



FERMENTAÇÃO ACELERADA

Novas cepas de leveduras são mais eficientes na conversão da sacarose em etanol

DINORAH ERENO

Na busca por microrganismos mais eficientes para a produção de etanol, dois grupos de pesquisadores brasileiros desenvolveram, por métodos distintos, duas novas cepas de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* capazes de produzir maiores quantidades da substância.

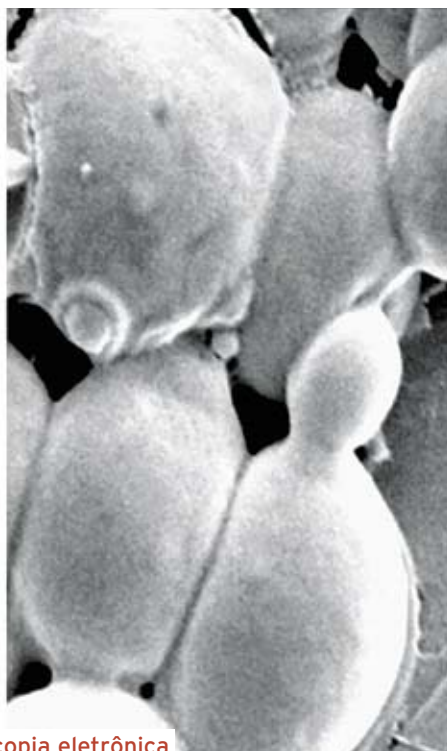
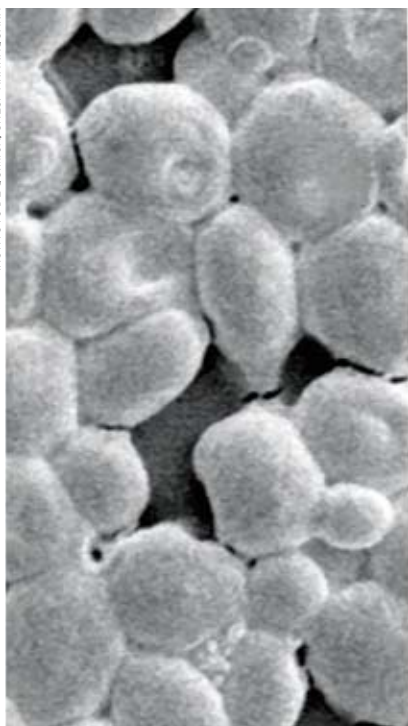
Pequenos fungos microscópicos, as leveduras exercem um papel fundamental na transformação do açúcar em álcool durante o processo de fermentação nas usinas. O grupo liderado pelo professor Boris Ugarte Stambuk, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), recorreu à engenharia genômica, enquanto os pesquisadores coordenados pela professora Cecília Laluce, da Universidade Estadual Paulista (Unesp) de Araraquara, no interior paulista, utilizaram a genética clássica para

obter um híbrido a partir de leveduras selecionadas. “Fizemos uma intervenção no genoma da *Saccharomyces* para modificar a forma como ela atua no fermentador e, com isso, conseguimos otimizar o processo”, diz Stambuk, do Departamento de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas da UFSC, que também coordena na instituição um grupo de pesquisa, criado em 1997, para estudos sobre a biologia molecular e a biotecnologia de leveduras. “Com a mesma quantidade de sacarose conseguimos obter de 10% a 15% a mais de etanol.”

A estratégia consistiu em modificar a forma como a *Saccharomyces* produz a enzima invertase, responsável por acelerar o processo de hidrólise (quebra) dos carboidratos da sacarose, transformando-os em glicose e frutose. Essa reação, que acontece do lado de fora da célula da levedura, é chamada de hidrólise extracelular. Com a alteração da invertase por meio da modificação do gene específico para essa enzima, o açúcar passou a ser transportado e fermentado diretamente no interior da *Saccharomyces*. “A hidrólise extracelular é um sistema que considero ineficiente porque favorece o desenvolvimento de outras leveduras e bactérias presentes nas dornas de fermentação, que passam a se utilizar da glicose e da frutose”, diz Stambuk, que também é orientador credenciado no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de São Paulo (USP). Quando fermentam, esses microrganismos contaminantes do processo produzem ácidos orgânicos que resultam em perdas na produção de etanol.



Formação de colônias de leveduras da espécie *Saccharomyces*



Células da levedura vistas com microscopia eletrônica

A próxima etapa da pesquisa, que teve a participação de pesquisadores do Instituto de Química e da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz de Piracicaba, ambos da USP, será testar a levedura geneticamente modificada na Usina Cerradinho, em Catanduva, no interior paulista, para avaliar como ela se comporta em um ambiente industrial. O estudo teve apoio financeiro da FAPESP, por meio de um Projeto Temático coordenado pelo professor Pedro Soares de Araújo, do Instituto de Química da USP, e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que aprovou uma proposta apresentada por Stambuk em parceria com a Fermentec, empresa de consultoria especializada em fermentação alcoólica, em um edital de Desenvolvimento Tecnológico e Inovação.

Stambuk conta que o seu interesse por uma via de captação direta do açúcar pela levedura começou em 1997. Alguns estudos que apontavam essa possibilidade já tinham sido feitos na década de 1980 por pesquisadores espanhóis e australianos, mas não avançaram. Antes de iniciar o projeto que resultou na levedura geneticamente modificada, o pesquisador havia orientado dois alunos de mestrado que caracterizaram o

gene responsável pela captação direta do açúcar. “Na literatura já havia sido descrito que isso era possível com a fermentação da maltose, outro açúcar que a *Saccharomyces* fermenta eficientemente”, diz Stambuk. “A levedura joga a maltose para dentro da célula e fermenta o açúcar do lado de dentro.”

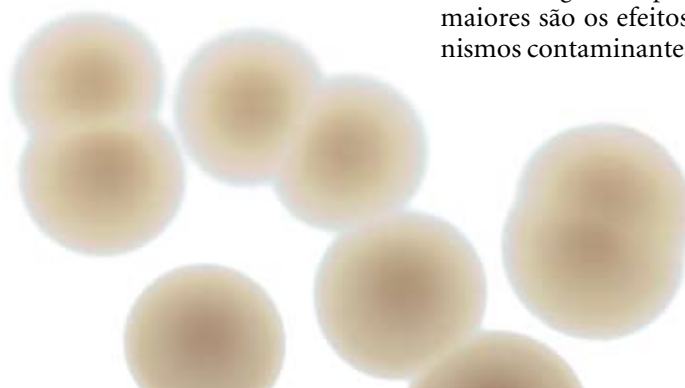
Desde o início do projeto da levedura geneticamente modificada em 2005, foram testadas várias estratégias para que ela parasse de produzir a invertase extracelular e passasse a transportar o açúcar para o interior da célula, onde é feita a hidrólise da sacarose. Uma delas foi muito bem-sucedida e resultou em um depósito de patente em abril deste ano, em parceria com a Fermentec. Várias dissertações de mestrado e teses de doutorado em andamento, orientadas por Stambuk e apresentadas na UFSC e na USP, também são fruto desse projeto. A professora Ana Clara Guerrini

Schenberg, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP e que desde a década de 1970 faz pesquisas com leveduras, ressaltou que a estratégia desenvolvida é inovadora. “É um jeito novo de a levedura fazer álcool”, disse Ana Clara, que participou da banca de avaliação de um dos alunos de Stambuk.

O pesquisador, que tem vários projetos na área, inclusive no sequenciamento do genoma de leveduras industriais, explica que as modificações genéticas se tornam estáveis dentro da levedura porque foram feitas nos próprios cromossomos. “Muitas modificações são feitas com plasmídeos para leveduras, material genético também encontrado em bactérias, mas no mundo industrial isso não funciona, porque essas moléculas são instáveis.”

Resistência ao calor - A outra cepa de levedura que também mostrou em testes de laboratório ser uma excelente produtora de álcool tem outra característica que a torna especial para as condições enfrentadas nos processos industriais. Ela é resistente a altas temperaturas. “Enquanto as leveduras comerciais para produção de etanol fermentam bem entre 30°C e 34°C, a levedura que desenvolvemos fermenta entre 37°C e 38°C com pouca mortalidade celular”, diz Cecília. Como é muito difícil controlar a temperatura no verão no processo de fermentação, quando há uma elevação acima de 36°C imediatamente aumenta a toxidez do álcool nas dornas, resultando na morte de leveduras produtoras de etanol.

Outra inovação dessa nova cepa, que teve um depósito de patente feito pela Agência Unesp de Inovação em setembro de 2008, é que ela fermenta rapidamente. “Ela faz a conversão total do açúcar em até três horas, enquanto pelo processo tradicional a fermentação leva de seis a 12 horas”, diz a pesquisadora, que desde a década de 1980 se dedica a estudar fermentos. Isso representa uma vantagem porque, quanto mais longo o tempo de fermentação, maiores são os efeitos dos microrganismos contaminantes e de outros fa-



OS PROJETOS

1. *Estresse, transporte e metabolismo de alfa-glicosídeos em Saccharomyces cerevisiae*
2. *Otimização da fermentação de sacarose e produção de álcool por Saccharomyces cerevisiae*
3. *Aspectos básicos e aplicados da utilização industrial de leveduras*

MODALIDADES

1. Projeto Temático
2. Desenvolvimento Tecnológico e Inovação
3. Auxílio Regular a Projeto de Pesquisa

COORDENADORES

1. PEDRO SOARES DE ARAÚJO - USP
2. BORIS UGARTE STAMBUK - UFSC
3. CECÍLIA LALUCE - Unesp

INVESTIMENTO

1. R\$ 482.204,54 (FAPESP)
2. R\$ 173.005,92 (CNPq)
3. R\$ 118.245,46 (FAPESP)

tores agressivos, como temperatura elevada e deficiência nutricional, do processo sobre o fermento. A nova cepa também resiste a quantias elevadas de etanol e à acidez em ciclos sucessivos de fermentação.

Para chegar a essa levedura, foram selecionadas várias linhagens de *S. cerevisiae* encontradas em usinas que apresentavam características como tolerância ao calor e rápido consumo de açúcar para produção de etanol. Depois de vários testes e combinações, foi obtida uma levedura híbrida, que recebeu marcadores genéticos que permitem o seu monitoramento durante todo o processo de fermentação alcoólica. “Com os marcadores é possível saber a proporção dessa levedura em relação aos microrganismos contaminantes presentes nas dornas de fermentação”, diz Cecília. Além disso, é possível observar se as células do fermento estão passando por alterações durante a safra, se a levedura é dominada pelas leveduras selvagens e até mesmo se ela desaparece do processo vencida pelas concorrentes. Atualmente essa diferenciação é feita apenas por técnicas de biologia molecular que necessitam de consultores especializados.

“Na usina, a mesma levedura é usada em vários ciclos de fermentação durante a safra inteira, que dura até sete meses”, diz a pesquisadora Karen de Oliveira, que trabalhou com a levedura híbrida durante o seu doutorado, orientado por Cecília e encerrado em 2008. “Em alguns casos, são usadas três espécies diferentes de *Saccharomyces* no início da safra em usinas e depois de um mês não existe mais nenhuma”, relata. As leveduras que estão no ambiente ou na própria matéria-prima invadem o processo de produção de etanol e começam a se multiplicar. “Mas as leveduras presentes no ambiente precisam apenas se alimentar, e não produzir álcool”, diz Karen, que atualmente pesquisa o comportamento de leveduras durante a fermentação de hidrolisados do bagaço de cana no seu pós-doutorado. O projeto, coordenado pela professora Cecília Laluze e que tem ainda a participação dos pesquisadores Sandra Sponchiado e Eduardo Cilli, faz parte do Programa FAPESP de Pesquisa em Bioenergia (Bioen).

“Controlar a estabilidade das leveduras ao longo da safra é essencial para garantir a continuidade dos ciclos sucessivos de fermentação”, diz Cecília. Isso porque, quando o fermento começa a ficar intoxicado pelo excesso de álcool produzido ou em decorrência das condições de estresse da fermentação, ele morre, o que pode levar ao reinício de todo o processo. “O colapso de um processo, com parada completa e reinício, significa grandes prejuízos para as usinas”, ressalta. A próxima etapa do projeto, que já está sendo negociada com o Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), é testar a levedura híbrida em um processo industrial. ■

> Artigos científicos

1. BATISTA, A.S. *et al.* Sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* lacking hexose transport. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**. v. 8, p. 26-33. 2004.
2. BADOTTI, F. *et al.* Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**. v. 7. 2008.

Mutação induzida

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* conta com mecanismos para suportar estresses, como mostram estudos conduzidos em laboratório pela professora Sandra Regina Ceccato Antonini, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), campus de Araras. Alguns fatores, como a deficiência de nutrientes e a presença de alguns tipos de alcoóis produzidos com o etanol na fermentação, levam a uma mudança na sua morfologia - de unicelular ela passa a filamentososa, ou seja, formada por uma cadeia de células, muitas delas extremamente alongadas e “deformadas” -, que pode compensar a perda da eficiência produtiva provocada pelo estresse. “Para a levedura significa uma forma de escapar de um ambiente desfavorável”, diz Sandra.

A pesquisadora tem estudado esse efeito no processo de fermentação alcoólica, porque dentro das dornas de fermentação a levedura vive sob um estresse muito grande. Embora os dados ainda não sejam conclusivos, a pesquisadora ressalta que a filamentação indica uma vantagem adaptativa para a levedura, já que há um aumento da sua área superficial. “A levedura passa de uma célula para um filamento comprido”, diz Sandra, que desenvolveu a pesquisa com apoio da FAPESP por meio de um auxílio regular, iniciado em 2005 e encerrado em 2008. Como a área celular aumenta, pode haver um maior contato com o meio de cultura, levando a uma compensação devido à morte de células ocasionada pelo estresse.

“Numa situação em que a levedura está estressada e não passa para a forma filamentososa, o prejuízo do estresse pode ser maior”, diz a pesquisadora. Ela ressalta que, mesmo sob condições estressantes, algumas linhagens de *Saccharomyces* não mudam de morfologia. A explicação é que a essa mudança pode ser uma característica genética, mas ainda não se conhece um gene específico relacionado à filamentação. “Existem vários genes que podem estar envolvidos nesse processo.” Na avaliação da pesquisadora, o fato de essa característica estar presente em leveduras industriais significa que alguma função ela deve ter, porque aparece por uma pressão seletiva. “A princípio achei que era uma característica ruim, mas depois comecei a perceber a sua importância.”