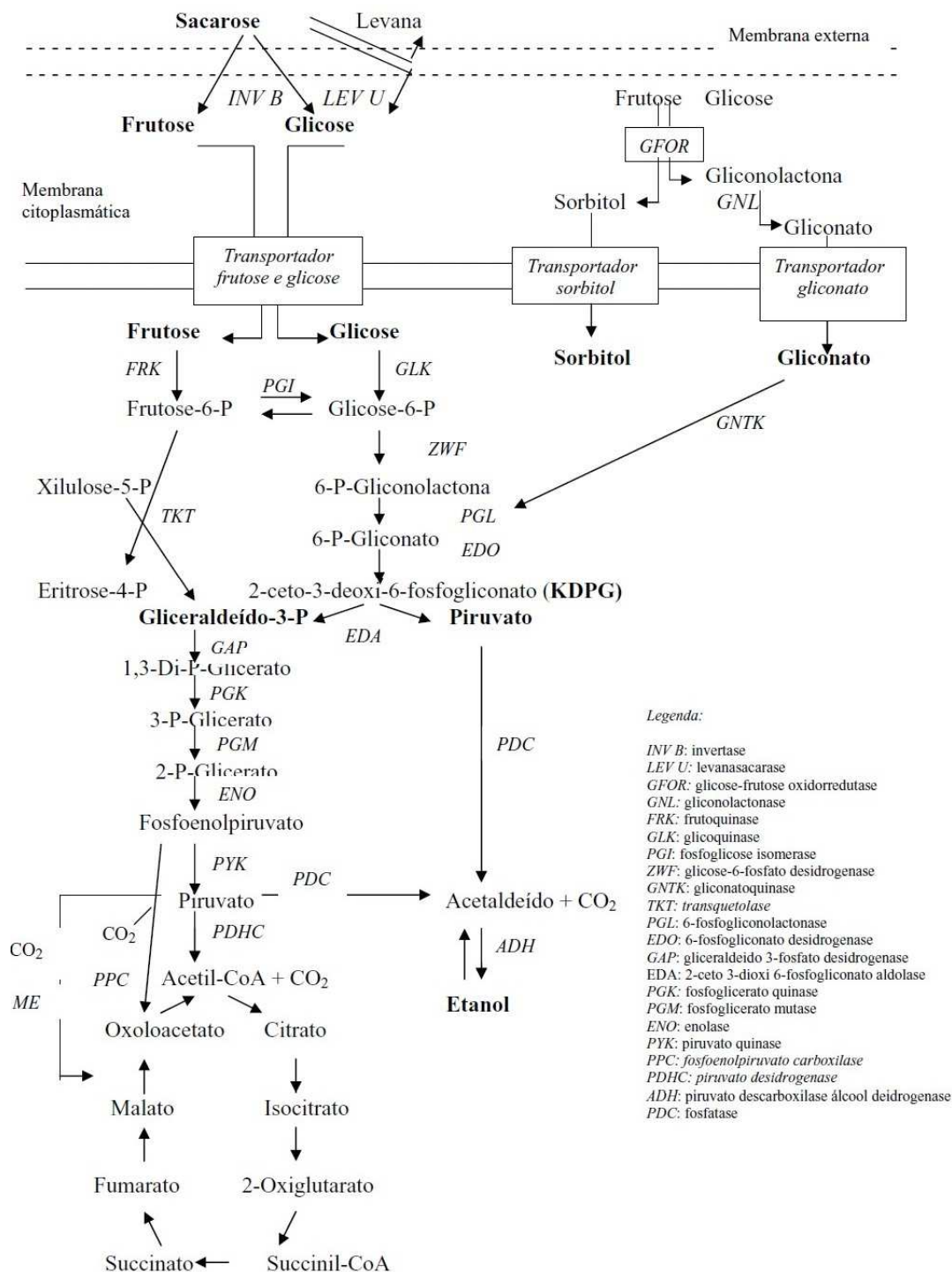
Fonte: (NELSON; COX, 2011)

Balanço geral:



O metabolismo completo dos carboidratos na *Z. mobilis* pode ser verificado na figura 7.

Figura 7 - Metabolismo de carboidratos na *Z. mobilis*



Fonte: (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009; SPRENGER, 1996)

5. Substratos estudados para produção de bioetanol pela *Z. mobilis*

Estudos realizados no transporte da glicose mostraram que *Z. mobilis* possui um sistema de difusão facilitada, o que permite um rápido equilíbrio entre a concentração de

glicose interna e externa. Assim, tanto a D-glicose quanto a D-frutose são transportadas para dentro da célula por esse meio de difusão (DIMARCO; ROMANO, 1985). O rendimento de etanol obtido a partir da frutose em fermentação batelada é, geralmente, mais baixo (90%) do que o obtido pela glicose (95%). Até então, o que se tinha era que, quando o substrato era glicose, o rendimento da *Z. mobilis* era três vezes maior que o da levedura. Porém, quando se tinha sacarose como substrato, o rendimento era menor. Isso ocorria devido ao fato que a bactéria produzia levana e outros subprodutos na presença desse substrato. Descobriu-se também que essa bactéria reagia de forma diferente na presença simultânea de glicose e frutose, produzindo altas quantidades de sorbitol, o que levou a descoberta de uma enzima, a glicose-frutose oxirredutase (VIIKARI, 1988).

A maioria das fermentações estudadas foram realizadas com glicose. Os resultados apresentavam uma produtividade volumétrica de etanol de 120 g/L.h em um sistema contínuo de células de reciclo (LEE et al.,1980). Porém, essas células eram recicladas por ultrafiltração e isso fez com que o longo uso desse recurso causasse problemas com taxa de fluxo. Esse problema foi contornado pelo uso de células floculantes de *Z. mobilis* para facilitar a separação dessas células e a sua recuperação em reatores contínuos, tornando um dos mais importantes avanços alcançados nessa área. Essa técnica permitiu obter alta produtividade de etanol (por volta de 50 g/L) e altas concentrações de células podiam ser obtidas pelo reciclo das células floculantes (LEE; SKOTNICKI; ROGERS, 1982).

Como já comentado anteriormente, os estudos com sacarose mostravam que o seu uso levava a formação de levana, sorbitol e outros fruto-oligossacarídeos, diminuindo a produtividade de etanol. Quanto a levana, é possível controlar sua produção por meio do controle de pH (acima de 5,0) e a regulação da concentração de sacarose (menor que 200 g/L), pois regula a ação da enzima levanasacarase que é responsável tanto pela hidrólise de sacarose quanto pela síntese de levana. Assim, apesar da *Z. mobilis* produzir uma variedade de subprodutos, é possível minimizar sua síntese por meio do controle de alguns parâmetros físicos ou por manipulação genética; permitindo a alta eficiência na formação de etanol (BUCHHOLZ; EVELEIGH, 1990; DOELLE; GREENFIELD, 1985a; DOELLE; GREENFIELD, 1985b). Outro fator efetivo para neutralizar a formação de levana é o aumento da temperatura (VIIKARI, 1988). Contudo, esse aumento da temperatura não inibe a formação de sorbitol e de outros oligossacarídeos.

Outro estudo com melaço mostrou que não havia formação de sorbitol quando comparado ao caldo de cana-de-açúcar e levou a conclusão que altas concentrações de sais eram importantes para suprimir a formação de sorbitol. Estabeleceu-se, então, que

íons cloro e potássio eram minerais dominantes na diversificação do carbono de frutose para sorbitol ou oligômeros (DOELLE, M. B; DOELLE, H. W., 1989).

Ainda em relação ao melaço, os estudos apresentaram que seus componentes eram inibitórios para o crescimento e a fermentação com *Z. mobilis*. Alguns desses componentes vinham do uso de fertilizantes, mas também os sais inorgânicos presentes podiam inibir a atividade da bactéria (MEADE et al., 1977). Todavia, tecnologia com membrana podia ser aplicada para dessalinizar o meio (RHEE et al., 1984). Estudos relacionados às fermentações com melaço dessalinizado resultaram, no geral, em taxas mais rápidas na produção de etanol e maior rendimento (DOELLE et al., 1990).

A fermentação com outros substratos também foi estudada, como milho, batata, trigo e maltodextrina. Descobriu-se que a presença de lignina e outros substratos sólidos, derivados de celulose de madeira não inibiam a fermentação em batelada, apresentando rendimento de até 96% (PAREKH, S. R.; PAREKH, R. S.; WAYMAN, 1989). Os materiais lignocelulósicos podem ser uma matéria-prima alternativa para a produção sustentável de bioetanol e outros bioprodutos com uma ampla gama de benefícios econômicos e ambientais (HAHNHAGERDAHL et al., 2007). Em um estudo realizado por Jeon, Xun e Rogers (2010) com materiais celulósicos para a produção de etanol de segunda geração, descobriu-se que os materiais que permitiram maiores rendimentos de etanol e produtividade foram a palha de trigo e o hidrolisado de bagaço de cana. A palha de sorgo, a parte superior da cana e o hidrolisado de *Arundo donax* tiveram características similares, enquanto que o hidrolisado de madeira (pinho, eucalipto e *Mallee*) apresentou baixa produtividade e baixas concentrações de etanol. Eles concluíram que para se obter um bom rendimento de etanol dentre os materiais lignocelulósicos disponíveis, a partir da biomassa de fontes da agricultura e silvicultura, é preciso usar aqueles provenientes de materiais herbáceos, como exemplo o bagaço de cana-de-açúcar e a palha de sorgo.

6. Estratégias para melhorar as culturas de *Z. mobilis*

Como vimos até o momento, a *Z. mobilis* é capaz de produzir altas concentrações de etanol. Contudo, há várias restrições para o seu uso, como o de substratos alternativos à glicose, o que influenciam em seu rendimento. Além de que, a *Z. mobilis*, assim como as leveduras, não são capazes de fermentar pentoses. Devido a esses e outros fatores, vários estudos foram e são focados no seu melhoramento para produção de etanol.

O melhoramento de uma cultura depende da natureza, qualidade e quantidade do produto desejado e da susceptibilidade do organismo (ROWLANDS, 1984). A *Z. mobilis*, por ser um organismo procarioto e uma bactéria gram-negativa, é mais susceptível a manipulações genéticas quando comparada com leveduras (PANESAR; MARWAHA;

KENNEDY, 2006; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2000). As principais modificações descritas a seguir foram realizadas para superar as várias limitações dessa bactéria e torná-la útil para produção de etanol e, principalmente, para etanol de segunda geração.

Foram encontrados, até o presente momento, três subespécies de *Z. mobilis*, a *Z. mobilis* subespécie *pomaceae*, *Z. mobilis* subespécie *mobilis* e *Z. mobilis* subespécie *Francensis* (COTON, M. et al 2006a; COTON, M. et al.; 2006b; COTON, M.; LAPLACE; COTON, 2005; SWINGS; DE LEY, 1977). Entre essas linhagens, a ATCC 31821 (ZM4), ATCC 10988 (ZM1), ATCC29191 (ZM6), CP4, e NCIMB 11163 de *Z. mobilis* subespécie *mobilis*, ATCC 29192 de *Z. mobilis* subespécie *pomaceae* foram bem caracterizadas por vários estudos já publicados, em níveis de fisiologia, bioquímica, fermentação, genética e metabolismo. Essas culturas estão relacionadas como organismos-modelo de *Z. mobilis* para pesquisa e aplicações industriais (HE et al., 2014). Desde a década de 80, várias ferramentas genéticas têm sido desenvolvidas para esta bactéria, incluindo plasmídeos nativos, vetores de ampla gama de hospedeiros ou vetores de transporte, sistema de expressão, transferência de genes, promotores e gene repórter (PANESAR; MARWAHA; KENNEDY, 2006; ROGERS et al., 2007). Veremos, a seguir, as principais modificações feitas nessas linhagens de *Z. mobilis* para seu uso na produção industrial de etanol e de outros produtos com alto valor agregado.

6.1. Deleção de genes específicos

A deleção gênica está relacionada a uma série de mecanismos por meio dos quais a expressão de um gene é regulada negativamente. Esse processo gera modificações celulares epigenéticas que podem ser herdadas para as células filhas através da mitose, sem que haja alteração na sequência de nucleotídeos do DNA (ALBERTS et al., 2008). O desenvolvimento de deleção de genes forneceu uma grande melhoria na engenharia metabólica da *Z. mobilis*. Diferentes métodos estão sendo aplicados atualmente para a inativação de genes específicos dessa bactéria, como os genes que codificam as enzimas piruvato descarboxilase, álcool desidrogenase, lactato desidrogenase, NADH desidrogenase, glucose-frutose oxirredutase, entre outras. Esses genes foram selecionados como alvos para a melhoria de alguns fenótipos específicos, como aumentar produção de levana, melhorar o uso de xilose, aumentar a produção de etanol, entre outros (HE et al., 2014).

6.2. Sequenciamento do genoma de diferentes culturas de *Z. mobilis*

A tecnologia de sequenciamento de genoma é capaz de fornecer profundas e fundamentais reflexões para facilitar o desenvolvimento de novas culturas (JEFFRIES, 2005). O primeiro sequenciamento do genoma da *Z. mobilis* ZM4 foi apresentado em

2005, por Seo et al. Segundo esse autor: “o genoma consiste de 2.056.416 pares de bases formando um cromossoma circular com 1.998 fases de leitura aberta (*ORFs*) e três unidades de transcrição RNA ribossomal”.

A sequência completa do genoma de outras linhagens de *Z. mobilis* também foram relatadas desde 2005 (DESINIOTIS et al., 2012; KOUVELIS et al., 2009, 2011, 2014; ZHAO et al., 2012). Todas as linhagens contêm um cromossomo circular e tipos de plasmídeo, porém, o tamanho do genoma varia.

6.3. Transcriptoma ou expressão de genes da *Z. mobilis*

Por meio do transcriptoma (conjunto de RNAs mensageiros que uma célula está expressando, sob certas condições, num determinado momento) é possível conhecer os genes que são expressos diferencialmente como resposta a diferentes estímulos, tais como estresses abióticos ou infecção por patógenos; ou em tipos celulares específicos, como em estudos de diferenciação celular (ZACHARIAH; DHANASEKARAN, 2004). Atualmente, muitos pesquisadores estão focando na caracterização do transcriptoma da *Z. mobilis* para obter um melhor entendimento sobre as conexões dos genes e a regulação metabólica, pois com diferentes projetos genomas dessa bactéria, é possível obter comparativas genômicas e análise de expressão a nível global o que fornece guias para futuras melhorias das culturas (HE et al., 2014).

6.4. Melhoramento de cultura por mutagênese convencional

Muitos dos melhoramentos de algumas linhagens foram obtidos por mutagênese e seleção, sendo esses processos muito úteis para a *Z. mobilis* (HE et al., 2014). A *Z. mobilis* é um microrganismo relativamente resistente a esse processo, porém luz ultravioleta (UV) e 1-metil-3-metil-nitro-1-nitroguanidina (NTG) são mutagênicos efetivos a essa bactéria. Com esse método foi possível isolar culturas com vários tipos de características, como culturas com maior tolerância à etanol, à maiores concentrações de íons Na⁺, Mg⁺ e Cl⁻, o que ajuda a prevenir a dessalinização desses íons no meio de fermentação tornando o processo mais econômico. Ou culturas deficientes na utilização de frutose para crescimento, o que potencializa o enriquecimento de frutose em meios com alta concentração para produção de xaropes ou açúcares invertidos. Há ainda mutantes que são tolerantes à acetaldeído; ou que tiveram sua taxa de crescimento melhorada na presença de manitol; termotolerantes que apresentam um bom crescimento em hidrolisado de celulose; defeituosos em levansucrase; mutantes deficientes na capacidade de utilizar glicose e frutose, que enriquece o método de produção de D-cicloglicerina. Outro sucesso da mutagênese foi o isolamento de um osmotolerante da *Z. mobilis* ZM4 que mostrou ótimo crescimento e produção de etanol

quando cultivado com melaço de beterraba (HE et al., 2014). Ou ainda, uma cepa capaz de metabolizar xilose mais rápido que sacarose quando misturada com glicose e xilose (AGRAWAL; MAO; CHEN, 2011) e outra tolerante à meio ácido capaz de se desenvolver em condições não assépticas para produção de etanol (TAO et al., 2005).

6.5. Melhoramento de cultura por mutagênese com transposon

Transposons são sequências de DNA móveis que podem se autorreplicar em um determinado genoma (PRODABI/ICB – UFMG, 2016). A mutagênese por transposon pode ser utilizada na identificação de genes, pois inserções de transposons podem alterar a regulação e a expressão dos genes (HAMER et al., 2001). Esse método forneceu uma alternativa à abordagem mutagênica para a *Z. mobilis*. Após várias tentativas de uso deste método nessa bactéria, alguns estudos obtiveram sucesso e um grande número de mutantes auxotróficos, estáveis e independentes, foram isolados (PAPPAS; GALANI; TYPAS; 1997). Como exemplo temos a sequência de inserção IS5, designado ISZm1068, que foi o primeiro isolado de *Z. mobilis* CP4 o qual foi mantido ativo em *Escherichia coli* e levou a fusões de plasmídeo de replicação (GALEROS et al., 2001).

6.6. Melhoramento de cultura por evolução adaptativa em laboratório (ALE – *Adaptive Laboratory Evolution*)

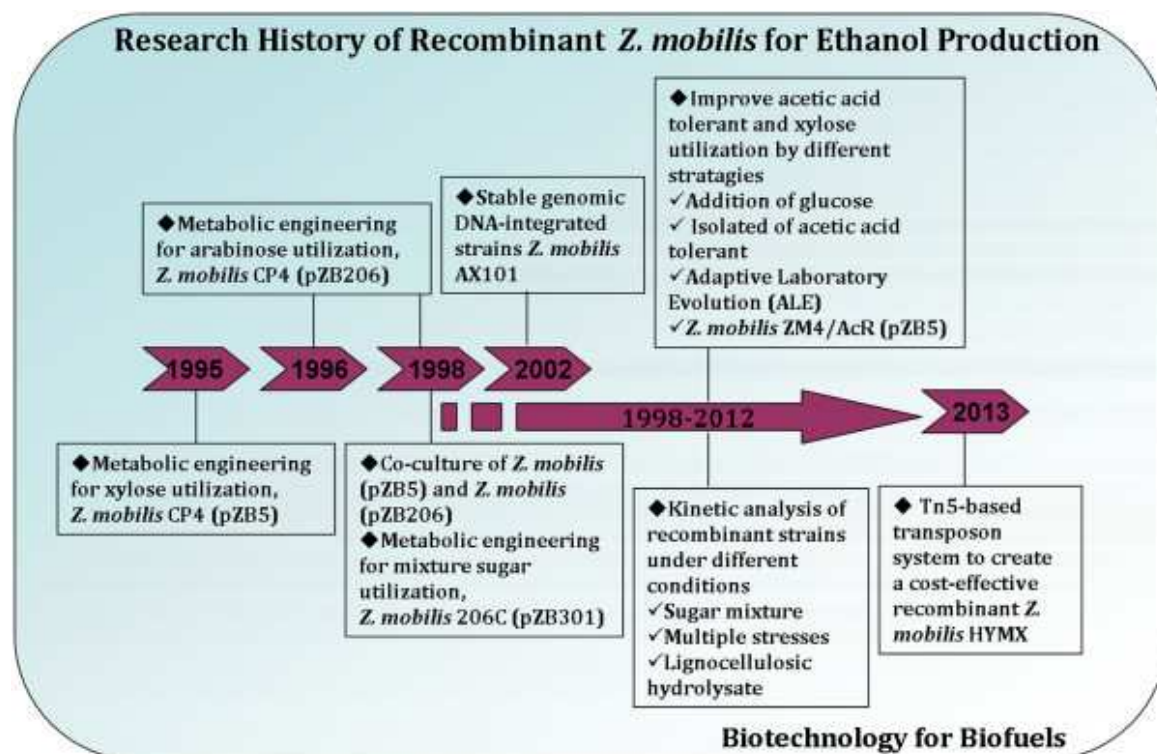
Evolução adaptativa em laboratório (ALE) é um método frequente em estudos biológicos para obter conhecimentos dos mecanismos básicos da evolução molecular e mudanças adaptativas que acumularam nas populações microbianas durante um certo período de tempo sob condições específicas de crescimento (DRAGOSITS; MATTANOVICH, 2013). É também um interessante método na engenharia metabólica para desenvolvimento e otimização de culturas (CHATTERJEE; YUAN, 2006; CONRAD; LEWIS; PALSSON, 2011; DRAGOSITS; MATTANOVICH, 2013; HE et al., 2014; PAL et al., 2005; PORTNOY; BEZDAN; ZENGLER, 2011). Estudos demonstraram que adaptação e engenharia metabólica podem ser usados sinergicamente para a melhoria de microrganismos, sendo que esse método já foi usado para melhorias de algumas linhagens de *Z. mobilis*. Como exemplo temos a mutação adaptativa desenvolvida para mapear as linhagens tolerantes à ácido acético e outras mutações obtidas para maiores usos na produção de etanol (WANG, 2008; HE et al., 2014). Desenvolver uma linhagem de *Z. mobilis* capaz de tolerar a presença de ácido acético no meio é um fator extremamente importante na produção de etanol de segunda geração, pois a biomassa pré-tratada possui altas concentrações desse ácido. O ácido acético é um inibidor natural da *Z. mobilis*, impedindo seu crescimento e reduzindo sua produtividade de etanol. Por

isso o desenvolvimento de uma cepa capaz de tolerar certas quantidades desse ácido é tão importante (WANG, 2008). Outro importante estudo que utilizou este método selecionou uma cultura de *Z. mobilis* que possui alta eficiência de fermentação com xilose (AGRAWAL; MAO; CHEN, 2011; HE et al., 2014). Esses dois exemplos demonstram a importância deste método na engenharia metabólica para o melhoramento das características da *Z. mobilis* (HE et al., 2014).

6.7. Tecnologia do DNA recombinante e o aumento da gama de substratos utilizados pela *Z. mobilis*

Vários esforços têm sido feitos para aumentar a gama de açúcares utilizados pela *Z. mobilis*, principalmente os industrialmente atrativos, como trigo, amido e celulose (HE et al., 2014; PANESAR; MARWAHA; KENNEDY, 2006). Cepas recombinantes de *Z. mobilis* capazes de fermentar, simultaneamente, hexoses e pentoses de hidrolisados lignocelulósicos à etanol vem sendo desenvolvidas desde 1995 (HE et al., 2014). A figura 8 apresenta um breve histórico de pesquisas nessa área.

Figura 8 - Histórico de culturas recombinantes para produção de etanol



Fonte: (HE et al., 2014)

Em 1995, um artigo publicado por pesquisadores do Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL - *National Renewable Energy Laboratory*), nos EUA, mostrava

o surpreendente potencial da *Z. mobilis* como catalisadora no processo de hidrólise de açúcares para produção de biocombustíveis. A descoberta dos pesquisadores foi que, ao introduzir os genes apropriados na bactéria, esta poderia digerir uma ampla gama de açúcares. Enquanto a típica *Z. mobilis* ou a levedura usam apenas hexoses, a *Z. mobilis* CP4 (pZB5) podia consumir pentoses (derivada de hemicelulose), tais como xilose, e converter em etanol. A *Z. mobilis*, ou Zymo, pode produzir significativamente mais etanol do que a levedura, considerando massa de célula fixa e tempo (NREL, 2015).

Baseado nessa pesquisa do NREL, Deanda et al., 1996, construiu a *Z. mobilis* CP4 (pZB206) que é capaz de fermentar a arabinose, açúcar proveniente da biomassa. O rendimento máximo de etanol era de 98% do teórico. Em 1998, desenvolveu-se as culturas *Z. mobilis* ATCC 39676 (pZB4L) e ATCC 39676 (pZB206) para co-fermentarem glicose, xilose e arabinose, simultaneamente, realizando a conversão completa da biomassa lignocelulósica. O rendimento desse processo de co-fermentação, em condições ótimas, era de 72,5% do máximo teórico. Contudo, a cultura que metaboliza xilose, assim como a própria xilose, afetava o desempenho da cultura que metaboliza arabinose e, assim, havia uma ordem de preferência para metabolizar os açúcares, sendo primeiro a glicose, depois a xilose e, por último, a arabinose. (HE et al., 2014; MOHAGHEGHI; EVANS; FINKELSTEIN; ZHANG, 1998). A partir dessas considerações, construiu-se uma única cepa, a *Z. mobilis* 206C (pZB301) que podia fermentar uma mistura de açúcares, com 82 a 84% do rendimento teórico (HE et al., 2014; ZHANG et al., 1998).

Para melhorar a estabilidade genética, todos os genes necessários para utilização de pentoses foram integrados no genoma da *Zymomonas* e uma cultura estável de *Z. mobilis*, a AX101, foi construída em 2002. Essa cultura é capaz de fermentar uma mistura de pentoses e hexoses por meio de uma ordem preferencial (HE et al., 2014; MOHAGHEGHI; EVANS; CHOU; ZHANG, 2002). Todas as cepas recombinantes construídas até então eram sensíveis à ácido acético e, como dito anteriormente, esse ácido é um inibidor natural da *Z. mobilis* e afeta a sua capacidade de assimilar xilose. Várias técnicas foram utilizadas para desenvolver culturas capazes de tolerar certas quantidades desse ácido, como adição de glicose, isolamento de uma linhagem tolerante à ácido acético, técnica de evolução adaptativa em laboratório (ALE) e o desenvolvimento de uma cepa resistente, a *Z. mobilis* ZM4/AcR (pZB5) (HE et al., 2014).

As três melhores culturas recombinantes para produção de etanol de segunda geração de diferentes plataformas são a *E. coli* KO11, *S. cerevisiae* 424A (LNH-ST) e a *Z. mobilis* AX101, as quais foram comparadas com material celulósico pela primeira vez. A que mostrou a maior taxa de consumo de glicose e o mais baixo rendimento de

subprodutos foi a *Z. mobilis* AX101. Os resultados também apresentaram que a via metabólica da *E. coli* KO11 e da *Z. mobilis* AX101 são mais efetivas na fermentação de etanol do que a via relacionada da levedura (HE et al., 2014; LAU et al., 2010).

Em um estudo mais recente foi reportada a sequência completa do genoma da *Z. mobilis* ZM4 (ATCC 31821), o que permitiu ampliar o conhecimento dessa bactéria e melhorá-la de forma a ser utilizada na produção de produtos com alto valor agregado (SEO JS et al., 2005).

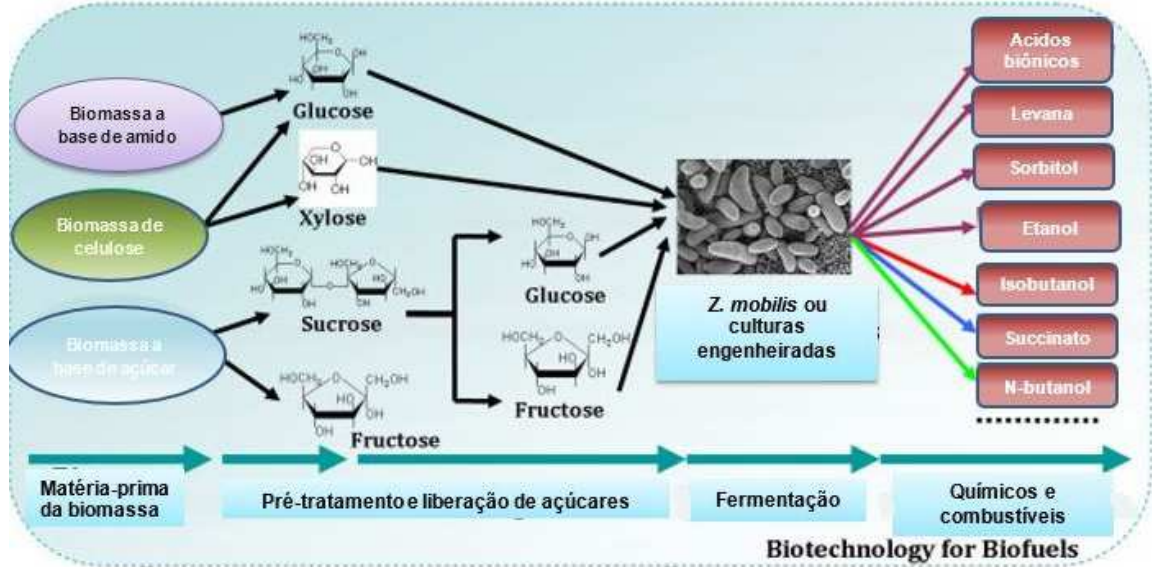
Embora diferentes tipos de culturas de *Z. mobilis* tenham sido desenvolvidas, a conversão direta de biomassa celulósica em etanol é uma tarefa ainda em desenvolvimento. Um processo denominado bioprocessamento consolidado (CBP – *consolidated bioprocessing*), o qual combina produção e secreção de enzimas ativas em carboidratos, hidrólise de celulose e hemicelulose, e fermentação de pentoses e hexoses em biocombustíveis, como o etanol. Sendo todo esse processo em uma única etapa (HE et al., 2014; LYND et al., 2005). Todos os resultados das pesquisas nessa área, com *Z. mobilis*, indicaram que esse microrganismo pode servir como uma importante plataforma CBP (HE et al., 2014).

6.8. Outros bioprodutos com valor agregado produzido pela *Z. mobilis*

Além do grande interesse da indústria pela *Z. mobilis* para produção de etanol, os estudos nessa área permitiram avaliar a produção de outros subprodutos de interesse industrial por esse microrganismo. Por exemplo, a produção de sorbitol, utilizado na produção de álcoois, poliálcoois, aminoácidos, ácidos carboxílicos e vitamina C (FERREIRA; SILVA, 2013). Produção de ácidos biônicos, utilizados na área de cosméticos e cuidados com a pele (GREEN; BRIDEN, 2015). Produção de levana, um polímero de frutose, que tem grande potencial na tecnologia de alimentos e aplicações médicas (BEKERS et al., 2001). Produção de ácido succínico, intermediário do ciclo de Krebs, possui ampla aplicação na indústria de transformação (OLIVEIRA, 2013). E produção de isobutanol, entre outros produtos (HE et al., 2014).

A figura 9 resume os tipos de substratos utilizados para obter os açúcares que a *Z. mobilis* e suas cepas modificadas geneticamente podem fermentar e os produtos que podemos obter com valor agregado.

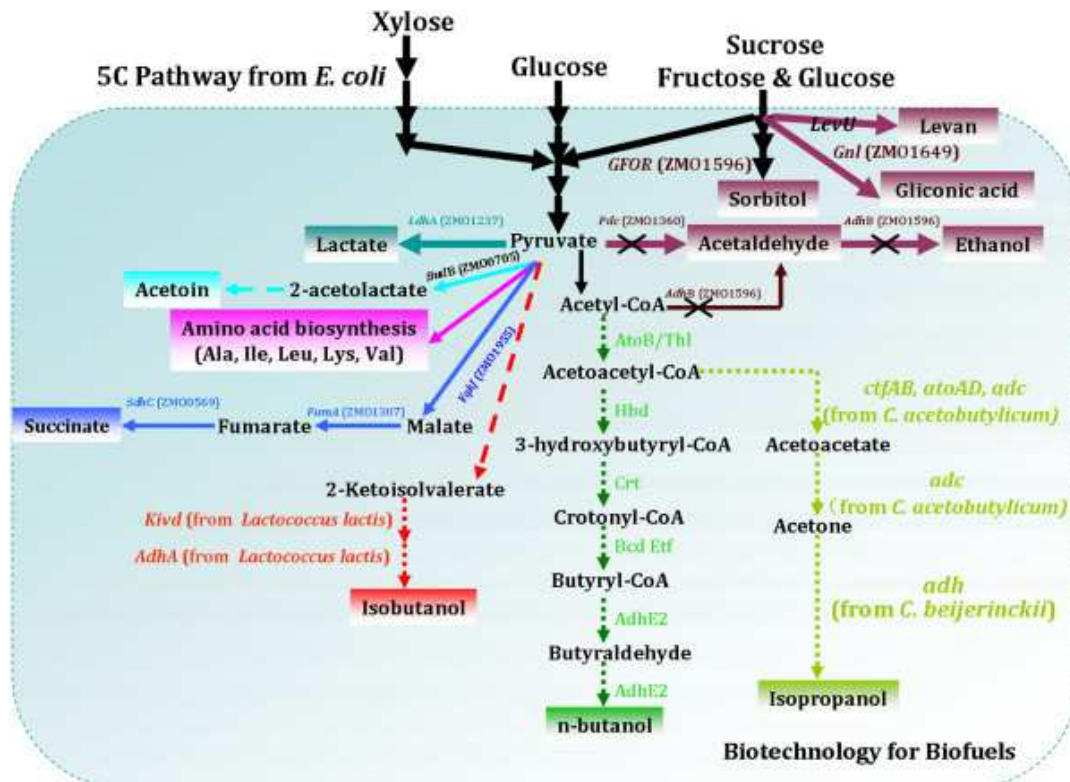
Figura 9 - Processo geral para produção de combustíveis e químicos por *Z. mobilis*



Fonte: Adaptado de (HE et al., 2014)

A figura 10 ilustra as vias metabólicas para a síntese desses produtos de alto valor agregado usando a *Z. mobilis* como plataforma.

Figura 10 - Vias metabólicas da *Z. mobilis* para síntese de produtos com alto valor agregado



Fonte: (HE et al., 2014).

As linhas sólidas indicam as vias nativas da *Z. mobilis* e as linhas pontilhadas referem-se a via recombinante obtida por estratégias da engenharia metabólica.

Abreviações das enzimas e dos genes: *gfor*, glucose-frutose oxidorreductase; *ldhA*, lactato desidrogenase; *pdc*, piruvate decarboxilase; *gnl*, glicono- σ -gliconase; *adc*, acetoacetato desidrogenase; *adh*, álcool secundário desidrogenase; *adhB*, álcool desidrogenase; *adhE*, acetaldeído/álcool desidrogenase; *adhE2*, álcool secundário desidrogenase; *atoAD*, acetil-CoA:acetoacetil-CoA transferase; *atoB*, acetil-CoA aciltransferase; *bcd*, butiril-CoA desidrogenase; *crt*, crotonase; *ctfAB*, acetoacetil-CoA transferase; *etfBA*, eletrotransferidor de proteína flavor; *hbd*, β -hidroxi butiril-CoA desidrogenase; *thl*, acetil-CoA aciltransferase; *kivd*, cetoisovalerato descarboxilase (HE et al., 2014).

Sendo a *gfor* a enzima mais importante envolvida na conversão de glicose e frutose em ácido glucônico e sorbitol, respectivamente. E é uma enzima dependente da concentração de glicose no meio. (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009).

7. Justificativas finais das vantagens da *Z. mobilis* e sua comparação com leveduras

7.1. Estudo comparando a *Z. mobilis* com uma levedura

Em um estudo comparativo feito entre *Z. mobilis* e a levedura *Saccharomyces carlsbergensis*, que é também utilizada na indústria, é possível perceber algumas das vantagens da bactéria, como menor tempo de processo, maior velocidade específica de produção, menor produção de biomassa e maior conversão de glicose em etanol.

Tabela 4 - Estudo comparativo entre a bactéria *Z. mobilis* e a levedura *S. carlsbergensis*

	<i>Z. mobilis</i>	<i>S. carlsbergensis</i>
Tempo de processo (h)	2,51	5,64
μ_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 (μ_p), fator de conversão de glicose em células ($Y_{x/s}$) e em etanol ($Y_{p/s}$).

Fonte: (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009; ROGERS; SKOTNICKI; LEE, K. J.; LEE, J. H., 1984).

Nesse estudo da cinética de produção de etanol pela *Z. mobilis* ATCC 10988 e *S.*

carlsbergensis, Rogers et al. (1980), observaram que em altas concentrações de açúcar ambos os microrganismos fermentaram completamente 250 g/L de glicose, produzindo etanol após 30 a 40 horas, com uma concentração superior a 100 g/L. E ainda demonstraram que a concentração de biomassa da bactéria foi consideravelmente menor que a da levedura, o que indicava uma maior velocidade específica de consumo de açúcar e de produção de etanol pela *Zymomonas* (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009).

7.2.Pontos críticos apontados pelo uso da *Z. mobilis* em escala industrial

Um dos principais pontos discutidos para se utilizar *Z. mobilis* em fermentação em larga escala é se o controle de contaminações é necessário, principalmente pela presença de culturas de *Lactobacillus* tolerantes à etanol. Tal contaminação também é um problema em muitos processos com leveduras, o que reduz o rendimento em 2 a 5%. No caso das leveduras esse impacto é reduzido pelo decréscimo do pH a 3,0-3,5 no final da fermentação, denominado de “lavagem ácida”. Contudo, a *Z. mobilis* é mais sensível a pH mais baixos que a *S. cerevisiae*, mostrando que esse fato poderia ser um problema para o seu uso na indústria (BRINGER et al., 1984; ROGERS et al., 2007). Porém, Lawford e Rousseau (1994), demonstraram que o ácido lático produzido por esses contaminantes em certas circunstâncias, não seriam inibidores para a *Z. mobilis*. Em outro estudo realizado por Grote et al. (1985), no qual contaminaram um meio de cultura de *Z. mobilis* com *Lactobacillus* sp. isoladas, observaram que a adição do contaminante causou apenas um distúrbio temporário no processo e que as condições se tornaram estáveis novamente após 5 a 6 gerações. Esses resultados sugeriram que a contaminação não é de fato um problema, uma vez que se tenha uma cultura ativa de *Z. mobilis* e mantenha o pH entre 3,5 a 4,0 (ROGERS et al., 2007).

Outro ponto discutido sobre o uso dessa bactéria é que ela pode ser menos robusta que uma levedura e mais susceptível a contaminações em processos em larga escala, assim como a falta de experiência da indústria com fermentações com bactérias. Além disso, há um mercado estabelecido para alimentação animal com o uso de derivados de leveduras com alto teor de proteína e qualquer novo mercado para esse tipo de derivado a partir do processo com *Zymomonas* precisaria ser estabelecido (ROGERS et al., 2007). Uma resposta e/ou alternativa para esses pontos é discutido na tabela 5.

A construção de cepas recombinantes de *Z. mobilis* capazes de usar pentoses, xilose e arabinose, abriram novas oportunidades para o mercado de etanol celulósico, como podemos observar com a recente inauguração da planta de etanol celulósico da DuPont nos EUA (ROGERS et al., 2007; NREL, 2015). A experiência com fermentações bacterianas em larga escala podem fornecer boas plataformas futuras para uma

crescente gama de produtos com alto valor agregado gerados por engenharia metabólica de microrganismos como a *Z. mobilis*, capazes de metabolizar açúcares de forma rápida e altamente eficientes (ROGERS et al., 2007). Os pontos críticos e as alternativas foram resumidos por Rogers et al (2007) na tabela 5.

Tabela 5 – Pontos críticos apresentados para não utilizar processos com *Zymomonas* para produção de etanol

Pontos críticos	Comentários
1. Leveduras já estão estabelecidas como produtoras de etanol a partir de fermentações com açúcar e amido.	Práticas industriais bem estabelecidas superam as potenciais vantagens de alto rendimento e alta produtividade de processos com <i>Zymomonas</i> . Não há a formação de glicerol como subproduto no final do processo, podendo ser uma potencial vantagem na diminuição de problemas de “incrustação” durante a destilação.
2. Levedura é mais robusta em termos de tolerância a inibidores, sais e condições de baixos pH.	Tanto levedura quanto a <i>Z. mobilis</i> são influenciadas por inibidores, embora a segunda seja mais sensível a altas concentrações salinas (como melaço) e baixo pH (menos que 3,5). Cepas resistentes a inibidores têm sido isoladas de hidrolisados lignocelulósicos.
3. Leveduras possuem subprodutos com alto teor de proteínas usados em destilarias como suplemento para alimentação animal.	<i>Z. mobilis</i> é um organismo GRAS e possui conteúdo com teor de proteína bruta mais alto (65-70%) do que de leveduras (50-55%). É necessário desenvolver um mercado nicho nessa área para a <i>Z. mobilis</i> seguido de ensaios com alimentação animal.
4. Controle de contaminação (com bactéria láctica) é fácil de obter com leveduras usando condições a baixo pH.	Experimentos laboratoriais com cultivo contínuo (pH = 5) mostraram que a <i>Z. mobilis</i> é bem resistente à fermentação, uma vez estabelecida a fermentação (possivelmente devido às taxas de competição muito mais elevadas de absorção do açúcar). Culturas de alta densidade (uso de flocos) poderiam minimizar maiores problemas de contaminações e facilitar fermentações com altas produtividades. Não há nenhuma evidência relatada de qualquer contaminação de bacteriófagos com a <i>Z. mobilis</i> . Há evidência de alta restrição da atividade enzimática em algumas cepas.
5. A falta de experiência da indústria assim como questões regulatórias com fermentações bacterianas em larga escala, incluindo aquelas com bactérias recombinantes.	Experiências estão sendo ganhas ultimamente pela indústria com algumas fermentações bacterianas em larga escala, como a produção de 1,3-propanodiol usando <i>E. coli</i> . Questões regulatórias similares seriam aplicáveis para o uso de leveduras recombinantes com hidrolisados lignocelulósicos.

Fonte: (ROGERS et al., 2007)

E, por fim, a tabela 6 resume as características da *Z. mobilis* para produção de etanol:

Tabela 6 - Características da *Z. mobilis* para produção de etanol e produtos de alto valor agregado

-
1. Velocidade específica consideravelmente alta de consumo de açúcar e produção de etanol (2 a 3 vezes mais rápida que a das leveduras).
 2. Rendimento de etanol alto e de biomassa, baixo quando comparado às leveduras, devido aos diferentes metabolismos de carboidratos (Entner-Doudoroff x via glicolítica).
 3. Alta produtividade reportada (120-200 g/L.h) em processo contínuo com células de reciclo (o máximo reportado para leveduras foi de 30-40 g/L.h).
 4. Condições de crescimento simples. A *Z. mobilis* cresce anaerobicamente (facultativo) e não requer controle de adição de oxigênio para manter a viabilidade celular a altas concentrações de etanol.
 5. Tolerância a etanol semelhante às leveduras, se não melhor. Relatado concentrações de etanol de 85 g/L (11% v/v) para cultura contínua e até 127 g/L (16% v/v) em batelada.
 6. Estudos de muitos anos mostraram que, em escala laboratorial com cepas de *Z. mobilis* em fermentações controladas (pH = 5,0, T = 30° C), não ocorreram significativas contaminações ou problemas de infecções com bacteriófagos.
 7. O amplo espectro de técnicas desenvolvidas para manipulação genética da bactéria (como *Escherichia coli*) podem ser aplicados para desenvolver cepas recombinantes de *Z. mobilis* e/ou sua engenharia metabólica.
 8. Culturas recombinantes integradas de *Z. mobilis* disponíveis para produção de etanol eficiente a partir de glicose, xilose e arabinose. Relatado concentrações de etanol acima de 60 g/L, em 48 horas, com meio contendo 65 g/L de glicose e 65 g/L de xilose.
 9. O sequenciamento do genoma da *Z. mobilis* ZM4 fornece informações para a sua engenharia metabólica de forma a adicionar produtos com alto valor agregado (por exemplo, ácido succínico).
 10. Potencial uso de suas enzimas para biotransformações de química fina.
-

Fonte: (ROGERS et al., 2007)

CONCLUSÃO

Apesar do longo histórico de uso da levedura na produção de etanol, pela levedura já estar bem consolidada no mercado e a sua fácil disponibilidade, é importante destacar que esses fatores não a torna a melhor opção para produzir etanol. A *Z. mobilis* é uma bactéria capaz de produzir etanol duas a três vezes mais rápida que as leveduras; possui condições de crescimento simples, sem necessidade de se controlar a adição de oxigênio no meio; tolerantes à altas concentrações de etanol; não apresentam problemas com contaminações com bacteriófagos; são mais susceptíveis à manipulações genéticas e suas versões geneticamente melhoradas são capazes de fermentar as pentoses da biomassa lignocelulósica para produção de etanol de segunda geração. Esses são alguns dos fatores que a tornam um microrganismo atrativo para a indústria. E não é por menos que grandes empresas desta área estão investimento no melhoramento contínuo

desta bactéria e aperfeiçoando seu uso em escala industrial. A utilização da *Z. mobilis* em grandes biorrefinarias é uma tecnologia recente, mas já utilizada por grandes indústrias. Mas ainda assim é preciso mais incentivo nessa área por parte dos governos, universidades e indústrias, com mais estudos e testes com a *Z. mobilis*, pois não é tão fácil implantar uma nova tecnologia em um mercado que já possui um esquema de produção bem consolidado. Mas, para que isso aconteça, é importante abranger seu uso comercial, tornando-a uma alternativa real para as biorrefinarias, de forma que seja possível cada vez mais aperfeiçoar o seu uso e consolidar de vez a *Z. mobilis* no mercado.

REFERÊNCIAS

AFTA Brazilian alcohol: A review of production, subsidies and incentives. Association for Fair Trade in Alcohol, Brussels, Belgium, 2000.

AGRAWAL, M.; MAO, Z.; CHEN, R. R. Adaptation yields a highly efficient xylose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain. *Biotechnology and bioengineering*, v. 108, n. 4, p. 777-785, 2011.

AGRAWAL, M.; WANG, Y.; CHEN, R. R.. Engineering efficient xylose metabolism into an acetic acid-tolerant *Zymomonas mobilis* strain by introducing adaptation-induced mutations. *Biotechnology letters*, v. 34, n. 10, p. 1825-1832, 2012.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York, 1.268p., 2008.

ALTERTHUM, F. *Elementos de microbiologia. Biotecnologia Industrial-Fundamentos*, v. 1, p. 1-32, 2001.

AMIN, G.; VAN DEN EYNDE, E.; VERACHTERT, H. Determination of by-products formed during the ethanolic fermentation, using batch and immobilized cell systems of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces bayanus*. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, v. 18, n. 1, p. 1-5, 1983.

BARATTI, Jacques C.; BU'LOCK, J. D. *Zymomonas mobilis: a bacterium for ethanol production*. *Biotechnology advances*, v. 4, n. 1, p. 95-115, 1986.

BARNETT J.A., PAYNE R.W., YARROW D. *Yeasts: characteristics and identification*, 2 ed., Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1990.

BARNETT, JAMES A. The utilization of sugars by yeasts. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, v. 32, p. 125-234, 1975.

BEKERS, M. et al. Levan-ethanol biosynthesis using *Zymomonas mobilis* cells immobilized by attachment and entrapment. *Process Biochemistry*, v. 36, n. 10, p. 979-986, 2001.

BERTASSO, M. Produção de sorbitol e ácido glucônico por células imobilizadas íntegras

de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa. 1996.

BIDEAUX, Carine et al. Minimization of glycerol production during the high-performance fed-batch ethanolic fermentation process in *Saccharomyces cerevisiae*, using a metabolic model as a prediction tool. Applied and environmental microbiology, v. 72, n. 3, p. 2134-2140, 2006.

BRINGER, S., SAHM, H., SWYZEN, W. Ethanol production by *Zymomonas mobilis* and its application on an industrial scale. In: Biotechnol. Bioeng. Symp.; (United States). Institute fuer Biotechnologie der Kernforschungsanlage, Juelich, Germany, FR; Pfeifer and Langen, Dormagen, Germany, FR, 1984.

BUCHHOLZ, Steven E.; EVELEIGH, Douglas E. Genetic modification of *Zymomonas mobilis*. Biotechnology advances, v. 8, n. 3, p. 547-581, 1990.

CHATTERJEE, R.; YUAN, L. Directed evolution of metabolic pathways. TRENDS in Biotechnology, v. 24, n. 1, p. 28-38, 2006.

CONRAD, T. M.; LEWIS, N. E.; PALSSON, B. Microbial laboratory evolution in the era of genome-scale science. Molecular Systems Biology, v. 7, n. 1, p. 509, 2011.

COTON, M. et al. "Framboisé" spoilage in French ciders: *Zymomonas mobilis* implication and characterization. LWT-Food Science and Technology, v. 39, n. 9, p. 972-979, 2006.

COTON, M. et al. Polyphasic study of *Zymomonas mobilis* strains revealing the existence of a novel subspecies *Z. mobilis* subsp. *francensis* subsp. nov., isolated from French cider. International journal of systematic and evolutionary microbiology, v. 56, n. 1, p. 121-125, 2006.

COTON, M.; LAPLACE, J. M.; COTON, E. *Zymomonas mobilis* subspecies identification by amplified ribosomal DNA restriction analysis. Letters in applied microbiology, v. 40, n. 2, p. 152-157, 2005.

CUNHA, M. A. Al. et al. Uso de células imobilizadas em gel de PVA: uma nova estratégia para produção biotecnológica de Xilitol a partir de bagaço de cana-de-açúcar. Semina: Ciências Agrárias, v. 26, n. 1, p. 61-70, 2005.

DEANDA, Kristine et al. Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering. Applied and Environmental Microbiology, v. 62, n. 12, p. 4465-4470, 1996.

DE LEY J., SWINGS J. The Biology of *Zymomonas*. Laboratory of Microbiology and Microbial Genetics, Faculty of Sciences, State University, B-9000 Gent, Belgium. American Society for Microbiology. Bacteriological Review, v. 41, n. 1, p. 1-46, 1977.

DESINIOTIS, Andreas et al. Complete genome sequence of the ethanol-producing *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* centrotpe ATCC 29191. Journal of bacteriology, v. 194, n. 21, p. 5966-5967, 2012.

DIEN, B. S.; COTTA, M. A.; JEFFRIES, T. W. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. Applied microbiology and biotechnology, v. 63, n. 3, p. 258-266, 2003.

- DIMARCO, Anthony A.; ROMANO, Antonio H. D-Glucose transport system of *Zymomonas mobilis*. Applied and environmental microbiology, v. 49, n. 1, p. 151-157, 1985.
- DOELLE, HORST W. et al. *Zymomonas mobilis* - science and industrial application. Critical reviews in biotechnology, v. 13, n. 1, p. 57-98, 1993.
- DOELLE, Horst W.; GREENFIELD, Paul F. Fermentation pattern of *Zymomonas mobilis* at high sucrose concentrations. Applied microbiology and biotechnology, v. 22, n. 6, p. 411-415, 1985.
- DOELLE, M B.; DOELLE, H. W. Ethanol production from sugar cane syrup using *Zymomonas mobilis*. **Journal of biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 25-36, 1989.
- DOELLE, H. W.; GREENFIELD, P. F. The production of ethanol from sucrose using *Zymomonas mobilis*. Applied microbiology and biotechnology, v. 22, n. 6, p. 405-410, 1985.
- DOELLE, M. B. et al. Effect of mineral ions on ethanol formation during sugar cane molasses fermentation using *Zymomonas mobilis* ATCC 39676. **Process biochemistry**, v. 25, n. 5, p. 151-156, 1990.
- DRAGOSITS, Martin; MATTANOVICH, Diethard. Adaptive laboratory evolution—principles and applications for biotechnology. Microbial cell factories, v. 12, n. 1, p. 1, 2013.
- ERNANDES, F. M. P. G., GARCIA-CRUZ, C. H. *Zymomonas mobilis*: um microrganismo promissor para a fermentação alcoólica. Semina: Ciências Agrárias, v. 30, n. 2, p. 361-380, 2009.
- FALCÃO DE MORAIS, J. O. *Zymomonas mobilis* e seu emprego como agente de fermentação alcoólica. Revista do Instituto de Antibióticos, v. 1, p. 169-182, 1982.
- FELDMANN, S. D., SAHM, H., SPRENGER, G. A. Pentose metabolism in *Zymomonas mobilis* wild-type and recombinant strains. Applied microbiology and biotechnology, v. 38, n. 3, p. 354-361, 1992.
- FERRANDIZ-GARCIA, F. Biotechnology. Genetic engineering. Chémico-pharmaceutical area. Revista española de fisiología, v. 38, p. 353-366, 1981.
- FERREIRA, V. F., SILVA, F. C. Carboidratos como fonte de compostos para a indústria de química fina. Química Nova, v. 36, n. 10, p. 1514-1519, 2013. Disponível em: http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol36No10_1514_05-NE13483.pdf. Acessado em: 09 de maio de 2016.
- GALEROS, Marios et al. ISZm1068: an IS5-like insertion element from *Zymomonas mobilis*. Archives of microbiology, v. 175, n. 5, p. 323-333, 2001.
- GNANSOUNOU, E., A. Dauriat. Ethanol fuel from biomass: A review. Journal of Scientific & Industrial Research, v. 64, p. 809–821, 2005.
- GONCALVES DE LIMA, O.; SCHUMACHER, I. E.; ARAÚJO, J. M. New observations about the antagonistic effects of *Zymomonas mobilis* var. *recifensis*-Ecological aspects of some problems in microbiology. Rev. Inst. Antibiótic, v. 12, n. 1/2, p. 57-69, 1972.
- GREEN, B A., BRIDEN, M. E. PHAs and Bionic Acids: Next Generation Hydroxy Acids. ClinicalGate., 2015. Disponível em: <http://clinicalgate.com/phas-and-bionic-acids-next->

[generation-hydroxy-acids/](#). Acessado em: 09 de maio de 2016.

GROTE, W.; ROGERS, L. P. The Susceptibility to Contamination of a *Zymomonas mobilis* Process for ethanol Production. *Journal of fermentation technology*, v. 63, n. 3, p. 287-290, 1985.

GUNASEKARAN, P. et al. Current status and prospects of an ethanol producer, *Zymomonas mobilis*. *Indian journal of microbiology*. New Delhi, v. 30, n. 2, p. 107-133, 1990.

HAHNHAGERDAL B, HALLBORN J, JEPSSON H, OLSSON L, SKOOG K, WALFRIDSSON M. In: Saddler JN (ed) *Bioconversion of forest and agricultural plant residues*. CAB International, Wallingford, UK, p. 23, 1993.

HAHNHAGERDAL, B. et al. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 74, n. 5, p. 937-953, 2007.

HAMER, Lisbeth et al. Recent advances in large-scale transposon mutagenesis. *Current opinion in chemical biology*, v. 5, n. 1, p. 67-73, 2001.

HE, M. et al. *Zymomonas mobilis*: a novel platform for future biorefineries. *Biotechnology for Biofuels*, v. 7, n. 1, p. 101, 2014

JANG Y-S, PARK JM, CHOI S, CHOI YJ, SEUNG DY, CHO JH, LEE SY. Engineering of microorganisms for the production of biofuels and perspectives based on systems metabolic engineering approaches. *Biotechnology Advances*.; v. 30, p. 989–1000, 2012.

JEFFRIES, Thomas W. Ethanol fermentation on the move. ***Nature biotechnology***, v. 23, n. 1, p. 40-41, 2005.

JEON, Y. J.; XUN, Z.; ROGERS, P. L. Comparative evaluations of cellulosic raw materials for second generation bioethanol production. *Letters in applied microbiology*, v. 51, n. 5, p. 518-524, 2010.

KOUEVELIS, Vassili N. et al. Genome sequence of the ethanol-producing *Zymomonas mobilis* subsp. pomaceae lectotype strain ATCC 29192. *Journal of bacteriology*, v. 193, n. 18, p. 5049-5050, 2011.

KOUEVELIS, Vassili N. et al. Complete genome sequence of the ethanol producer *Zymomonas mobilis* NCIMB 11163. *Journal of bacteriology*, v. 191, n. 22, p. 7140-7141, 2009.

KOUEVELIS, Vassili N. et al. Finished genome of *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* strain CP4, an applied ethanol producer. *Genome announcements*, v. 2, n. 1, p. e00845-13, 2014.

LAU, Ming W. et al. Comparing the fermentation performance of *Escherichia coli* KO11, *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH-ST) and *Zymomonas mobilis* AX101 for cellulosic ethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, v. 3, n. 1, p. 1, 2010.

LAWFORD, Hugh G.; ROUSSEAU, Joyce D. The pH-dependent energetic uncoupling of *Zymomonas* by acetic acid. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 45, n. 1, p. 437-448, 1994.

LEE JW, NA D, PARK JM, LEE J, CHOI S, LEE SY. Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals. *Nature Chemical Biology* v. 8, p. 536–546, 2012.

LEE, K. J. et al. High productivity ethanol fermentations with *Zymomonas mobilis* using continuous cell recycle. *Biotechnology Letters*, v. 2, n. 11, p. 487-492, 1980.

LEE, J. H.; SKOTNICKI, M. L.; ROGERS, P. L. Kinetic studies on a flocculent strain of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*, v. 4, n. 9, p. 615-620, 1982.

LEE, K. J.; ROGERS, P. L. The fermentation kinetics of ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *The Chemical Engineering Journal*, v. 27, n. 2, p. B31-B38, 1983.

LYND, Lee R. et al. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current opinion in biotechnology*, v. 16, n. 5, p. 577-583, 2005.

MADIGAN M. T., MARTINKO J. M., BENDER K. S., BUCKLEY D. H., STAHL D.A. *Microbiologia de Brock*. 14ª edição, Artmed, Porto Alegre, 2016.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Brock Microbiology of microorganisms*. New Jersey (USA), p. 470-702, 2000.

Maury J, Asadollahi MA, Moller K, Clark A, Nielsen J. Microbial isoprenoid production: an example of green chemistry through metabolic engineering. *Advanced Biochemical Engineering/Biotechnology*. v. 100, p. 19-51, 2005.

MEADE, G. P. et al. *Cane sugar handbook*. **Cane sugar handbook**., 1977.

MOHAGHEGHI, Ali et al. Cofermentation of glucose, xylose, and arabinose by mixed cultures of two genetically engineered *Zymomonas mobilis* strains. In: *Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Humana Press, p. 285-299, 1998.

MOHAGHEGHI, Ali et al. Cofermentation of Glucose, Xylose, and Arabinose by Genomic DNA-Integrated Xylose/Arabinose Fermenting Strain of *Zymomonas mobilis* AX101. In: *Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Humana Press, 2002. p. 885-898.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. In: *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. Artmed, 2011.

NISSEN, Torben L. et al. Anaerobic and aerobic batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* mutants impaired in glycerol synthesis. *Yeast*, v. 16, n. 5, p. 463-474, 2000.

NOVACANA. Futuro brilhante do etanol celulósico está ameaçado. Disponível em: <https://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/futuro-brilhante-etanol-celulosico-ameacado-010316/>. Acesso em: 10 de maio de 2016.

NOVACANA. Proálcool ainda busca espaço no setor energético brasileiro. Disponível em: <https://www.novacana.com/n/etanol/politica/proalcool-busca-espaco-setor-energetico-brasileiro-161115/>. Acesso em: 12 de maio de 2016.

NOVACANA. Sobre o etanol. Disponível em: <https://www.novacana.com/etanol/sobre/#maiores-produtores>. Acesso em: 26 de abril de 2016.

NREL. Science Central to Success of New Biofuels Projects: DuPont-NREL Partnership Delivered Key Innovations for Large Scale Cellulosic Ethanol Facility in Iowa. NREL (National Renewable Energy Laboratory). Disponível em: <http://www.nrel.gov/news/features/2015/16468>. Acesso em: 03 de maio de 2016.

OLIVEIRA, S. D. Mapeamento tecnológico da produção do bio-ácido succínico no cenário brasileiro. UFRJ, INPI. GEINTEC, v. 3, n. 5, 2013. Disponível em: <http://www.revistageintec.net/portal/index.php/revista/article/view/290>. Acessado em: 09 de maio de 2016.

OTERO J. M., PANAGIOTOU G., OLSSON L. Fueling Industrial Biotechnology Growth with Bioethanol. *Advanced Biochemical Engineering/Biotechnology*. v. 108, p. 1-40, 2007.

PAPPAS KM, GALANI I, TYPAS MA. Transposon mutagenesis and strain construction in *Zymomonas mobilis*. *J Appl Microbiol*. v. 82, p. 379-88, 1997.

PAPPAS KM, GALANI I, TYPAS MA. Transposon mutagenesis and strain construction in *Zymomonas mobilis*. *J Appl Microbiol*. v. 82, p. 379-88, 1997.

PANDEY, A. (Ed.). Handbook of plant-based biofuels. CRC Press, 2008.

PANESAR, P. S. MARWAHA, S. S. KENNEDY, J. F. *Zymomonas mobilis*: an alternative ethanol producer. *Journal of chemical technology and biotechnology*, v. 81, n. 4, p. 623-635, 2006.

PERALTA-YAHYA PP, ZHANG F, DEL CARDAYRE SB, KEASLING JD. Microbial engineering for the production of advanced biofuels. *Nature*. v. 488, n. 7411, p. 320–328, 2012.

PAREKH, S. R.; PAREKH, R. S.; WAYMAN, M. Ethanol fermentation of wood-derived cellulose hydrolysates by *Zymomonas mobilis* in a continuous dynamic immobilised biocatalyst bioreactor. **Process biochemistry**, v. 24, n. 3, p. 88-91, 1989.

PORTNOY, Vasiliy A.; BEZDAN, Daniela; ZENGLER, Karsten. Adaptive laboratory evolution—harnessing the power of biology for metabolic engineering. *Current opinion in biotechnology*, v. 22, n. 4, p. 590-594, 2011.

RANZAN, Cassiano. Fermentação contínua de *Zymomonas mobilis*: modelagem, ajuste de parâmetros e inferências a partir do consumo de hidróxido de sódio. UFRGS. 2010.

REARRANJO GÊNICO, PRODABI – ICB, UFMG. Disponível em: <http://labs.icb.ufmg.br/lbcd/prodabi3/grupos/grupo2/program/rearranjo10.html>, acessado em: 07 de maio de 2016.

RHEE, S. K. et al. Ethanol production from desalted molasses using *Saccharomyces uvarum* and *Zymomonas mobilis*. **Journal of fermentation technology**, v. 62, n. 3, p. 297-300, 1984.

ROGERS PL, JEON YJ, LEE KJ, LAWFORDE HG. *Zymomonas mobilis* for fuel ethanol and higher value products. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. v.108, p. 263–288, 2007.

ROGERS, P. L.; LEE, K. J.; TRIBE, D. E. High productivity ethanol fermentations with *Zymomonas mobilis*. *Process biochemistry*, 1980.

ROGERS, P. L. et al. Recent developments in the *Zymomonas* process for ethanol production. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 1, n. 3, p. 273-288, 1983.

ROGERS, P. L.; LEE, K. J.; TRIBE, D. E. Kinetics of alcohol production by *Zymomonas mobilis* at high sugar concentrations. *Biotechnology Letters*, v. 1, n. 4, p. 165-170, 1979.

ROWLANDS, R. T. Industrial strain improvement: mutagenesis and random screening procedures. **Enzyme and microbial technology**, v. 6, n. 1, p. 3-10, 1984.

SCOPES, R. K. et al. Simultaneous purification and characterization of glucokinase, fructokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. *Biochemical Journal*, v. 228, n. 3, p. 627-634, 1985.

SEO, J. S. et al. Method for mass production of primary metabolites, strain for mass production of primary metabolites, and method for preparation thereof. U.S. Patent Application n. 12/279,692, 2007.

SEO, J.S. et al. The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. *Nature Biotechnology*. v. 23, p. 63-68, 2005. Disponível em: <http://www.nature.com/nbt/journal/v23/n1/full/nbt1045.html>. Acessado em: 03 de maio de 2016.

SETOR ENERGÉTICO. DuPont e a maior fábrica de etanol celulósico do mundo nos EUA. Disponível em: <http://www.setorenergetico.com.br/biocombustiveis/dupont-e-a-maior-fabrica-de-etanol-celulosico-do-mundo-nos-eua/10088/>. Acesso em: 26 de abril de 2016.

SHLESER, R. Ethanol Production in Hawaii. State of Hawaii, Energy Division, Department of Business, Economic Development and Tourism, Honolulu, 1994.

SKOTNICKI, M. L. et al. Comparison of ethanol production by different *Zymomonas* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 41, n. 4, p. 889-893, 1981.

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.

TAO, F. et al. Ethanol fermentation by an acid-tolerant *Zymomonas mobilis* under non-sterilized condition. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 1, p. 183-187, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, A. L. *Microbiologia*. 8ª edição, 1ª reimpressão, Artmed, Porto Alegre, 2006.

UNICA. Quatro usinas inauguram era do etanol celulósico em escala comercial nos eua. Disponível em: <http://www.unica.com.br/na-midia/17629673920340056365/quatro-usinas-inauguram-era-do-etanol-celulosico-em-escala-comercial-nos-eua/>. Acesso em: 10 de maio de 2016.

VAN MARIS, ANTONIUS JA et al. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 90, n. 4, p. 391-418, 2006.

VIIKARI, L. By-product formation in ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*. VTT, 1986.

VIIKARI L. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas*. Crit. Rev. Biotechnol. v. 7, p. 237–261, 1988.

WANG, C. et al. Unmarked insertional inactivation in the *gfo* gene improves growth and ethanol production by *Zymomonas mobilis* ZM4 in sucrose without formation of sorbitol as a by-product, but yields opposite effects in high glucose. Biochemical Engineering Journal, v. 72, p. 61-69, 2013.

WANG Y. Development of acetic-acid tolerant *Zymomonas mobilis* strains through adaptation. Master Thesis: Georgia Institute of Technology, Chemical Engineering. 2008.

WYMAN, C. Handbook on bioethanol: production and utilization. CRC press, 1996.

YOU, K. M.; ROSENFELD, C. L.; KNIPPLE, D. C. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. Applied and Environmental microbiology, v. 69, n. 3, p. 1499-1503, 2003.

ZACHARIAH, G.G.; DHANASEKARAN, N. The Microrevolution: Applications and Impacts of Microarray Technology on Molecular Biology and Medicine. International Journal of Molecular Medicine, v.13, p. 483-495. 2004.

ZHANG, Min et al. Single *Zymomonas mobilis* strain for xylose and arabinose fermentation. U.S. Patent n. 5,843,760, 1 dez. 1998.

ZHAO, Ning et al. Draft genome sequence of the flocculating *Zymomonas mobilis* strain ZM401 (ATCC 31822). Journal of bacteriology, v. 194, n. 24, p. 7008-7009, 2012.