


MICROBIOLOGIA

As artesãs do etanol

Descobertas sobre genética de leveduras incentivam a pesquisa para ampliar a produtividade de álcool

CARLOS FIORAVANTI | FOTOS EDUARDO CESAR

de Nova Europa



Em menos de cinco minutos, as correntes de um guindaste inclinam uma carreta e despejam 30 toneladas de cana em uma esteira no início da linha de produção de açúcar e álcool da Usina Santa Fé, em Nova Europa, região central do estado de São Paulo. A carreta sai e um trator traz outra e depois outra, dia e noite, sem parar. A cana segue pela esteira, passa por máquinas que a trituram e extraem o caldo verde que se transforma em açúcar após purificação e evaporação. Mais adiante, nas dornas de fermentação – tanques de 25 metros de altura –, começa a transformação de açúcar em etanol, que depende de linhagens específicas de um tipo de fungo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o mesmo microrganismo unicelular usado para fazer pão, cerveja e vinho.

“Até pouco tempo atrás, não sabíamos o que acontecia lá dentro”, conta Cláudio Câmara, gerente de processos da usina, apontando para os tanques. “Só sabíamos que a fermentação terminava bem.” Depois de usar várias linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* adequadas a menores volumes de produção, a Santa Fé adotou uma combinação de quatro variedades de leveduras para dar conta da produção de 1 milhão de litros de álcool por dia, que enchem 30 caminhões. “Foi o melhor que conseguimos”, diz. Ele gostaria de usar menos variedades de levedura ou menos levedura – a fermentação começa com 600 quilos de leveduras colocadas em um tanque com 80 mil litros de mosto, o açúcar diluído. “Mas, com esse volume de produção, não podemos correr riscos.” Antes reconhecidas apenas pela capacidade de transformar açúcar de cana em álcool combustível, essas linhagens de leveduras são agora um pouco mais conhecidas e respeitadas.

Dois estudos – um da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e outro da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) – examinam o conjunto de genes (genoma) das linhagens de leveduras usadas na produção de etanol e descrevem os mecanismos que permitem a elas produzir álcool com rapidez e eficiência. A partir dessas informações, os pesquisadores estão agora motivados para buscar – ou construir – variedades mais adaptadas às dornas de fermentação. “Talvez o desempenho das leveduras de uso industrial melhore se conseguirmos remover ou desativar alguns genes”, acredita Gonçalo Pereira, coordenador da equipe da Unicamp.

Um dos argumentos que alimentam essa possibilidade é que o rendimento da produção de álcool ainda está abaixo do máximo teórico. Hoje as leveduras produzem 0,46 grama de etanol para cada grama de açúcar, segundo Sílvio Andrietta, pesquisador da Unicamp. “O máximo teórico é de 0,51”, diz ele. “Chegamos a 90% do máximo teórico.” Se der certo, o impacto econômico pode ser grande. “Se a eficiência do processo aumentar 5%, já será um ganho extraordinário, em vista dos elevados volumes de produção”, diz o engenheiro químico Saul Gonçalves D’Ávila, professor emérito da Unicamp que acompanha uma das equipes. Este ano 350 usinas devem produzir 27,5 bilhões de litros de etanol.

Agora conhecido, o conjunto de genes próprio das leveduras que produzem etanol explica como essas variedades se tornaram robustas como um jipe, capazes de sobreviver ao calor intenso e

Hora do descanso: leveduras se recompõem em ácido sulfúrico diluído antes de voltarem para os tanques de fermentação



de vencer a competição com leveduras selvagens que vêm com a cana e com outros microrganismos, todos ávidos pelo açúcar abundante nos tanques. “O processo de produção de etanol no Brasil é bastante suscetível à contaminação por microrganismos, que reduzem a produtividade”, comenta Gustavo Goldman, professor da Universidade de São Paulo (USP), em Ribeirão Preto, especialista em genoma de fungos.

Genes de resistência - Esses trabalhos mostram que as linhagens produtoras de etanol acumularam características genéticas próprias, que as fazem bem diferentes da linhagem adotada como referência, a S288c. Mantida no conforto do laboratório, essa linhagem tem sido examinada e manipulada há mais de 10 anos: seu genoma foi o primeiro

de um microrganismo dotado de núcleo a ser sequenciado e apresentado em 1996 em um artigo científico. As variedades usadas para produzir vinho e cerveja também têm sido bastante estudadas, enquanto as que fazem etanol ganharam mais atenção nos últimos anos.

Em um trabalho publicado em 2008, uma equipe da USP liderada por Luiz Basso havia mostrado que as linhagens que começam a digerir os açúcares do caldo de cana geralmente não eram as que chegavam ao final: só as mais robustas sobreviviam às altas temperaturas e à concentração crescente de álcool e tendiam a dominar, enquanto as mais delicadas, uma delas usada para fazer pão, eram substituídas. Agora esses no-

Transformação: a queima de bagaço produz o vapor que move as máquinas que moem a cana e geram energia elétrica

vos estudos esclarecem como as primeiras conseguem sobreviver.

Em um dos trabalhos, publicado no mês passado na *Genome Research*, especialistas de três universidades paulistas (Unicamp, USP e Universidade Federal de São Carlos) e de duas dos Estados Unidos (Carolina do Norte e Duke) analisaram uma variedade bastante usada na produção de etanol, a Pedra 2, uma das adotadas na usina Santa Fé, e a compararam com a linhagem de referência S288c. Ambas têm 16 cromossomos e cerca de 6 mil genes, mas cada linhagem ganhou ou perdeu genes em relação à outra. Juan Lucas Argueso, pesquisador brasileiro atualmente na Duke que coordenou a



análise genética, conta que a Pedra 2 possui 16 genes que não são encontrados na linhagem de laboratório e devem favorecer a sobrevivência nos tanques de fermentação. Dois desses genes conferem resistência à toxicidade do etanol, cuja concentração aumenta com o avanço da fermentação. “Esses genes foram identificados há cerca de 10 anos em linhagens de leveduras usadas para produzir saquê, que sobrevivem em ambientes mais tóxicos, com uma concentração de etanol ainda maior”, diz Argueso. “Linhagens que não têm esses genes são mais sensíveis ao etanol e morrem mais facilmente.” Outros dois genes da Pedra 2 são novos, sem similaridade com qualquer outro já identificado, e os pesquisadores ainda não sabem que função poderiam ter.

A região central dos cromossomos das duas linhagens é estruturalmente idêntica. As regiões periféricas – ou subteloméricas – dos cromossomos da linhagem de uso industrial, porém, são diferentes e ricas em genes que conferem tolerância a estresses ambientais como a temperatura elevada e provavelmente ampliam a eficiência na produção de álcool. Nas pontas dos cromossomos está a maioria dos genes próprios dessa linhagem, muitas vezes repetidos. “As repetições de genes facilitam a troca de material genético entre os cromossomos, que podem se recombinar rapidamente a cada nova geração, criando formas bastante distintas”, diz Argueso. “Essa flexibilidade genômica provavelmente explica como essa e outras linhagens de uso industrial sobrevivem à competição com outros microrganismos.” De acordo com esse estudo, essa variedade produz 50% mais álcool e 30% mais rapidamente que a linhagem de laboratório. “A Pedra 2 faz o que pode, não o que os industriais gostariam”, diz Pereira.

“Começamos a ver o que é possível mudar no genoma das leveduras usadas na produção de etanol, em busca de linhagens mais produtivas”, comenta Boris Stambuk, professor da UFSC que coordenou o outro estudo, a ser publicado na *Genome Research*. Ele, Basso e uma equipe de Stanford, Estados Unidos, já haviam sequenciado o genoma de outra linhagem bastante usada, a CAT-1. Agora, com Stanford, Stambuk coordenou a análise do genoma das cinco principais leveduras adotadas na produção de etanol no Brasil. Segundo esse trabalho, as cepas – ou variedades – de uso industrial, quando comparadas com a S288c, têm mais cópias de genes que participam da síntese das vitaminas B1 (tiamina) e B6 (piridoxina). Essa peculiaridade facilita a transformação de açúcares em álcool, que pode matar microrganismos mais delicados. “Em ambientes ricos em açúcar como o da produção industrial de etanol”, diz Goldman, “essas cepas poderiam ter vantagem adaptativa sobre outras”.

Goldman confia na possibilidade de “construir cepas mais adaptadas, por engenharia genética ou cruzamentos”. As equipes da Unicamp e da UFSC já exploram alguns caminhos para aprimorar as leveduras que produzem o álcool brasileiro, mas sabem que não

> OS PROJETOS

1. *Rotas verdes para o propeno*
2. *Bioetanol: desenvolvimento de leveduras industriais brasileiras para fermentação eficiente dos açúcares presentes na biomassa*

MODALIDADE

1. Pesquisa em Parceria para Inovação Tecnológica (Pite)
2. Auxílio a Pesquisa (editais MCT)

COORDENADORES

1. GONÇALO AMARANTE GUIMARÃES PEREIRA - IB/Unicamp
2. BORIS UGARTE STAMBUK - UFSC

INVESTIMENTO

1. R\$ 3.805.396,60 (FAPESP)
1. R\$ 3.500.000,00 (Braskem)
2. R\$ 648.717,64 (CNPq)

será fácil nem rápido, nem os resultados estarão garantidos, por causa da própria robustez desses microrganismos. Uma das barreiras a serem superadas é a membrana externa das leveduras de uso industrial, que impede a entrada do etanol que lhe seria prejudicial e teria de ser vencida para induzir modificações nos genes. “Parte da resistência dessas linhagens às técnicas de transformação genética se deve justamente à capacidade de não permitir a entrada de coisas estranhas”, diz Stambuk.

Cautela - Mesmo que os pesquisadores consigam criar novas variedades de leveduras, sabem que não devem comemorar antes da hora: organismos modificados geneticamente que funcionem bem em laboratório podem ser um desastre em fermentadores maiores, como os das usinas. Pereira já se decepcionou uma vez. Em 2003 ele apresentou uma cepa de levedura geneticamente modificada que se depositava no fundo dos tanques de fermentação depois de produzir álcool. “No laboratório era lindo, funcionava como um relógio”, recorda. Poderia ser uma forma de simplificar a produção de etanol e de reduzir custos. Em equipamentos de maior porte, porém, as leveduras produziram menos que as linhagens usadas normalmente.

Destá vez Pereira se cercou de gente que acompanha o que sua equipe está



fazendo e vive alertando que os resultados obtidos em laboratório devem também ser viáveis do ponto de vista técnico, econômico e ambiental. “Pode ser que encontremos outras linhagens melhores estudando o genoma e entendendo o comportamento das leveduras”, diz Andrietta, engenheiro químico e coautor do artigo na *Genome Research* de outubro.

Esse trabalho das equipes de Pereira e de Andrietta integra um plano de produção de resinas plásticas a partir de etanol coordenado pela Braskem, uma das maiores petroquímicas do país, ligada ao grupo Odebrecht. Hoje esse projeto mobiliza uma equipe de três unidades da Unicamp que começou a se formar em 2007. Foi quando Antonio Queiroz, diretor de competitividade e inovação da Braskem, concluiu que a produção de polímeros verdes passaria por processos biotecnológicos ainda pouco conhecidos pelos pesquisadores da empresa. Em seguida procurou um de seus ex-professores de engenharia química, Saul D’Ávila, e começou a formar “um grupo de pessoas que confiam umas nas outras e têm prazer em trabalhar junto”, como ele diz. “Desde o

Resíduos por enquanto inevitáveis: a produção de açúcar e álcool ainda gera morros de bagaço como estes

início sabíamos que não poderíamos fazer tudo sozinhos e teríamos de nos associar.” Ao menos uma vez por mês Queiroz vai à Unicamp planejar os próximos passos com as equipes. A seu ver, o trabalho corre bem, mas em breve necessitará de outras alianças. “Não posso fazer tudo com a universidade. Sei até onde posso ir.”

Queiroz sabe também que uma fábrica de plásticos derivados de cana dificilmente surgirá em menos de 10 anos, mesmo se tudo correr bem. Em menos tempo outra empresa do grupo Odebrecht, a ETH Bioenergia, poderá se beneficiar de leveduras adaptadas a produzir mais etanol. Em fase de expansão, as cinco usinas da ETH devem dobrar a capacidade de moagem para 10 milhões de toneladas de cana na próxima safra. “No médio e no longo prazo, queremos usar a biomassa da cana para fazer produtos alternativos, como alcoóis especiais”, diz Luis Felli, vice-presidente de operações agroindustriais da empresa.

A equipe da UFSC também tem um pé na indústria. Stambuk começou a estudar leveduras industriais em 2004 com Henrique Amorim, ex-professor da USP em Piracicaba e proprietário

da empresa Fermentec. Eles reforçaram o time com uma usina paulista disposta a testar em equipamentos de maior porte as leveduras modificadas em laboratório. “Os resultados que Boris tem obtido com Henrique são consequência da pesquisa básica que continua a ser feita em nossos laboratórios”, diz Pedro Soares de Araujo, do Instituto de Química da USP, que integra o grupo e orientou Stambuk no doutorado. “O notável em nosso trabalho é exatamente isso: a pesquisa básica forneceu os elementos necessários para a pesquisa aplicada com gente que tem uma sólida formação científica.” Stambuk comenta: “Até 2012 saberemos se teremos sucesso ou não no ambiente industrial”. Quem lida diariamente com a produção de etanol, como Câmara, na Usina Santa Fé, aguarda ansiosamente. ■

► Artigos científicos

1. ARGUESO, J.L. *et al.* Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome Research**. out. 2009.
2. STAMBUK, B.U. *et al.* Industrial fuel ethanol yeasts contain adaptive copy number changes in genes involved in vitamin B1 and B6 biosynthesis. **Genome Research**. No prelo.