

CAPÍTULO 8

Aspectos fisiológicos e bioquímicos da fermentação etanólica nas destilarias brasileiras

Luiz Carlos Basso

Thalita Peixoto Basso

Thiago Olitta Basso

8.1 INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas globais e a volatilidade do preço do petróleo têm incentivado a redução da utilização de combustíveis fósseis, substituindo-os por fontes de energia renovável. A produção de etanol combustível a partir de matérias-primas agrícolas (bioetanol) já está estabelecida, tanto nos Estados Unidos como no Brasil, a partir de milho e cana-de-açúcar, respectivamente. O etanol é o biocombustível mais consumido no mundo e o Brasil é o primeiro país a introduzir esse combustível renovável em sua matriz energética. Uma gigantesca indústria surgiu no país dessa iniciativa inovadora e atualmente o Brasil detém o processo mais econômico para produção de bioetanol.

Muitos fatores contribuíram para a eficiência desse processo industrial, como: natureza da matéria-prima, cultivo e preparo, melhorias na engenharia do processo, melhorias na condução da fermentação etc. Neste capítulo, aspectos gerais do metabolismo da levedura, bem como do processo fermentativo industrial brasileiro de produção de etanol, serão exibidos; impactos das peculiaridades do processo sobre a fisiologia da levedura serão discutidos; fatores limitantes da produtividade serão mencionados; e recentes melhorias na fermentação serão apresentadas.

8.2 BREVE HISTÓRICO

A humanidade se utiliza da fermentação alcoólica desde a mais remota antiguidade: há mais de 4 mil anos os egípcios fabricavam o pão e produziam bebidas alcoólicas a partir de cereais e frutas. Entretanto, apenas mais recentemente se pôde relacionar a fermentação com a levedura, fungo amplamente distribuído na natureza e com capacidade de sobrevivência tanto em condições aeróbias como anaeróbias. Esse microrganismo foi notado pela primeira vez por Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723) com o auxílio de seu rudimentar microscópio, ao observar uma amostra de cerveja em fermentação.

Depois de formulada a estequiometria (proporção entre reagentes e produtos) da fermentação por Gay-Lussac (1815), Pasteur demonstrou a natureza microbiológica da fermentação alcoólica, qualificando-a como a manifestação da vida na ausência de ar (oxigênio). Em 1897 os irmãos Buchner obtiveram um extrato de levedura livre de células, com a capacidade de conduzir a fermentação alcoólica. Tal observação estimulou pesquisas que levaram à descoberta das enzimas, proteínas fabricadas pela célula viva que catalisam as reações responsáveis pela fermentação. Entre 1900 e 1940 as pesquisas culminaram na elucidação das reações enzimáticas responsáveis pela transformação química do açúcar em etanol e gás carbônico no interior da levedura, por meio das contribuições científicas de Neuberg, Meyerhof, Warburg, Wieland, Embden e Parnas (WALKER, 1998; AMORIM; LEÃO, 2005; VOET; VOET, 2013).

Em virtude das facilidades de sua manipulação em laboratório e da importância econômica dos processos biotecnológicos envolvendo a levedura, notadamente a espécie *Saccharomyces cerevisiae* (quer na panificação ou na produção de cerveja, vinho e outras bebidas alcoólicas, quer na produção de um biocombustível renovável), tal microrganismo pode ser considerado o eucarioto (célula com núcleo organizado e processos metabólicos compartimentalizados) cujo metabolismo é o mais conhecido (WALKER, 1998).

8.3 CANA-DE-AÇÚCAR: MATÉRIA-PRIMA ADEQUADA À PRODUÇÃO DE ETANOL

Tecnicamente o etanol pode ser obtido a partir de uma grande variedade de matérias-primas renováveis, as quais podem ser agrupadas nas seguintes categorias: 1) aquelas que contêm os açúcares diretamente fermentescíveis (cana-de-açúcar, beterraba açucareira, sorgo doce); 2) materiais amiláceos ou contendo fructanas (milho, batata, trigo, arroz, agave, tupinambur); e 3) biomassa lignocelulósica (bagaço e palha de cana-de-açúcar, palhada e sabugo de milho, resíduo das culturas de trigo, cavacos de madeira, gramíneas forrageiras, entre outras). Enquanto cana-de-açúcar, beterraba e sorgo doce fornecem açúcares prontamente disponíveis para a levedura (sacarose, glicose e frutose), as matérias-primas amiláceas ou lignocelulósicas exigem uma hidrólise prévia dos polissacarídeos em seus açúcares constituintes (na forma de mono-, di- e/ou tri-sacarídeos), aumentando sobremaneira os custos de produção do etanol. De uma forma geral, esses custos são afetados enormemente por: natureza da matéria-prima, região e tipos de processamento (Tabela 8.1).

Tabela 8.1 Custos de produção do etanol referentes a várias matérias-primas

Região/matéria-prima	US\$ L ⁻¹
Brasil/cana-de-açúcar	0,21
EUA/milho	0,28
Austrália/melaço	0,32
Canadá/milho	0,33
UE/cereais	0,45
UE/beterraba	0,60
EUA/beterraba	0,62
EUA/cana-de-açúcar	0,63
EUA/lignocelulose de milho (<i>corn stover</i>)	0,90
Brasil/lignocelulose de cana (bagaço)*	0,32

* Cenário para processo integrado de 1ª e 2ª geração, com uso de 50% da palha da cana e melhor aproveitamento do vapor.

Fonte: Dias et al. (2011).

Um grande desafio tecnológico deste milênio é a utilização dos resíduos lignocelulósicos, quer para a produção de etanol, quer para outros bioprodutos de maior valor agregado. Da mesma forma que o amido, os polissacarídeos da biomassa lignocelulósica (celulose e hemicelulose) não são processados pela levedura, exigindo um tratamento prévio para sua hidrólise, resultando nos monômeros (predominantemente glicose e xilose). Outra dificuldade a ser vencida é o fato de a levedura *S. cerevisiae* (a levedura preferida para a produção industrial de etanol) não ser metabolicamente capaz de fermentar as pentoses, bem como a xilose. Grande esforço vem sendo realizado para tornar economicamente viável o processo de obtenção do etanol de segunda geração, ou seja, aquele obtido da biomassa lignocelulósica, empregando-se tanto bactérias como leveduras (ALTERTHUM; INGRAM, 1989; HAHN-HAGERDAL et al., 2006).

A cana-de-açúcar, como uma espécie fotossintetizadora C-4, apresenta alta produtividade de biomassa (80-120 ton.ha⁻¹.ano⁻¹), permitindo uma produção de etanol de 8.000 L.ha⁻¹, superior aos 3.000 L.ha⁻¹ de milho. Tal fato se deve à maior quantidade de açúcares presente na cana (WHEALS et al., 1999). Porém, o milho tem a vantagem de apresentar conteúdos apreciáveis de proteína que são recuperados em produtos de alto valor agregado, como o *dry distilled grain* (DDG), utilizado na alimentação animal.

Bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio (*Acetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp., *Gluconacetobacter diazotrophicus*) foram isoladas

tanto de cana-de-açúcar como de milho. Em cana-de-açúcar se acredita que, no mínimo, cerca de 60% das necessidades de nitrogênio possam ser propiciadas endogenamente pelas bactérias endofíticas, quando essa cultura cresce em solos pobres no nutriente em questão. Como os fertilizantes nitrogenados não são somente os de maiores custos, mas também aqueles que requerem maior quantidade de energia fóssil para a sua produção, o cultivo da cana-de-açúcar apresenta benefícios econômicos e ambientais quando comparado com outras culturas. A tolerância à seca apresentada pela cana-de-açúcar também adiciona atributos agrícolas desejáveis, e condições de clima e solo permitem que o Brasil seja o maior produtor dessa cultura (cerca de 600 Mton/safra).

A cana-de-açúcar contém 12-17% (m/m) de açúcares totais (sendo 90% como sacarose e 10% na forma de glicose e frutose) em base de massa úmida (68-72% de umidade). A eficiência industrial de extração do açúcar, por meio de moendas ou difusores, está em torno de 95-97%. O resíduo sólido dessa extração é o bagaço, gerado na proporção de 20-30% (com 50% de umidade) da cana processada (também na base úmida). O bagaço é responsável por tornar o processo de produção de etanol de cana-de-açúcar o de melhor balanço energético, pois permite a geração de energia térmica e elétrica durante o processo. Enquanto o balanço energético (relação entre a energia obtida do etanol e aquela empregada na sua produção) é estimado em 2,3:1 ou mesmo 2,8:1 na produção de etanol de milho (SHAPOURI et al., 2008), esse parâmetro é de 10:1 no caso do etanol de cana-de-açúcar (LEITE, 2005). Isso porque o bagaço é queimado em caldeiras, gerando vapor para as etapas de moagem da cana, aquecimento do caldo e destilação do etanol. Colabora também para a cogeração elétrica, tornando uma destilaria brasileira não apenas autossuficiente em termos energéticos, como uma exportadora de energia.

8.4 ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DA LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

8.4.1 O METABOLISMO DOS CARBOIDRATOS

A levedura, como entidade viva independente, realiza a fermentação do açúcar com o objetivo de conseguir a energia química necessária à sua sobrevivência (crescimento e perpetuação da espécie, objetivos de qualquer espécie viva). A célula de levedura possui compartimentações para adequação de sua atividade metabólica, sendo que a fermentação alcoólica (glicólise anaeróbica) ocorre no citoplasma, enquanto a oxidação biológica completa do açúcar (respiração) se dá nas mitocôndrias e apenas em condições de aerobiose (WALKER, 1998; GANCEDO; SERRANO, 1989) (Figura 8.1).

O objetivo primordial da levedura é gerar o máximo possível de biomassa (células de levedura), qualquer que seja a condição na qual se encontra. Para tal, deve ser gerada energia química na forma de ATP (adenosina trifosfato, a moeda corrente nas transações energéticas na célula viva), necessária para a realização de trabalhos fisiológicos (absorção, excreção e outros), biossíntese de macromoléculas (para a estruturação da biomassa resultando no crescimento/propagação) e ainda produção de energia para a manutenção das células.

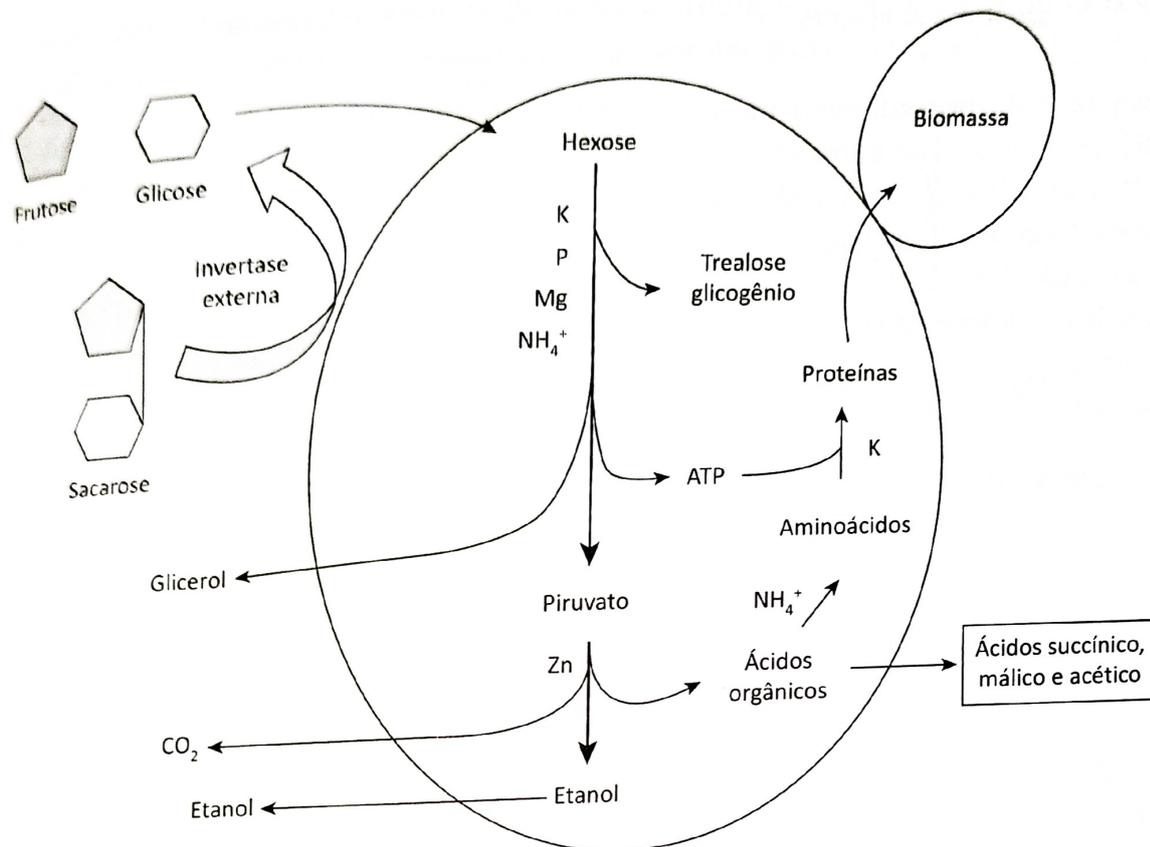


Figura 8.1 Esquema da conversão dos açúcares da cana (sacarose, glicose e frutose) em etanol pela via glicolítica e demais produtos secundários (biomassa, glicerol e ácidos orgânicos).

A fermentação alcoólica tem por primeiro objetivo gerar essa energia (ATP) e alguns metabólitos essenciais (precursores) à formação de novas células. O etanol, nosso principal foco, não tem nenhuma utilidade metabólica para a levedura, sendo por isso excretado (GANCEDO; SERRANO, 1989). A escolha do etanol como produto de excreção durante a evolução do metabolismo deu à levedura uma maior competitividade ante outros microrganismos, pois o etanol exerce um efeito antimicrobiano e ainda pode ser utilizado pela própria levedura, quando em condições de aerobiose. O mesmo se pode dizer sobre a formação de ácido lático pelas bactérias lácticas. Curiosa é a constatação de que esses dois microrganismos (leveduras e bactérias lácticas) compartilham nichos naturais (frutas e néctar de flores) e mesmo ambientes artificiais (os diversos tipos de fermentações ao longo da jornada humana até a atualidade). Essa convivência, nem sempre harmoniosa em nosso ponto de vista, é devida à tolerância da levedura ao ambiente ácido (causado pela presença do ácido lático e outros ácidos orgânicos) e de muitas bactérias lácticas ao etanol.

A transformação do açúcar (glicose) até resultar em etanol e CO_2 envolve 12 reações enzimáticas em sequência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica. Tais enzimas sofrem ações de diversos fatores (nutrientes minerais, vitaminas, inibidores, substâncias do próprio metabolismo, pH, temperatura etc.), sendo que alguns estimulam e outros reprimem a ação enzimática, afetando assim o desempenho do processo fermentativo (Figura 8.2).

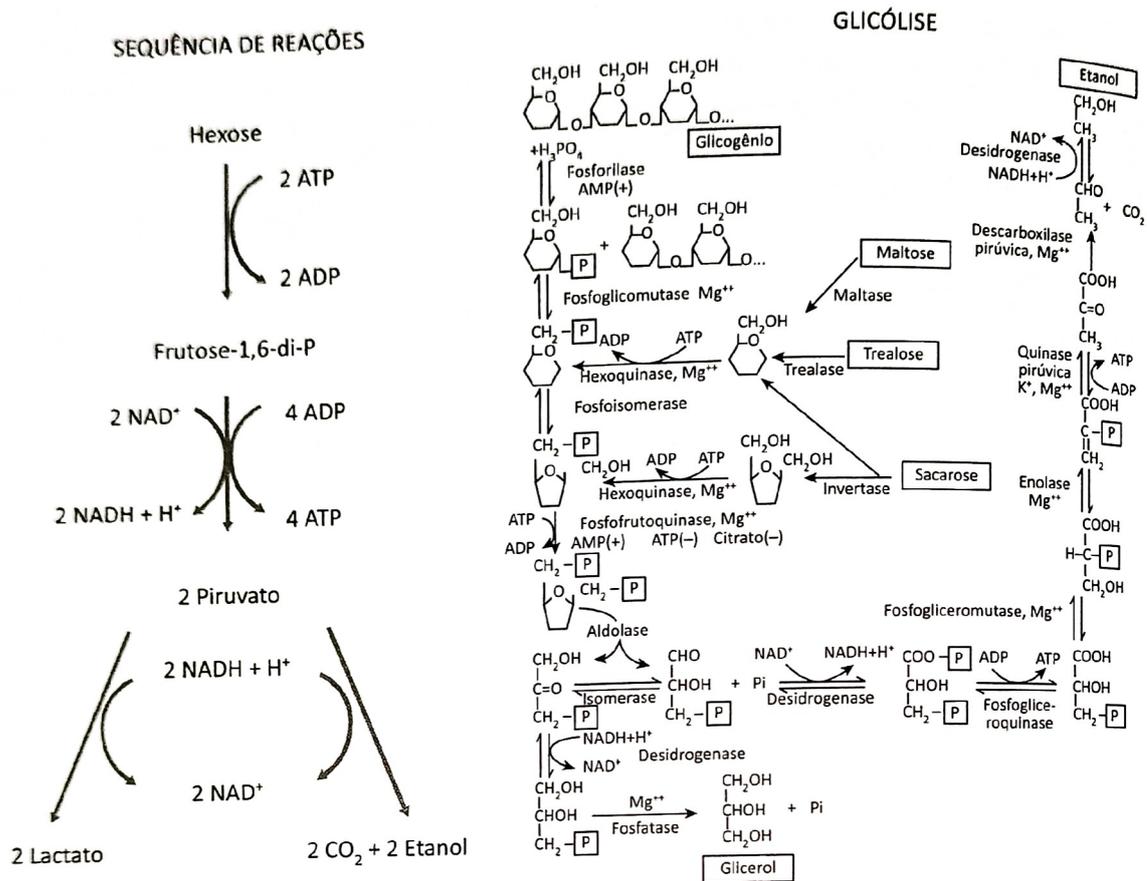


Figura 8.2 Esquema da sequência de reações das fermentações láctica (exceto a última reação: piruvato/lactato) e etanólica, conduzida por *Lactobacillus* e *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente. Detalhes das reações enzimáticas de glicólise anaeróbica ou fermentação a partir de vários açúcares.

Convém ressaltar que a levedura *S. cerevisiae* é um aeróbio facultativo, ou seja, tem a habilidade de se ajustar metabolicamente tanto em condições de aerobiose como de anaerobiose (ausência de oxigênio molecular). Os produtos finais da metabolização do açúcar dependerão das condições ambientais nas quais a levedura se encontra (WALKER, 1998).

Assim, em aerobiose, a metabolização de 100 g de açúcar permite uma produção de cerca de 50 g de biomassa seca de levedura em processo industrial (HARRISON, 1993). Isso é possível pelo fato de que parte do açúcar é totalmente oxidada (ciclo de Krebs e cadeia respiratória), propiciando 36 moles de ATP por mol de glicose oxidada (LEHNINGER, 1982; VOET; VOET, 2013).

No entanto, em virtude da baixa eficiência da fermentação alcoólica em converter a energia do substrato (açúcar) em ATP na condição de anaerobiose (apenas 2 moles de ATP são produzidos por mol de glicose metabolizada), a maior parte do açúcar (90%) deve ser transformada em etanol, contribuindo para uma elevada conservação da energia no processo (LEHNINGER, 1982). Dessa feita, a quantidade de ATP gerada é suficiente para a formação de, no máximo, 5 g de biomassa seca por 100 g de açúcar metabolizado. Esse baixo desvio de açúcar para a biomassa torna o processo anaeróbio

extremamente vantajoso quando se pretende a produção de etanol. Por outro lado, quando o objetivo é gerar biomassa, o processo aeróbio é mais adequado.

A razão pela qual a fermentação alcoólica ocorre em anaerobiose se deve ao perfeito balanço de oxirredução no transcorrer da glicólise. Assim, a formação de NADH pela desidrogenase de gliceraldeído-fosfato (6ª reação da glicólise na Figura 8.2) é compensada pela sua utilização na última reação com a formação do etanol (GAN-CEDO; SERRANO, 1989). Desse modo, a conversão de açúcar em etanol não necessita de nenhum acceptor de hidrogênios e elétrons, podendo ocorrer em anaerobiose (Figura 8.3). No entanto, como veremos a seguir, outros destinos do açúcar podem gerar excessos de NADH, exigindo, em anaerobiose, outros aceptores de H^+ que não o oxigênio molecular.

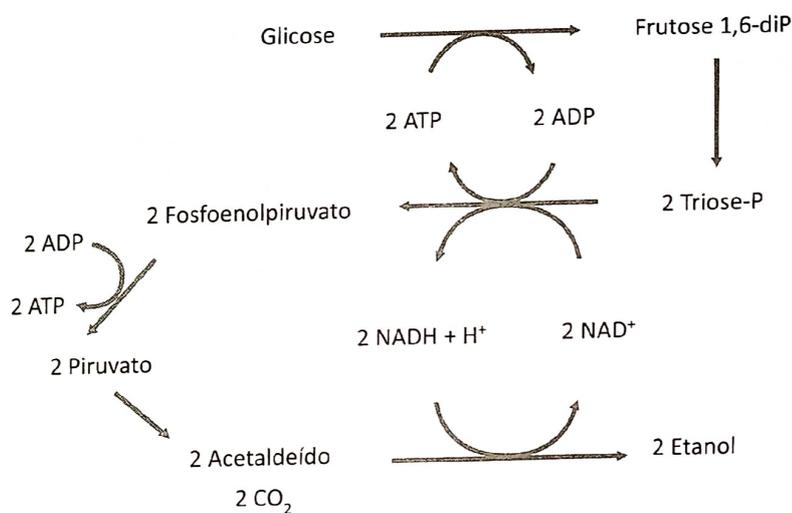


Figura 8.3 Equilíbrio de oxidorredução mantido durante a fermentação alcoólica e formação líquida (ao nível de triose) de 2 moles de ATP por mol de glicose.

Do ponto de vista termodinâmico, essa baixa eficiência em remover a energia química contida na molécula do açúcar em condições de anaerobiose (apenas 7% da energia do açúcar é posta em disponibilidade, gerando ATP e calor dissipado durante a fermentação) permite que 93% da energia química ainda se mantenha na molécula do etanol (LEHNINGER, 1982). Como a massa de etanol gerada corresponde a cerca de metade daquela do açúcar processado, a sua densidade energética é quase que duplicada (7,1 cal/g em comparação com 3,8 cal/g do açúcar), o que, associado à sua forma líquida e de fácil volatilização, torna o etanol um biocombustível automotivo.

8.4.2 PRODUTOS SECUNDÁRIOS DA FERMENTAÇÃO

Na sequência de reações enzimáticas de produção de ATP (via glicolítica) e intrínsecas à formação de etanol, rotas metabólicas alternativas aparecem para propiciar a formação de materiais necessários à constituição da biomassa (polissacarídeos,

lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e outros), bem como de outros produtos de interesse metabólico, relacionados direta ou indiretamente com adaptação e sobrevivência.

Dessa forma, junto com etanol e CO_2 , o metabolismo anaeróbio permite a formação e a excreção de glicerol, ácidos orgânicos (succínico, acético, pirúvico e outros), álcoois superiores, acetaldeído, acetoína, butilenoglicol, além de outros compostos de menor significado quantitativo. Simultaneamente ocorre o crescimento da levedura (formação de biomassa).

Afirmava Pasteur que cerca de 5% do açúcar seria desviado para a formação dos diversos produtos secundários e que um rendimento em etanol de 95% seria possível em condições adequadas de fermentação (com mostos sintéticos). Entretanto, em condições industriais, nas quais fatores desfavoráveis de natureza química, física e microbiológica atuam, o rendimento pode ser drasticamente reduzido. Mesmo assim, rendimentos industriais satisfatórios de 90-92% podem ser obtidos, implicando em desvios de cerca de 8-10% do açúcar metabolizado.

Levando-se em consideração as reações responsáveis e a estequiometria delas, pode-se calcular o equivalente em açúcar consumido para a formação de cada um dos produtos da fermentação, incluindo a biomassa, como se vê na Tabela 8.2. Dessa tabela se depreende que o rendimento da fermentação alcoólica pode ser aumentado mediante diminuição dos desvios de açúcar consumido na formação dos diversos produtos secundários, e tentativas de reduções nos teores de glicerol e ácidos orgânicos há muito já foram sugeridas (OURA, 1977). Detalhes fisiológicos desses expedientes serão discutidos mais adiante.

Tabela 8.2 Estequiometria da fermentação alcoólica, informando a contribuição de cada produto no consumo do açúcar metabolizado

Produtos da fermentação	% do ART consumido
Etanol + CO_2	85-92
Biomassa	2-5
Glicerol	3-6
Ácido succínico	0,3-1,2
Ácido acético	0,1-0,7
Álcoois superiores	0,2-0,6
Butilenoglicol	0,2-0,6

Fonte: Lima, Basso e Amorim (2001).

8.4.2.1 Biomassa

A produção de biomassa, convém repetir, é o objetivo primordial da levedura, cujo metabolismo está ajustado para maximizar não apenas a produção como também a manutenção da viabilidade celular. Como já dito, durante a fermentação alcoólica apenas uma pequena fração (7%) do conteúdo energético da glicose é posta em disponibilidade, permitindo a produção de apenas 2 moles de ATP por mol de glicose metabolizada. Tal quantidade limitada de ATP permite que, no máximo, 5% do açúcar metabolizado seja direcionado para biomassa, pois, do restante, 90% deve ser convertido em etanol e CO_2 (o processo glicolítico objetiva a produção de ATP pela chamada fosforilação ao nível de substrato). Considerar que 5% do açúcar será convertido em glicerol para restabelecer o balanço de redox devido à formação da biomassa.

A energética do crescimento ou o custo energético para a formação de biomassa (*growth energetics*) trata da relação entre a geração e o consumo de energia livre na forma de ATP, que estão ligados às reações que geram e consomem energia no metabolismo celular e culminam, em última estância, no crescimento celular (GANCEDO; SERRANO, 1989). De uma forma geral, o custo energético para a formação da biomassa (*ATP yield coefficient* – Y_{ATP}) é calculado em 71-91 milimoles de ATP exigidos para a produção de 1 g de biomassa seca, estimado em condições ótimas de laboratório, mas muito variável dependendo de outras condições de crescimento (Tabela 8.3). A acidificação externa e a presença de ácidos fracos no meio promovem um aumento na entrada de H^+ nas células (na forma dos ácidos fracos protonados), obrigando a enzima ATPase da membrana a expulsar esses prótons para o exterior da célula, evitando assim a acidificação do citoplasma celular que poderia levar à sua morte. No entanto, essa expulsão de prótons exige ATP, cujo consumo compete com a formação de biomassa, e é mencionada como uma das modalidades de *energia de manutenção* das células (STEPHANOPOULOS; ARISTIDOU; NIELSEN, 1998; VERDUYN et al., 1990). Assim pode-se assumir que o ATP gerado na dissimilação da fonte de carbono é consumido tanto para o crescimento celular como para funções celulares não relativas ao crescimento (como manutenção celular, ciclos fúteis etc.).

Tabela 8.3 Influência das condições fisiológicas sobre o custo energético da biomassa de *Saccharomyces cerevisiae*

Condições fisiológicas	Y_{ATP} (mmoles ATP/g MS)	Referência
Quimiostato, meio YEPD, pH = 5, taxa de diluição $0,1^{-h}$	91	Verduyn et al. (1990)
Quimiostato, meio YEPD, pH = 2,8, taxa de diluição $0,1^{-h}$	151	Verduyn et al. (1990)
Quimiostato, meio YEPD pH = 5, taxa de diluição $0,1^{-h}$, 0,18% ácido propiônico	238	Verduyn et al. (1990)

(continua)

Tabela 8.3 Influência das condições fisiológicas sobre o custo energético da biomassa de *Saccharomyces cerevisiae* (continuação)

Condições fisiológicas	Y_{KATP} (mmoles ATP/g MS)	Referência
Fermentação da glicose em batelada empregando-se amônia como fonte de nitrogênio	490*	Harrison (1993)
Propagação linhagem PE-2, meio de melaço para 5,6% (v/v) de etanol final	151*	Basso e Amorim (2002)
Propagação linhagem PE-2, meio de melaço para 6,1% (v/v) de etanol final	197*	Basso e Amorim (2002)
Propagação linhagem PE-2, meio de melaço para 6,6% (v/v) de etanol final	228*	Basso e Amorim (2002)
Fermentação de melaço linhagem PE-2, reciclo de células com tratamento ácido (pH = 2,5), 90% de eficiência de conversão e 8,5% (v/v) de etanol final	530*	Basso et al. (2008)

* Valores calculados a partir dos dados estequiométricos das referências, segundo a equação $Y_{\text{KATP}} = (\text{milimoles de etanol} - \text{milimoles de glicerol}) \cdot (\text{g biomassa seca gerada})^{-1}$.

Aumentos na temperatura, bem como no teor de etanol, afetam a permeabilidade/fluidez da membrana plasmática, favorecendo a entrada de prótons na célula, e igualmente resultam em maior dispêndio de energia em relação à biomassa formada (ALEXANDRE, 1994). Em outras palavras, uma quantidade extra de energia (ATP) será exigida para a manutenção da célula.

Assim, durante a fermentação alcoólica industrial com reciclo de células, tratamento ácido e com teores elevados de etanol, o custo energético da biomassa pode ser significativamente aumentado, restringindo ainda mais a sua formação. Nessas condições se verifica que apenas 2 g de biomassa seca de levedura são produzidos a partir de 100 g de açúcar metabolizado segundo valores calculados com base em dados de Basso et al. (2008). Valor semelhante pode ser obtido da estequiometria de uma fermentação empregando glicose e amônia como fonte de nitrogênio (HARRISON, 1993).

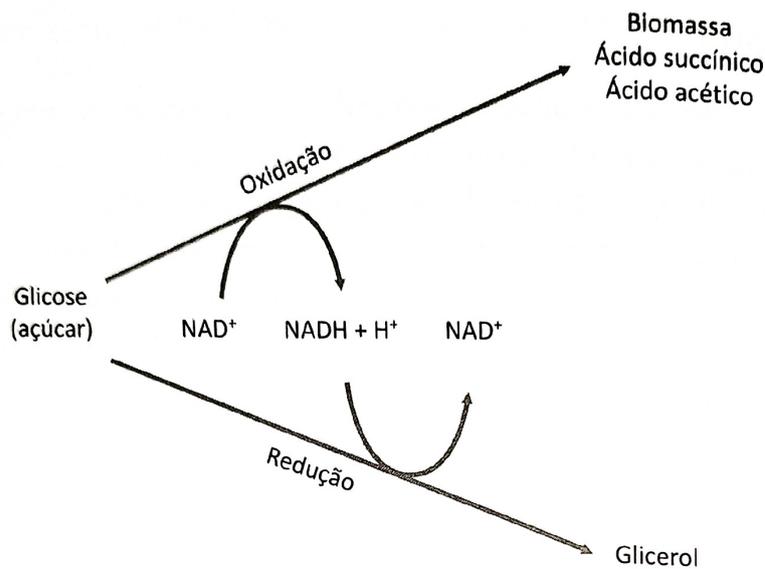
Por tais dados se estima, *grosso modo*, que durante a fermentação simulando as condições do processo industrial brasileiro a energia de manutenção requerida pela levedura é quatro vezes maior que aquela exigida para a produção da biomassa em condições-padrão, ou seja, na ausência de fatores de estresse adicionais. Nessas condições o crescimento em biomassa é extremamente limitado (como vimos, apenas 2 g de biomassa seca produzidos por 100 g de açúcar metabolizado), o que resulta em elevados valores de conversão do açúcar em etanol. Essas observações serão consideradas quando da abordagem do aumento do custo energético da biomassa como estratégia para incremento na eficiência de produção de etanol.

8.4.2.2 Glicerol

O glicerol é considerado o produto secundário excretado em maior quantidade pela levedura durante a fermentação alcoólica. É o único poliálcool produzido por *S. cerevisiae* (JENNINGS, 1984), sendo gerado pela redução enzimática catalisada pela desidrogenase de di-hidroxiacetona-fosfato (NADH-dependente), seguida de ação de fosfatase. Para a formação de glicerol, a levedura renuncia à formação de etanol e, por conseguinte, de ATP (ver glicólise), o que atesta a grande importância fisiológica desse poliálcool para a levedura (GANCEDO; SERRANO, 1989).

A produção de biomassa é um processo acoplado à formação do equivalente a 1,4 moles de NADH (coenzima reduzida) por cada 100 g de biomassa seca (LAGUNAS; GANCEDO, 1973; OURA, 1977). Como nas condições anaeróbias da fermentação não é possível a reoxidação da coenzima reduzida pela cadeia respiratória, a única alternativa é outro composto substituir o oxigênio molecular na função de aceptor final de elétrons e hidrogênios. O metabolismo anaeróbio da levedura evoluiu no sentido de se utilizar a di-hidroxiacetona-fosfato (intermediário da glicólise) como aceptor de elétrons e hidrogênios, gerando assim o glicerol (Figura 8.4). Não por casualidade o glicerol é um soluto osmo-compatível, relacionado com a proteção ao estresse osmótico frequentemente encontrado pela levedura (HOHMANN, 2002). Portanto, a produção de glicerol durante a fermentação alcoólica não apenas restabelece o balanço de coenzimas como protege a levedura contra o estresse osmótico. A estequiometria mencionada (1,4 moles de NADH/100 g de biomassa seca) equivale à produção de 1,29 g de glicerol acoplado à formação de 1 g de biomassa seca. Em fermentações simulando o processo industrial se verifica um desvio de 3,8% do açúcar para a formação de glicerol (BASSO et al., 2008), sendo possível estimar que cerca de 50% do glicerol formado estaria acoplado à manutenção do balanço de redox devido à formação de biomassa.

A formação de glicerol é aumentada quando do estresse osmótico, causado tanto por teores elevados de açúcar como sais, como ocorre com mostos à base de melaço. Tal mecanismo previne a perda de água por parte da célula mediante acúmulo do poliálcool no citoplasma (WALKER, 1998; HOHMANN, 2002). O mesmo estímulo ocorre devido à presença de sulfito no melaço, pois o acetaldeído é sequestrado ao reagir com o SO_2 , impedindo que ele seja convertido em etanol. Resulta, portanto, um desbalanço de redox, que é compensado por formação adicional de glicerol. Enquanto são bem conhecidos os mecanismos envolvidos na formação de glicerol em função dos fatores anteriormente mencionados (GANCEDO; SERRANO, 1989), ainda se especulam as razões pelas quais a contaminação bacteriana, especificamente com *Lactobacillus* sp. do tipo heterofermentativo, induz a levedura a produzir mais glicerol (BASSO et al., 2014).



O NADH gerado nas formações de biomassa e ácidos orgânicos deve ser reciclado para manter o equilíbrio de óxido-redução em anaerobiose

Figura 8.4 Processos metabólicos com geração de coenzimas reduzidas (NADH) e sua utilização para a formação do glicerol, composto que serve como depositário final de elétrons e hidrogênios em condições de anaerobiose.

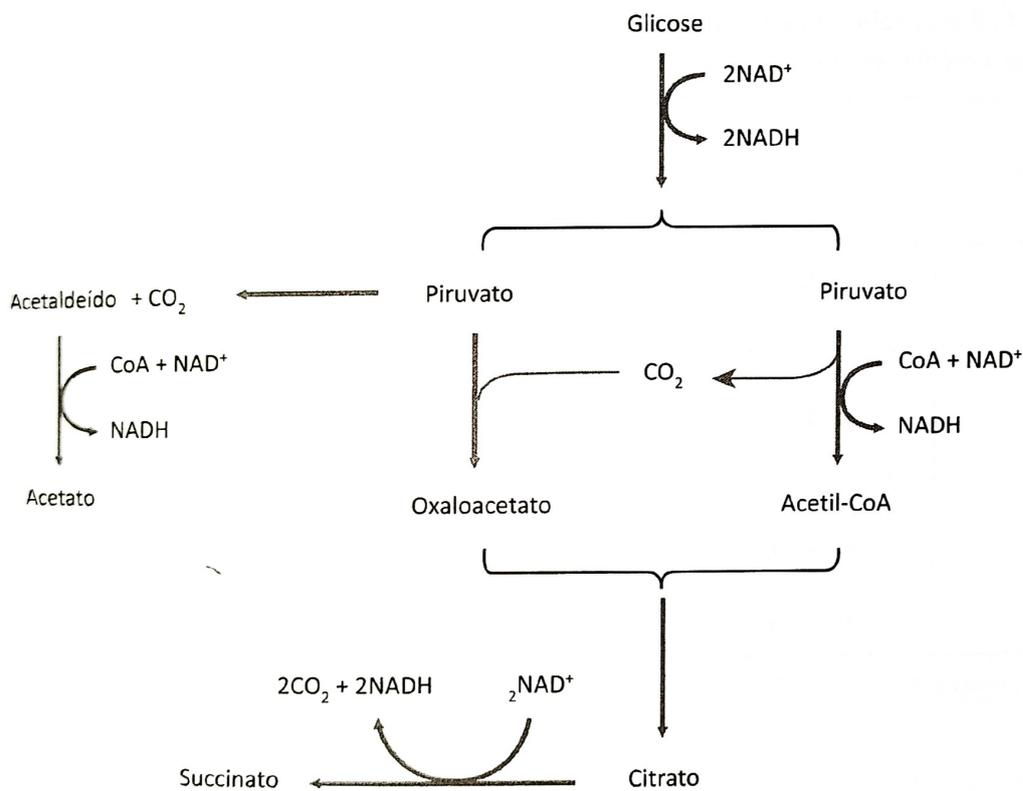
8.4.2.3 Ácidos orgânicos

Durante a fermentação a levedura excreta vários ácidos orgânicos, como acético, málico e pirúvico; porém, o ácido succínico é o mais abundantemente encontrado no final da fermentação. Os ácidos pirúvico e málico são excretados no início da fermentação e logo a seguir reabsorvidos. O ácido succínico é continuamente excretado, sendo que a maior porção é gerada nas primeiras 2 horas de uma fermentação tipo batelada. Fermentações de mosto à base de caldo e melão são finalizadas com teores de 1.000 mg L⁻¹ de ácido succínico e 200-300 mg L⁻¹ de ácido acético, empregando-se linhagens de panificação. Ácido málico é produzido em grande quantidade pela linhagem de panificação, apresentando um pico correspondente a mais de 3 g L⁻¹ na primeira hora de fermentação, porém a linhagem PE-2 produz quantidades menores tanto de malato como succinato (ALVES, 2000).

O caminho metabólico para a formação de 1 mol de acetato a partir de glicose acarreta uma produção extra de 2 moles de NADH, enquanto a de succinato (pela via oxidativa) acarretaria uma formação de 5 moles de NADH (Figura 8.5). Em decorrência desses processos oxidativos de produção de ácidos orgânicos, o balanço de redox deverá ser restabelecido mediante produção de glicerol em quantidades estequiométricas em relação ao NADH formado. Assim, calcula-se que a produção de 1 g de acetato estaria acoplada à formação de 3,07 g de glicerol, e a produção de 1 g de succinato geraria 3,9 g de glicerol. Como a relação molar entre glicose consumida e ácido

orgânico produzido é 1:2 e 1:1 para as formações de acetato e succinato, respectivamente, é possível calcular valores de desvios de glicose de 4,5 g para a produção de 1 g de acetato e de 5,3 g para a formação de 1 g de succinato durante a fermentação (computando a glicose utilizada para arquitetar o esqueleto carbônico dos ácidos orgânicos, conforme a estequiometria da Figura 8.5).

Como se denota, existe um dispêndio significativo de açúcar relacionado com a formação de succinato, embasando sugestões de que incrementos de 5% na eficiência de conversão de açúcar a etanol poderiam ser obtidos com reduções nas formações de biomassa, glicerol e ácidos orgânicos. Ademais, não foram encontradas razões fisiológicas para a tamanha produção de succinato pela levedura (OURA, 1977).



Estequiometria:	
0,5 Glicose + 2NAD ⁺	\longrightarrow Acetato + CO ₂ + 2NADH
Glicose + 5NAD ⁺	\longrightarrow Succinato + 2CO ₂ + 5NADH

Figura 8.5 Esquema de biossínteses dos ácidos acético e succínico, permitindo a dedução da estequiometria para cálculos dos desvios de açúcar para a formação desses ácidos. A via oxidativa de formação de succinato é a mais aceita, utilizando reações do Ciclo de Krebs que opera parcialmente na condição de anaerobiose.

Fonte: Gancedo e Serrano (1989).

Entre vários inibidores avaliados para a redução do crescimento da levedura, objetivando aumentos na conversão do açúcar em etanol, o ácido benzoico se mostrou apropriado, pois não comprometia a viabilidade celular em doses eficientes em reduzir a formação de biomassa e glicerol. Com tais evidências, esse inibidor foi empregado a escala industrial em três destilarias que apresentavam excessiva formação de biomassa com comprometimento da produção de etanol. Doses de ácido benzoico de 1,2 mM aplicadas no pé-de-cuba durante o tratamento ácido (condições preestabelecidas em laboratório) foram muito eficientes em reduzir as formações de biomassa e glicerol, incrementando significativamente o rendimento da fermentação durante vários ciclos fermentativos, sem comprometimento da viabilidade da levedura (Tabela 8.4).

Tabela 8.4 Efeitos de ácido benzoico (1,2 mM) no tratamento ácido do pé-de-cuba de três diferentes destilarias (A, B e C) sobre parâmetros tecnológicos da fermentação com reciclo de células. Os dados representam a média semanal de cada destilaria

Destilaria	Tratamento	Eficiência fermentativa (%)	Glicerol (g/100 g ART)	Contaminação bacteriana (células/mLx10 ⁶)
A	Controle	90,6	3,05	66
A	Ácido benzoico	90,8	2,78	295
B	Controle	87,7	3,63	12
B	Ácido benzoico	90,2	3,00	38
C	Controle	90,8	4,08	8
C	Ácido benzoico	92,7	2,89	48

Fonte: Basso, Alves e Amorim (1997).

No entanto, após uma semana de reciclos fermentativos, observou-se uma drástica elevação na contaminação bacteriana, tornando impraticável a fermentação. Análises mais detalhadas em laboratório vieram a demonstrar que a aplicação do ácido benzoico reduziu também a formação de ácido succínico, tornando o ambiente da fermentação mais propício ao crescimento bacteriano (Tabela 8.5).

Mais ainda, ficou também demonstrado que o ácido succínico, no nível em que é produzido durante a fermentação, exerce um efeito antagônico ante os lactobacilos contaminantes, efeito este que é potencializado pelo etanol (BASSO; ALVES; AMORIM, 1997). Tais resultados vieram a demonstrar que a redução de ácido succínico com intuito de ganhos de eficiência em etanol não foi vantajosa no processo industrial. Foi sugerida, portanto, uma razão ecológica para a produção de succinato: tornar a levedura mais competitiva no ambiente da fermentação. Assim, leveduras industriais com elevada produção de succinato seriam desejáveis, pois produziriam um antibacteriano a preço de açúcar.

Tabela 8.5 Efeitos do ácido benzoico (1,2 mM) no tratamento ácido do pé-de-cuba (pH = 2,5 por 1 hora) sob parâmetros tecnológicos de fermentação com reciclo de células, em condições de laboratório, com a levedura de panificação. Os dados representam a média de quatro ciclos fermentativos

Parâmetro da fermentação	Controle	Ácido benzoico*
Eficiência fermentativa (%)*	86,2	89,4
Glicerol (g/100 g de açúcar consumido)	4,26	2,99
Biomassa (fermento no vinho bruto em % m/v)*	9,7	8,8
Ácido succínico (mg/L no vinho delevurado)	774	249
Contaminação bacteriana (células/mL)*	<0,1x10 ⁶	21x10 ⁶
Viabilidade celular da levedura (%)	71	69

* Os valores são referentes ao último ciclo fermentativo.

Fonte: Basso, Alves e Amorim (1997).

8.5 O PROCESSO INDUSTRIAL BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DE ETANOL

8.5.1 CARACTERÍSTICAS DO PROCESSO

8.5.1.1 O substrato para a fermentação

Tradicionalmente, a produção de etanol no Brasil esteve acoplada à produção de açúcar. A cana de açúcar é inicialmente prensada (em algumas unidades se empregam difusores), obtendo o caldo e o resíduo sólido fibroso (bagaço). A sacarose é obtida mediante cristalização após clarificação e concentração do caldo, resultando ainda um resíduo escuro, viscoso e saturado de sacarose, o melaço, contendo 50-60% de sacarose e 5-15% de glicose mais frutose. O melaço, gerado numa proporção de cerca de 60 kg.ton⁻¹ de cana processada, é misturado com caldo de cana em diferentes proporções e utilizado para a fermentação. A mistura de melaço e caldo resulta num substrato de melhor qualidade, pois o caldo normalmente apresenta deficiências de nutrientes, enquanto o melaço contém compostos inibidores da fermentação e conteúdos excessivos de alguns sais. No entanto, o melaço contribui não somente com minerais necessários a uma boa fermentação, mas com aminoácidos, vitaminas do complexo B, ácidos graxos insaturados, e ácidos orgânicos (trans-aconítico, cítrico) que exercem um desejado poder tampão durante a fermentação.

Assim, a composição mineral dos substratos à base de cana-de-açúcar varia muito em função de proporção de melaço, variedade e maturação da cana, solo, clima e processamento da cana na indústria. Na Tabela 8.6 se encontram os níveis adequados dos nutrientes para uma fermentação, com breve menção às suas funções na célula e aos efeitos tóxicos de alguns (Tabela 8.6).

Tabela 8.6 Concentrações de nutrientes minerais no mosto consideradas adequadas à fermentação

Mineral	Concentração (mg L ⁻¹)	Observações
N	50-150	Formas nitrogenadas aproveitáveis: amoniacal (N-NH ₄ ⁺) e alfa-amínica de aminoácidos (α-NH ₂)
P	50-250	H ₂ PO ₄ ⁻ é a forma preferencialmente absorvida e mais abundante no pH = 4,5. Pela ação da fosfatase ácida a levedura pode aproveitar o P dos ésteres fosfóricos
K	700-1.300	Atua como ativador enzimático, facilita a absorção de P e Zn e aumenta a tolerância aos íons tóxicos, como o H ⁺
Ca	40	Já em excesso nos mostos industriais. Antagoniza os efeitos benéficos do Mg
Mg	100-200	Atua como ativador enzimático, estimula a absorção do P, mantém a integridade das membranas
S	<100	Já em excesso nos mostos industriais na forma de SO ₄ ⁻² . A forma SO ₂ é tóxica acima de 200 mg L ⁻¹
Zn	1-5	Participa da glicólise e da síntese de vitaminas, sendo essencial ao crescimento e à fermentação
Mn	1-5	Estimula a síntese de proteínas e vitaminas e induz a formação de desidrogenase alcoólica. Atua em sinergismo com o Zn
Cu	1-5	Integrante de enzimas, estimulando fermentação e crescimento, mas tóxico em concentrações mais elevadas
Fe	<1	Já em excesso nos mostos industriais
Al	<10	É mais tóxico em mosto de caldo e bem tolerado em mosto de mel (cujos ácidos orgânicos provavelmente complexam o metal)

8.5.1.2 O processo fermentativo

A maior parte das destilarias emprega o processo batelada alimentada, sendo que cerca de 20% das unidades utilizam uma versão contínua, ambas as modalidades com reciclo de leveduras (Figura 8.6).

Para o início da safra normalmente se empregam 2 ton a 12 ton de levedura de panificação (disponível na quantidade exigida e a preço acessível), acrescida de 10 kg a 300 kg de levedura selecionada (na forma de levedura seca ativa). Este ainda é um pré-inóculo que deve ser propagado até atingir a quantidade necessária para o volume de dorna disponível. Já com quantidade suficiente de levedura, a fermentação se inicia

pela adição do mosto (pH 5,0-5,5) contendo 18-25% (m/v) de açúcares (ART) sobre o inóculo, agora denominado pé-de-cuba (suspensão de células de leveduras com cerca de 25% a 35% de biomassa úmida) e que representa 25% a 40% do volume final da fermentação. Em virtude do grande volume da dorna, o tempo de alimentação é de 4 a 6 horas, sendo que a fermentação é finalizada com 6 a 10 horas, dependendo do teor alcoólico final a ser atingido.

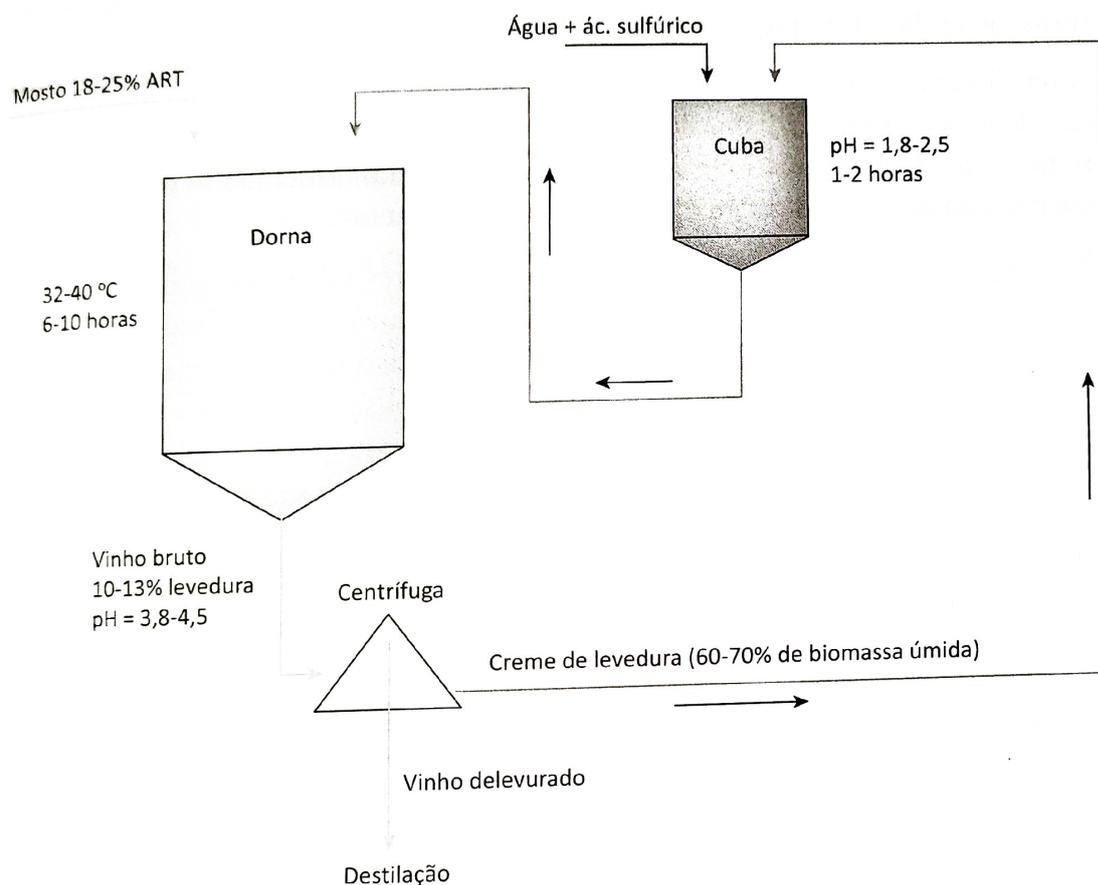


Figura 8.6 Esquema do processo fermentativo tipo batelada alimentada com tratamento ácido e recirculação do fermento. O mosto é adicionado ao pé-de-cuba já contido na dorna, iniciando-se a fermentação do fermento. O mosto é adicionado ao pé-de-cuba já contido na dorna, iniciando-se a fermentação do fermento. O mosto é adicionado ao pé-de-cuba já contido na dorna, iniciando-se a fermentação do fermento. As células de levedura são coletadas por centrifugação, tratadas com ácido e reutilizadas em fermentação subsequente.

Teores alcoólicos entre 8% e 12% (v/v) são atingidos com uma densidade de células no reator de 10% a 14% (m/v) com base na massa úmida (ou 22 g a 30 g de biomassa seca por litro, na faixa de 10^8 células.mL⁻¹). A temperatura da dorna fica entre 32-35 °C, porém, em virtude do curto tempo de fermentação e de um sistema de arrefecimento nem sempre eficiente, a temperatura pode atingir cerca de 40 °C, especialmente durante o verão (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001; WHEALS et al., 1999; BASSO et al., 2008).

Cessada a fermentação, as leveduras são separadas por centrifugação (recuperação de 90-95% da biomassa do fermentador), resultando numa fase pesada (creme

de levedura) contendo 60-70% (massa úmida/volume) e o meio fermentado livre de células, denominado vinho "delevedurado", que é encaminhado para a destilação.

O "creme de levedura" é diluído com igual volume de água e tratado com ácido sulfúrico (até pH 1,8-2,5, por 1-2 horas), objetivando a redução da contaminação bacteriana, e reutilizado numa fermentação subsequente. Assim, o teor alcoólico no pé-de-cuba é cerca de metade daquele obtido no final da fermentação. Esse processo brasileiro de reciclo de células é bem peculiar e permite até duas fermentações por dia no transcorrer da safra, que abrange 200-250 dias.

A reutilização de células reduz a propagação da levedura, desviando menor quantidade de açúcar para a formação de nova biomassa. Estima-se entre 5% e 10% o incremento de biomassa durante a fermentação, e que tal crescimento reponha a biomassa perdida na centrifugação e nas sangrias de fermento.

No transcorrer da fermentação os teores de açúcares (sacarose, glicose e frutose) sofrem elevações até o final da alimentação, sendo reduzidos até o final da fermentação. Os teores de açúcares presentes no meio fermentativo serão governados pelo tempo de enchimento da dorna e pelas velocidades de hidrólise da sacarose e das absorções de glicose e frutose pela levedura. Na Figura 8.7 se observa que a hidrólise da sacarose sobrepaja em muito as intensidades com que glicose e frutose são absorvidas pela levedura, acarretando uma elevação nos teores desses monossacarídeos (a invertase catalisa a hidrólise da sacarose no ambiente externo da levedura). Embora o teor final de etanol atingido fique em cerca de 10% (v/v), a levedura experimentou um teor máximo de açúcares totais de apenas 3,9% (expressos como ART). Neste caso, em particular, o estresse osmótico causado pelo açúcar ainda poderia ser reduzido pelo aumento no tempo de alimentação, sem que ocorresse incremento do tempo de fermentação.

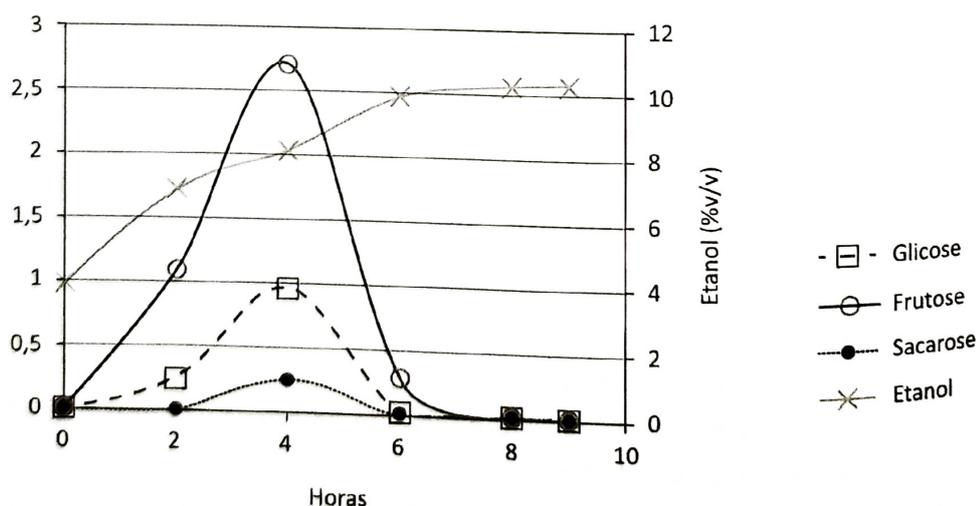


Figura 8.7 Cinética de uma fermentação batelada alimentada, com tempo de alimentação de 4 horas com mosto de mel (21% de sacarose, 1,8% de glicose e 1,83% de frutose) e teor de fermento final de 13,4% (m/v). O pé-de-cuba com 26% de fermento representava 40% do volume da dorna. Mosto e pé-de-cuba obtidos de uma destilaria.

8.5.2 FATORES ESTRESSANTES À LEVEDURA, INERENTES AO PROCESSO INDUSTRIAL

Como visto, a levedura encontra diversos fatores estressantes que atuam sequencialmente e simultaneamente, como: alto teor alcoólico, alta pressão osmótica, baixo pH, alta temperatura, inibidores no mosto, entre outros. Tais fatores estressantes são intensificados pela prática do reciclo de células. Os principais são relacionados a seguir.

8.5.2.1 Estresse etanólico

Em vista dos teores elevados de etanol ao final de cada ciclo fermentativo [de 8% a 12% (v/v)], este álcool é um dos principais fatores de estresse que atuam sobre a levedura durante a fermentação industrial. Embora o papel inibitório do etanol sobre a levedura *S. cerevisiae* não seja completamente compreendido, sabe-se que o alvo principal é a membrana citoplasmática das células. A composição da membrana citoplasmática é alterada na presença de etanol, e, como resultado, a permeabilidade dela para alguns íons (como íons hidrogênio) é significativamente aumentada (ALEXANDRE, 1994). Existem vários outros efeitos do etanol sobre a fisiologia da levedura durante a fermentação, incluindo a inibição do crescimento celular e a inativação de algumas enzimas, levando a uma diminuição da viabilidade celular.

O reciclo celular exacerba ainda mais o efeito estressante do etanol, em vista do estresse cumulativo que as células enfrentam nas bateladas subsequentes. Como é desejável que as células de levedura mantenham alta viabilidade celular (porcentagem de células viáveis em relação ao total de células) ao final de cada ciclo fermentativo, os teores finais de etanol na indústria sucroalcooleira não devem ultrapassar um dado limite, que gira em torno de 11-12% (v/v). Com efeito, se a viabilidade celular não é um motivo de preocupação ao final da batelada, como no caso da fermentação do milho e de alguns cereais, onde não se emprega o reciclo celular, teores de etanol entre 17% e 23% (v/v) são normalmente praticados.

Apesar desses percalços, as fermentações com elevado teor de etanol são extremamente desejáveis no contexto da indústria produtora de etanol, pois permitem reduzir tanto o consumo de água (diluição de fermento e mosto) como o gasto energético durante a etapa de destilação, favorecendo a sustentabilidade do processo industrial. Nas destilarias, o teor final de etanol é limitado pela tolerância da linhagem presente no processo, e elevadas temperaturas e acidez exacerbam o estresse etanólico (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

8.5.2.2 Estresse ácido

Embora seja bem conhecido que leveduras toleram ambientes ácidos, o tratamento com ácido sulfúrico, amplamente empregado na indústria entre uma batelada e outra, pode causar perturbações fisiológicas importantes na levedura. No tratamento ácido o pH do creme de levedo é ajustado para cerca de 1,8 a 2,5 pela adição de ácido sulfú-

rico, e mantido nessa condição por 1 a 2 horas, no intuito de reduzir a contaminação bacteriana. Os efeitos deletérios são constatados pelo extravasamento de minerais (como N, P, K, Mg) e pela diminuição dos teores intracelulares de trealose na levedura, com concomitante redução na viabilidade celular. Assim, não é de se surpreender que linhagens de leveduras mais tolerantes às condições estressantes das fermentações industriais normalmente apresentam níveis mais elevados de trealose (BASSO et al., 2008).

A membrana plasmática é permeável às formas não dissociadas dos ácidos orgânicos fracos (lactato, acetato, benzoato, sorbato etc.), que ao adentrarem as células dissociam-se parcialmente liberando prótons e, conseqüentemente, acidificando o meio intracelular. Para manter a homeostase intracelular, as células gastam energia (ATP) para remover os prótons em excesso, por meio da ATPase de membrana (AZMAT et al., 2012; PAMPULHA; LOUREIRO-DIAS, 2000; QUINTAS et al., 2005). Esses eventos são agravados pela acidificação da própria fermentação (excreção de ácidos orgânicos e absorção de potássio e amônio mediante antiporte com íons H^+). No entanto, em mostos à base de melão, esses efeitos são atenuados pelo poder tamponante desse substrato. Na prática, ao operar com mostos de elevada capacidade tampão, é recomendável uma redução menos intensa do pH no tratamento ácido, pois o consumo de ácido será significativamente aumentado (maior gasto com o insumo), além de promover a protonação dos ácidos orgânicos fracos (que estarão presentes em maior quantidade), exacerbando os seus efeitos tóxicos à levedura.

Níveis residuais de sulfito (SO_2 , igualmente considerado um ácido fraco), utilizado na clarificação do caldo de cana, podem ser encontrados principalmente em substratos à base de melão. Embora seja considerado um agente tóxico para as células quando presente em concentração acima de 200 mg.L^{-1} , o sulfito pode ser considerado benéfico para a fermentação em níveis ao redor de 100 mg.L^{-1} , uma vez que auxilia na redução da contaminação bacteriana.

8.5.2.3 Estresse osmótico

É intuitivo imaginar que as leveduras estão expostas a elevadas concentrações de sacarose e outros açúcares da cana durante a fermentação industrial, uma vez que o teor final de etanol gira em torno de 8-12% (v/v). No entanto, como se trata de um processo em regime descontínuo alimentado (batelada alimentada), as leveduras não são expostas a elevadas concentrações de açúcares, a despeito de o mosto conter entre 18-25% de ART (m/v), conforme se observa na Figura 8.7. No entanto, nessa mesma figura, pode-se deduzir que a velocidade de fermentação é diminuída quando os teores de açúcar atingem o ponto máximo (final da alimentação de 4 horas). Tais dados sugerem que esse tempo de alimentação não é adequado para uma boa fermentação, pois está induzindo um estresse osmótico à levedura.

O estresse osmótico causado por sais, que estão presentes em grandes quantidades no melão de cana-de-açúcar, é certamente um motivo de preocupação. Os altos níveis de potássio, cálcio e magnésio excedem em muito os requisitos para a nutrição da levedura. Por exemplo, os níveis médios de potássio são elevados o suficiente para

induzir respostas de estresse em leveduras, com aumento da formação de glicerol, redução de carboidratos de reserva e queda no rendimento fermentativo (ALVES, 2000).

Teores aumentados de glicerol são observados durante estresse osmótico, contaminação bacteriana e várias outras condições, sugerindo que tal subproduto se constitua num indicativo seguro de condições gerais de estresse para a levedura. De 5% a 8% do açúcar consumido pode resultar em glicerol, e reduções em sua formação podem ser obtidas mediante ajuste da velocidade de alimentação, uso de linhagens com menor produção do poliálcool e restrição no crescimento da levedura durante a fermentação.

Leveduras com alta atividade de invertase provocam maiores elevações nos teores de glicose e frutose durante a alimentação (Figura 8.7), o que pode incrementar o estresse osmótico e resultar em maior quantidade de glicerol excretada.

8.5.2.4 Contaminação bacteriana

Em vista das particularidades do processo industrial de produção de etanol, condições assépticas são muito difíceis de serem alcançadas, e a fermentação opera sob contaminação bacteriana. Além de redirecionar açúcares que poderiam ser usados na formação de etanol para a formação de outros metabólitos bacterianos, existem efeitos prejudiciais de alguns desses mesmos metabólitos (como ácidos láctico e acético) sobre o desempenho fermentativo das leveduras. Como resultado da contaminação bacteriana, observa-se redução no rendimento em etanol, aumento da floculação celular, aumento da formação de espuma e redução da viabilidade celular (BASSO et al., 2014). A floculação induzida pela presença de bactérias prejudica a eficiência da etapa de centrifugação e reduz a superfície de contato entre as células de levedura e o meio de fermentação. Por sua vez, a formação excessiva de espuma, causada pela presença de bactérias, aumenta os custos do processo pelo uso de antiespumantes. Por fim, os antibióticos utilizados para controlar a contaminação igualmente aumentam os custos do processo. Por outro lado, níveis residuais de antibióticos na levedura seca (subproduto da indústria de etanol) a tornam imprópria para a comercialização como suplemento alimentar.

A maioria dos contaminantes bacterianos presentes nas fermentações industriais são bactérias lácticas. Acredita-se que a sua prevalência nesse processo se deva à maior capacidade desse tipo de bactéria em lidar com ambientes ácidos e concentrações elevadas de etanol em comparação a outros microrganismos. Nas usinas brasileiras, bactérias do gênero *Lactobacillus* são as mais abundantes nas principais regiões produtoras do país (GALLO, 1990; LUCENA et al., 2010).

As bactérias lácticas são tradicionalmente classificadas em dois grandes subgrupos metabólicos, de acordo com a via utilizada para metabolização das hexoses: bactérias homo e heterofermentativas. Isolados bacterianos a partir de substratos à base de cana-de-açúcar englobam os dois subgrupos, os quais produzem ambos os isômeros do lactato [L(+) ou D(-)], em variáveis proporções dependendo da linhagem bacteriana.

Foi recentemente demonstrado que as linhagens heterofermentativas parecem ser mais prejudiciais às leveduras que as homofermentativas durante a fermentação

industrial (BASSO et al., 2014). A formação de ácido láctico é um bom parâmetro para avaliar os prejuízos causados pelas bactérias, parâmetro este que está associado à atividade metabólica desses contaminantes e que reflete melhor o impacto na fermentação que a simples contagem de células bacterianas.

8.5.2.5 Outros estresses

A presença de níveis tóxicos do metal alumínio em substratos industriais à base de cana-de-açúcar também é responsável pela diminuição do desempenho das leveduras na fermentação. Em virtude da condição ácida da fermentação, o íon alumínio (que é absorvido pela planta em solos ácidos) está presente na sua forma iônica trivalente (Al^{3+}), que é mais tóxica que as demais. O Al^{3+} , por sua vez, afeta negativamente a viabilidade das leveduras, o acúmulo de trealose e a velocidade da produção de etanol. Linhagens industriais diferem muito em relação à tolerância ao alumínio, em termos de viabilidade celular, produção de etanol e acúmulo de alumínio. Por exemplo, a linhagem industrial CAT-1 é mais tolerante em comparação à linhagem PE-2 e à levedura de panificação *Fleischmann*[®]. Existem evidências dos efeitos do Al^{3+} sobre a membrana plasmática e sobre a transdução da energia do ATP. Esse metal tem uma afinidade mil vezes maior que o Mg^{2+} em complexar o ATP, e o complexo ATP-Al não carrega a energia química para os processos celulares endergônicos.

Níveis muito baixos de cádmio (Cd^{2+}), considerados seguros, foram encontrados em cana-de-açúcar fertilizada com lodo de esgoto. Mesmo assim, fermentações com reciclo aliadas à capacidade de bioacumulação resultaram em níveis tóxicos para as próprias leveduras. Com isso, as células de levedura apresentam baixa viabilidade, redução na velocidade de captação de açúcares e baixo rendimento fermentativo.

Os efeitos tóxicos do alumínio podem ser parcialmente aliviados por íons magnésio (Mg^{2+}) e completamente abolidos em meios formulados com melado. Da mesma forma, os efeitos tóxicos do alumínio e do cádmio podem ser parcialmente aliviados pela suplementação do mosto com vinhaça (efluente gerado na etapa de destilação), sugerindo a presença de compostos quelantes desses metais nesse efluente (BASSO; ROCHA, 2011).

Outro importante fator de estresse na fermentação alcoólica é a temperatura da etapa fermentativa, que normalmente é controlada entre 32 °C e 35 °C. Sabe-se que altas temperaturas intensificam outros estresses, como o ácido e o etanólico. Linhagens termotolerantes já foram obtidas, o que permitiria reduções nos custos energéticos do resfriamento das dornas. No entanto, como a contaminação bacteriana é fortemente estimulada por temperaturas acima de 32 °C, discute-se se a fermentação conduzida com temperaturas mais elevada seria realmente vantajosa.

A Figura 8.8 esquematiza os diversos fatores estressantes mencionados atuando principalmente na membrana plasmática, bem como interferindo na homeostase e em outros processos no citoplasma celular.

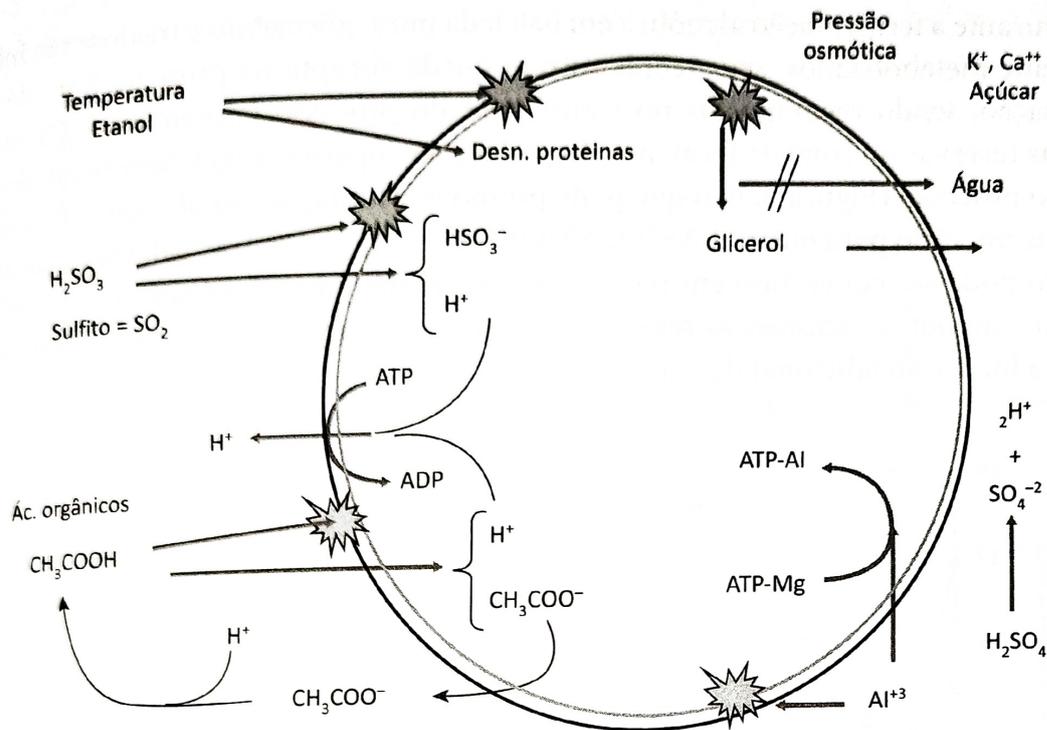


Figura 8.8 A membrana plasmática é afetada em sua fluidez e sua integridade por todos os fatores estressantes mencionados. A pressão osmótica, ocasionada por sais e açúcares, estimula a produção de glicerol. O tratamento com ácido sulfúrico, a contaminação bacteriana e a presença do sulfito no mosto facilitam a acidificação do citoplasma celular, exigindo ATP para a expulsão dos prótons. O Al^{3+} substitui o Mg^{2+} do complexo com ATP, afetando a transferência da energia.

Outros fatores de estresse, como herbicidas usados no cultivo de cana-de-açúcar, fenóis encontrados no caldo de cana-de-açúcar colhida mecanicamente e quantidades excessivas de ferro no melaço, podem igualmente afetar a fermentação, mas seus efeitos ainda precisam ser mais bem demonstrados. Além disso, mudanças drásticas durante a fermentação, como a variação da vazão de alimentação do mosto, o tratamento ácido e as paradas frequentes do processo em função das chuvas, afetam negativamente o desempenho das leveduras.

8.5.2.6 Importância dos carboidratos de reserva (glicogênio e trealose) na tolerância aos estresses

Enquanto a maior parte dos organismos optou por uma única reserva de carboidrato, as leveduras acumulam, simultaneamente, glicogênio e trealose. Essas reservas chegam a representar até 40% da matéria seca da biomassa. Enquanto o glicogênio se comporta como uma reserva típica, a trealose se mostra de suma importância para a tolerância da levedura às diversas situações de estresse, quer térmico, etanólico ou de desidratação, sendo que tal tolerância é decorrente de a trealose se associar à membrana plasmática, mantendo a integridade desta.

Durante a fermentação alcoólica em batelada pura, glicogênio e trealose são intensamente metabolizados: seus teores sofrem queda abrupta na primeira hora de fermentação, sendo recompostos no transcorrer do processo fermentativo. Os teores dessas reservas no final da fermentação podem ser superiores ou inferiores ao do início do processo (Figura 8.9), o que pode promover flutuações na eficiência fermentativa de um ciclo para outro (BASSO; AMORIM, 1988). Em outras palavras, açúcar do mosto pode ser convertido em reserva celular, reduzindo a formação de etanol, enquanto em outras ocasiões as reservas, previamente armazenadas, podem contribuir para a formação adicional de etanol.

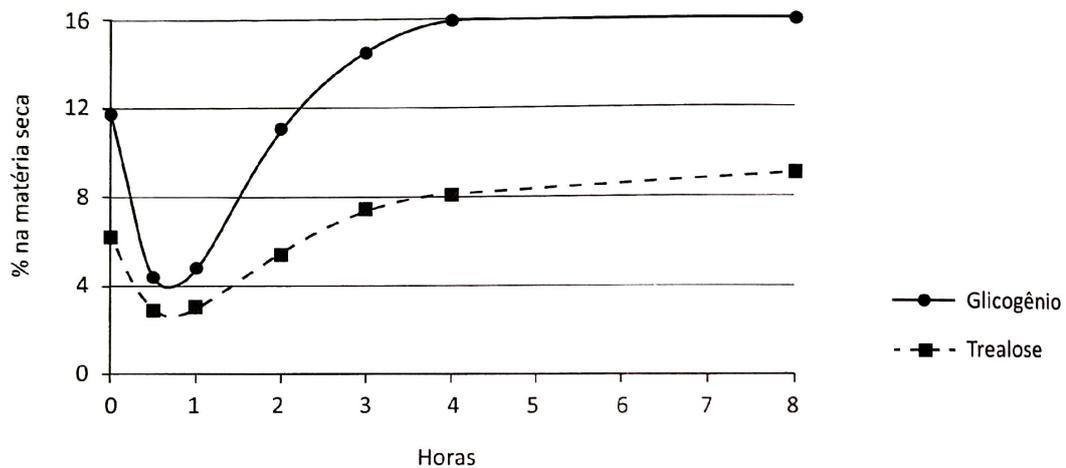


Figura 8.9 Variações nos teores celulares de glicogênio e trealose no transcorrer de uma fermentação batelada pura.

Fonte: Basso e Amorim (1988).

É desejável que a levedura apresente elevados níveis das reservas ao final da fermentação, mesmo onerando a eficiência de conversão açúcar/etanol, pois durante o tratamento ácido, processado a seguir, ocorrerá a fermentação dessas reservas endógenas. Essas reservas serão em parte convertidas em etanol, gerando ATP que fornecerá a energia de manutenção necessária à sobrevivência durante os estresses na etapa do tratamento ácido. Esse etanol produzido na cuba de tratamento do fermento não é medido, porém é computado como etanol gerado na fermentação que se segue.

A mobilização dessas reservas explica por que o teor de etanol continua a aumentar (lentamente) mesmo após o consumo total do açúcar do mosto. Na ausência de fonte externa de açúcar, a levedura mobiliza suas reservas para sobreviver durante condições de estresse (temperatura, etanol, ácido etc.), promovendo a chamada *fermentação das reservas endógenas de açúcar* (Figuras 8.10 e 8.11).

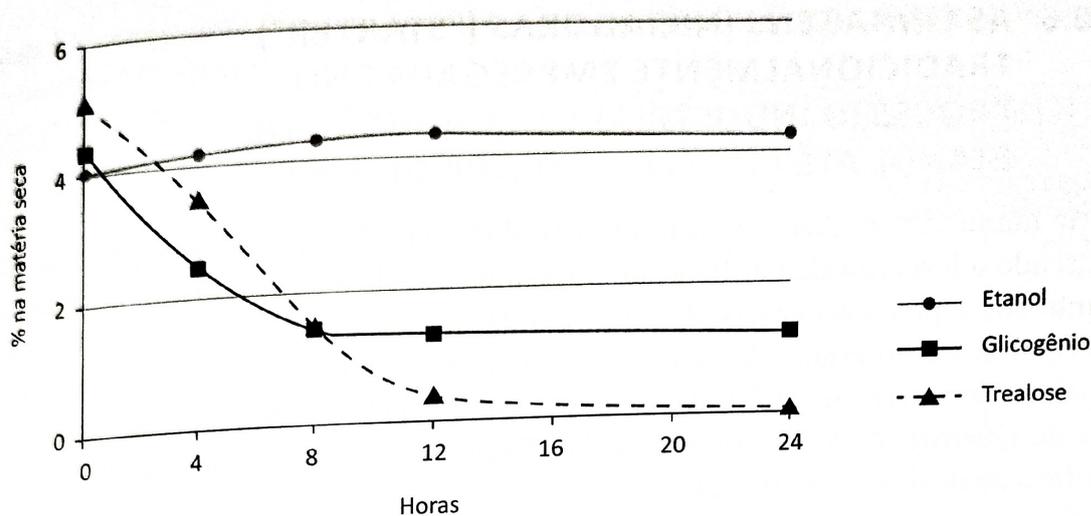


Figura 8.10 Teores celulares de glicogênio, trealose (% na matéria seca) e etanol (% v/v) durante a fermentação das reservas endógenas. Linhagem PE-2 suspensa em vinho diluído a 40 °C.

Fonte: Paulillo (2001).

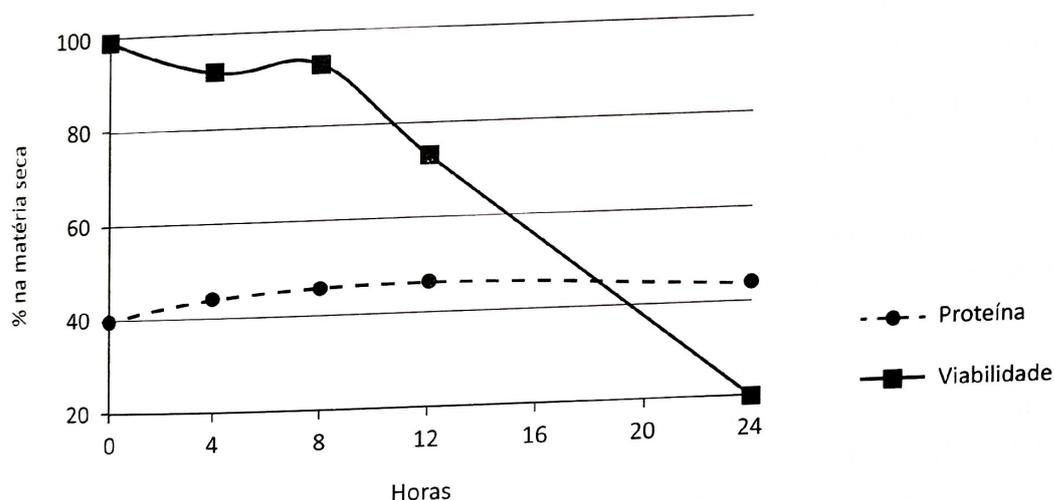


Figura 8.11 Teores celulares de proteína na levedura (% na matéria seca) e porcentagem de células viáveis da linhagem PE-2, no transcorrer da fermentação das reservas endógenas a 40 °C.

Fonte: Paulillo (2001).

Se a biomassa for produzida em excesso no processo, ela pode ser removida e comercializada na forma de levedura seca, sendo desejáveis teores proteicos acima de 40%. No entanto, elevados teores de glicogênio e trealose na levedura correspondem a baixos conteúdos de proteína. A capacidade metabólica de promover a fermentação das reservas de carboidratos permite obter incrementos de até 30% no teor de proteína da levedura, valorizando esse subproduto com simultânea produção adicional de etanol de 50-200 L.ton⁻¹ de levedura seca produzida. Isso porque, em condições controladas de estresse, se promove uma redução nos teores de carboidrato da biomassa (que se converte em etanol), porém preservando os teores de proteína (AMORIM; BASSO, 1991).

8.6 AS LINHAGENS INICIADORAS ("STARTER") TRADICIONALMENTE EMPREGADAS NO PROCESSO INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DE ETANOL ATÉ INÍCIO DA DÉCADA DE 1990

Há muito tempo a fermentação industrial de etanol emprega linhagens iniciadoras, sendo a levedura de panificação amplamente utilizada pela disponibilidade em quantidade e preço acessíveis. Até o início da década de 1990, o parque alcooleiro, principalmente do estado de São Paulo (o maior produtor de etanol), dispunha das linhagens de *S. cerevisiae* IZ-1904, TA (fornecidas pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, da Universidade de São Paulo – Esalq/USP), além da levedura de panificação de diferentes marcas.

As destilarias obtinham as linhagens IZ-1904 e TA na forma de uma cultura pura (em tubo de ensaio ou dezenas de litros de uma suspensão de células) e as propagavam na destilaria até ter biomassa suficiente para a operação do processo industrial, pois elas não eram produzidas industrialmente. Já com as leveduras de panificação, a destilaria podia dar a partida com quantidade maior de pré-inóculo, empregando entre 2 e 12 toneladas de fermento fresco (a granel).

Uma avaliação comparativa entre as três linhagens mostrou que a IZ-1904 apresentava maior eficiência fermentativa e menor formação de glicerol em relação às leveduras de panificação e TA, empregando-se mosto sintético em fermentação sem reciclo e com baixa concentração de inóculo. No entanto, a comparação dessas mesmas três linhagens, em condições mais próximas da indústria e com reciclo de células, evidenciou diferenças fisiológicas e tecnológicas marcantes. Nessas condições a linhagem IZ-1904 apresentou queda abrupta de viabilidade e drástica redução de biomassa, tornando-a inadequada à fermentação com reciclo de células, a despeito de apresentar nos ciclos iniciais maior eficiência de formação de etanol. O estudo com reciclo de células permitiu demonstrar que a referida linhagem não conseguiu manter a quantidade desejável de células viáveis, tampouco teores intracelulares adequados de trealose e glicogênio (reservas internas de carboidratos que contribuem para manutenção da viabilidade celular), e o aumento na produção de etanol foi em detrimento da biomassa e das reservas que contribuem para a tolerância aos estresses da fermentação. Tais resultados sugeriam que a linhagem IZ-1904 não sobreviveria às condições de reciclo celular (Tabela 8.7).

Tabela 8.7 Comparação entre leveduras quanto aos parâmetros fisiológicos e tecnológicos de uma fermentação com reciclo de células

Parâmetros da fermentação (%)	7-8% etanol a 30 °C		9% etanol a 33 °C	
	PAN	IZ-1904	PAN	PE-2
Eficiência fermentativa ¹	88,8	90,0	89,5	93,2
Glicerol ¹	4,6	5,1	5,7	3,7
Biomassa ²	41	-10	35	49
Viabilidade ³	80	28	48	97
Glicogênio ³	16	7	9	16
Trealose ³	7	0	4	9

¹ Fração do ART convertida em etanol ou glicerol (os dados representam a média de seis ciclos fermentativos).

² Variação na biomassa do primeiro para o sexto ciclo fermentativo. ³ Valores referentes ao último ciclo fermentativo; teores das reservas na matéria seca de levedura.

Fonte: Basso et al. (2008).

No entanto, não havia unanimidade entre os produtores de etanol quanto às três linhagens, sendo cada uma enaltecida por alguns e depreciada por outros. A grande dificuldade metodológica de uma identificação inequívoca da presença das linhagens iniciadoras nas dornas de fermentação ao longo da safra não permitia uma relação entre as características da fermentação na indústria e a presença de uma determinada linhagem no processo.

Porém, no início de 1990 a técnica molecular de *cariotipagem eletroforética* (modalidade TAFE) foi utilizada para confirmar se a linhagem IZ-1904 (que se mostrou incapaz de suportar reciclos fermentativos em condições de laboratório) realmente seria inadequada como iniciadora num processo industrial. O mesmo estudo permitiria avaliar a superioridade da linhagem TA, amplamente empregada pelas destilarias, naquela ocasião. Os resultados obtidos foram de enorme impacto, estabelecendo-se como um marco no conhecimento da microbiologia do processo industrial brasileiro, como se denota na seção a seguir.

8.7 DINÂMICA POPULACIONAL DE LEVEDURAS NO AMBIENTE DA FERMENTAÇÃO INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DE ETANOL

Como a cariotipagem eletroforética havia sido utilizada com sucesso na identificação de linhagens empregadas na fermentação vínica, a mesma técnica foi aplicada em amostras oriundas de cinco destilarias que utilizaram as várias linhagens disponíveis

como iniciadoras (IZ-1904, TA, leveduras de panificação etc.). Os resultados, coletados no transcorrer de duas safras (1991-1993), demonstraram que nenhuma das linhagens iniciadoras empregadas foi capaz de se implantar no processo industrial, sendo substituídas por outras, dentro de 15 a 30 dias, enquanto a safra perduraria por cerca de 250 dias. Ademais, a cariotipagem permitiu evidenciar que a fermentação industrial era conduzida por linhagens indígenas, autóctones, contaminantes das próprias destilarias (BASSO et al., 1993).

Nesse estudo também se percebeu que a única linhagem capaz de se implantar com sucesso, permanecendo na dorna ao longo da safra, era uma linhagem contaminante (JA-1) previamente isolada do próprio processo industrial. Em outras palavras, nenhuma das linhagens iniciadoras (IZ-1904, TA ou de panificação) possuía atributos de tolerância adequados para suportar os estresses da fermentação industrial. Os resultados indicavam uma sucessão de diferentes linhagens indígenas de *S. cerevisiae* no transcorrer da safra, e que novas linhagens poderiam ser selecionadas dessa biodiversidade natural. Esse trabalho foi publicado numa revista técnica do setor sucroalcooleiro, amplamente distribuída às destilarias brasileiras, privilegiando os produtores que vinham e continuaram financiando as pesquisas conduzidas pela Esalq/USP e pela Fermentec (ambas em Piracicaba-SP), objetivando o estudo das populações de levedura que habitavam as dornas de fermentação.

Com o estímulo financeiro das destilarias (principalmente do estado de São Paulo) e a *expertise* da Fermentec, foi possível realizar o mais extenso programa de seleção de leveduras para aplicação industrial no Brasil. Desse trabalho resultaram linhagens que muito contribuíram para maiores rendimentos industriais e reduções nos custos de produção do etanol, como descrito na próxima seção (BASSO et al., 2008).

8.8 SELEÇÃO DE LINHAGENS DE *S. CEREVISIAE* A PARTIR DA BIODIVERSIDADE ENCONTRADA NAS DESTILARIAS BRASILEIRAS

O monitoramento da dinâmica populacional de leveduras nas dornas de fermentação foi conduzido mediante análises de cariotipagem de amostras mensalmente coletadas de um universo de 20 a 78 destilarias, dependendo da safra (as quais produziam a maior parte do etanol brasileiro), cobrindo um período de 12 safras anuais (1994 a 2006).

Durante esse período, 12.760 isolados foram cariotipados, identificando-se 350 linhagens indígenas *prevalentes* (as quais apresentavam dominância em relação às demais linhagens da dorna) e/ou *persistentes* (que se mantinham presentes ao longo da safra). Essas linhagens foram a seguir submetidas a uma pré-seleção em ensaios de laboratório quanto a características fermentativas desejáveis, sendo que mais de 80% delas foram descartadas em virtude de floculação, formação de espuma e altos teores de açúcares residuais. As linhagens com potencial tecnológico passaram para a fase seguinte de seleção, avaliando-se o rendimento em etanol, formação de glicerol,

viabilidade celular durante ciclos e teores intracelulares de glicogênio e trealose. Dessa etapa de seleção resultaram apenas 14 linhagens indígenas que foram reintroduzidas em várias destilarias (até 54, dependendo da safra). Na Figura 8.12 se observam os distintos perfis eletroforéticos de algumas dessas linhagens, o que permitiu o rastreamento delas ao longo das várias safras. Entre elas, a PE-2 foi monitorada durante 10 anos em diferentes destilarias, de diferentes regiões, com diferentes processos (batelada ou contínuo) e diferentes substratos (caldo/melaço), portanto, experimentando grandes variações.

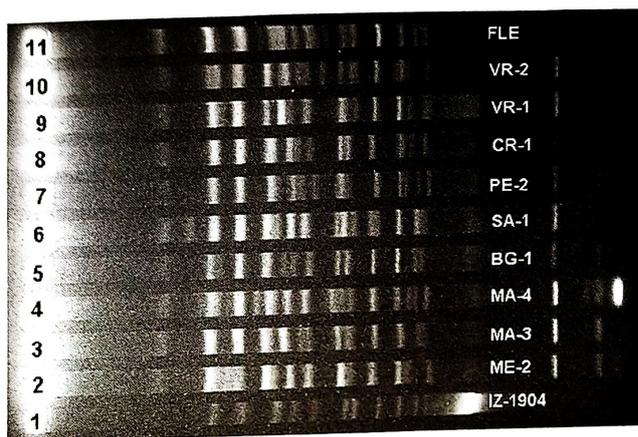


Figura 8.12 Cariotipagem eletroforética (modalidade TAFE) de algumas linhagens introduzidas nos processos industriais. Os perfis únicos para cada linhagem permitiram seu monitoramento ao longo das safras.

Fonte: Basso et al. (2008).

A maior parte das linhagens reintroduzidas não foi capaz de se perpetuar permanentemente nas dornas. Algumas puderam dominar a população por algumas safras, provavelmente por variações em condições do processo, clima, substrato etc. Poucas linhagens foram hábeis em persistir e dominar em muitas destilarias durante muitas safras. As linhagens PE-2 e CAT-1 foram aquelas com as maiores taxas de implantação, sendo encontradas em mais de 50% das destilarias onde foram introduzidas. Essas linhagens apresentavam igualmente alta competitividade em relação às linhagens contaminantes, representando, respectivamente, 45% e 54% da biomassa da dorna durante a safra. Em algumas destilarias essas linhagens representavam a biomassa total do fermentador durante a safra toda (mais de 200 dias de ciclos fermentativos).

Por esses notáveis atributos fermentativos, CAT-1 e PE-2 são as linhagens mais amplamente empregadas na indústria do etanol, representando cerca de 80% das linhagens comercializadas no Brasil na forma de levedura seca ativa (*active dry yeast*). São empregadas anualmente em cerca de 200 destilarias responsáveis pela produção de cerca de 60% do etanol produzido no país. Na Tabela 8.7 se observam parâmetros fisiológicos e tecnológicos superiores da PE-2 em relação à linhagem de panificação, em condições mais drásticas de fermentação com reciclo de células. Tais atributos fisiológicos e de tolerância aos estresses industriais explicam o sucesso de implantação

dessa linhagem, a despeito da pequena quantidade de inóculo normalmente utilizada (Figura 8.13). Mesmo em destilarias onde a linhagem selecionada (PE-2) foi substituída por linhagens indígenas mais robustas, se verificam efeitos benéficos durante o período em que ela habitou o ambiente da fermentação, como no consumo de antiespumante (Figura 8.14).

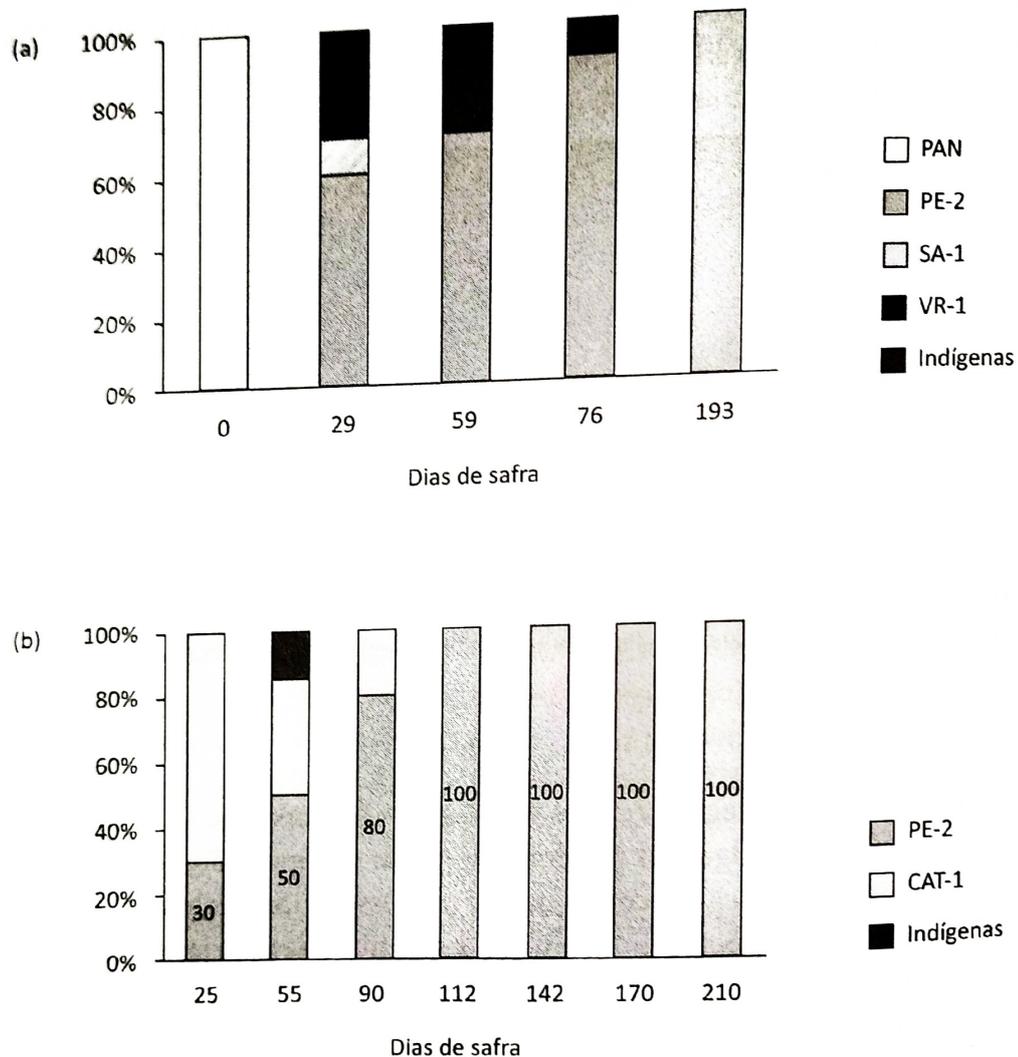


Figura 8.13 Dinâmica populacional ao longo da safra de linhagens introduzidas em processos industriais. A destilaria (a) empregou 2 ton de levedura de panificação acrescida de 500 g de cada linhagem selecionada (PE-2, SA-1 e VR-1); a destilaria (b) iniciou com as linhagens PE-2, CAT-1 e BG-1 (esta não se implantou).

Fonte: Basso et al. (2008).

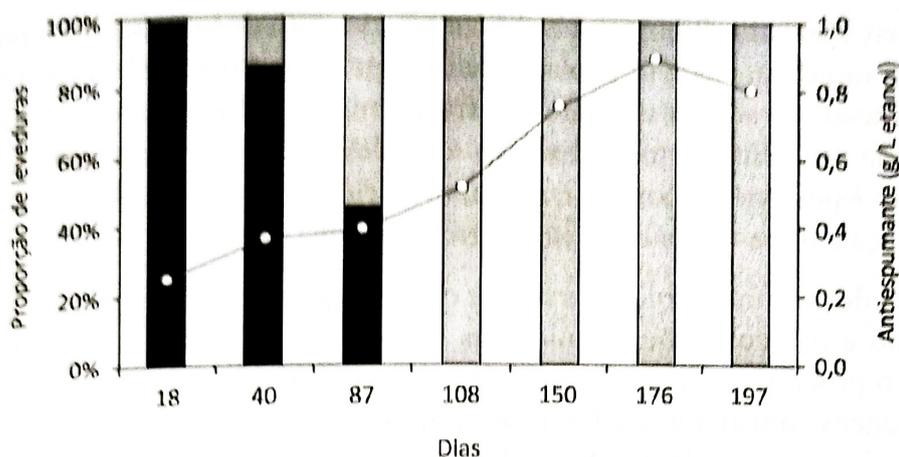


Figura 8.14 A linhagem PE-2 (preta) foi gradativamente substituída por outra linhagem indígena (cinza) com elevada produção de espuma. O consumo de antiespumante foi menor no período em que a linhagem PE-2 se manteve no processo.

Fonte: Basso et al. (2008).

O emprego de outra metodologia molecular em destilaria do Nordeste brasileiro igualmente demonstrou a maior capacidade de implantação de linhagem indígena resgatada de processo industrial (DA SILVA et al., 2005).

Atualmente as destilarias operam em condições muito diferentes daquelas nas quais essas linhagens foram selecionadas, como a elevada proporção de melão no substrato atual, acarretando maiores estresses à levedura. A colheita mecânica da cana também adiciona mais terra e contaminações microbianas na matéria-prima, bem como é provável que maiores quantidades de ponta de cana carreguem mais amido, ácido transaconítico e fenóis no caldo, exigindo medidas mais drásticas de processamento deste. Pouco se sabe sobre os efeitos desses fenóis sobre essas linhagens. Esses fatores, aliados a outros relacionados ao processo fermentativo, permitem supor que as fermentações atuais sejam mais estressantes à levedura quando comparadas com safras passadas. Esses provavelmente são os fatores que estão reduzindo a capacidade de implantação dessas linhagens selecionadas.

Portanto, a busca por novas linhagens ainda é necessária para que o parque alcooleiro do país possa ter material biológico adequado aos seus processos fermentativos, que se mostram cada vez mais peculiares para cada destilaria. Essa situação torna muito difícil a obtenção de uma linhagem que possa ser utilizada por várias destilarias, e o emprego de linhagens adaptadas a cada destilaria surge como alternativa já demonstrada em algumas situações.

Nesse particular, a linhagem PE-2 ainda se mostra muito útil, pois a plasticidade do seu genoma, seu heterotalismo e sua grande capacidade de esporulação com esporos viáveis permitem uma descendência de variantes (novas leveduras, normalmente na forma de rearranjos cromossômicos) com atributos fermentativos variáveis. Entre essas variantes, é possível a seleção daquelas com características mais desejáveis que os parentais, mormente em relação à tolerância aos vários estresses do processo

fermentativo. Particularmente notável é o aparecimento de tais variantes nas próprias destilarias, com capacidade de suplantam a linhagem PE-2 original. O monitoramento da população de leveduras durante a safra permite a seleção dessas variantes mais adaptadas ao ambiente fermentativo de cada destilaria em particular. No entanto, nem sempre é possível demonstrar, em laboratório, que atributo fisiológico responde pela diferença entre a variante e a linhagem original.

Em virtude da enorme biodiversidade de linhagens de *S. cerevisiae* nas dornas de fermentação e das condições fisiológicas específicas impostas à levedura em cada destilaria, o processo industrial brasileiro se constitui num rico manancial de onde novas linhagens com atributos desejáveis podem ser prospectadas. O próprio processo industrial permite, pela condição de reciclo de células, uma evolução adaptativa resultando em linhagens multitolerantes aos vários estresses aos quais estão submetidas (inclusive fatores ainda desconhecidos). Tais linhagens tolerantes não seriam necessariamente boas fermentadoras, mas poderiam ser selecionadas quanto às características fisiológicas e tecnológicas desejáveis, contribuindo para atender às necessidades atuais do parque industrial brasileiro.

8.9 ESTRATÉGIAS DE ENGENHARIA METABÓLICA PARA AUMENTO DA EFICIÊNCIA NA CONVERSÃO DE AÇÚCARES EM ETANOL

Pelo fato de o etanol ser um produto de baixo valor agregado, o fator de conversão de substrato em produto (ou rendimento fermentativo) é um parâmetro que impacta fortemente na economia do processo. No intuito de aumentar a eficiência de conversão dos açúcares do mosto em etanol por estratégias de engenharia metabólica, alguns trabalhos ilustrativos são brevemente apresentados a seguir. Uma excelente revisão sobre o assunto é apresentada por Gombert e Van Maris (2015).

8.9.1 REDUÇÃO NA FORMAÇÃO DE GLICEROL

Conforme discutido na seção anterior, sob condições anaeróbias, o crescimento da levedura *S. cerevisiae* é acompanhado pela formação de glicerol, desviando assim parte do açúcar (fonte de carbono) para a formação desse metabólito e, conseqüentemente, reduzindo a de etanol. Estima-se que cerca de 2-5% do açúcar consumido do mosto industrial acabe sendo convertido em glicerol. A formação de glicerol é essencial para reoxidar o excesso de NADH formado durante o crescimento celular a partir da fonte de carbono, como já anteriormente mencionado.

A deleção dos genes *GPD1* e *GPD2* elimina por completo as duas isoenzimas responsáveis pela formação de glicerol (glicerol 3-fosfato desidrogenase), porém impede o crescimento da levedura em anaerobiose pela impossibilidade de reoxidação das coenzimas reduzidas (NADH). Para contornar esse problema algumas estratégias foram propostas. Numa delas, por uma adequação da força dos promotores dos genes

supracitados, atingiu-se uma redução de 61% na formação de glicerol (PAGLIARDINI et al., 2013). Noutra, buscaram-se metabólitos alternativos ao glicerol como depósito final dos elétrons gerados nas reações de biossíntese da biomassa. Cabe destaque o trabalho realizado por Guadalupe-Medina et al. (2013), que se basearam na conversão teórica de CO_2 e NADH em etanol e água, no qual houve a inserção heteróloga de duas enzimas do *ciclo de Calvin* (fosforibuloquinase e Rubisco) na levedura *S. cerevisiae*. O sucesso na expressão funcional dessas duas enzimas em uma linhagem laboratorial resultou em 90% de redução na formação de glicerol e 10% de aumento no rendimento em etanol.

8.9.2 AUMENTO DO CUSTO ENERGÉTICO DA BIOMASSA

A magnitude do crescimento celular é dependente de nutrientes e da quantidade disponível de energia livre na forma de ATP. Pode-se assumir que o ATP gerado na dissimilação da fonte de carbono é consumido tanto para o crescimento celular como para funções celulares não relativas ao crescimento (como manutenção celular, ciclos fúteis etc.). Tal consumo de ATP é referenciado como o *custo energético da biomassa*, ou seja, a quantidade de ATP necessária para formar uma dada quantidade de biomassa celular. A manipulação desse parâmetro pode resultar em aumentos na conversão de açúcares a etanol e, assim, impactar positivamente o processo industrial de produção de etanol.

Algumas estratégias elegantes explorando a diversidade de rotas metabólicas alternativas já foram apresentadas. Numa delas se altera a estequiometria do transporte de açúcares, expressando-se um transportador de sacarose. Normalmente a levedura *Saccharomyces cerevisiae* utiliza a enzima invertase para hidrolisar a sacarose (açúcar mais abundante do mosto) no ambiente extracelular em glicose e frutose, as quais são posteriormente captadas pelas células por difusão facilitada (sem gasto de energia na forma de ATP). Ao substituir esse mecanismo nativo pela captação de sacarose por meio do cotransporte com prótons e subsequente hidrólise intracelular da sacarose, o gasto extra para remover os prótons assimilados pelo transporte ativo diminui em 25% o rendimento em ATP por molécula de sacarose (de 4 para 3 ATP gerados por molécula de sacarose assimilada). Esse aumento no custo energético da biomassa exigirá que mais sacarose seja dissimilada, resultando em maior formação de etanol. Combinando-se essa estratégia metabólica com evolução, foi possível, em laboratório, aumentar significativamente o rendimento em etanol sobre sacarose (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

Em outro estudo pioneiro, Nissen et al. (2000) propuseram uma alternativa para a reoxidação de NADH, simultaneamente com aumento no consumo de ATP nas reações de biossíntese, objetivando aumentar o rendimento da fermentação. Para tanto, substituíram a enzima glutamato desidrogenase (GDH1) – responsável pela primeira etapa na assimilação de nitrogênio na forma amoniacal (NH_4^+), que é dependente de NADPH – por outras duas enzimas, glutamina sintetase (GLN1) e glutamato sintase (GLT1), que igualmente assimilam o NH_4^+ , porém consumindo ATP

e NADH. Mediante tal estratégia, houve redução de 38% na formação de glicerol e incremento de 10% na produção de etanol. Cabe ressaltar que essa estratégia é dependente de crescimento vigoroso da levedura e de uma fonte de nitrogênio amoniacal, o que nem sempre ocorre nas condições industriais com mosto à base de cana-de-açúcar.

Outra possibilidade de se reduzir a formação líquida de ATP na dissimilação do açúcar é a sobre-expressão de ATPases, ou outras enzimas capazes de hidrolisar ATP, como fosfatases (SEMKIV et al., 2014). Cria-se assim um ciclo fútil de geração e consumo de ATP, similar ao que ocorre quando leveduras são expostas aos ácidos orgânicos fracos (como no caso do ácido benzoico, mencionado no item “Ácidos orgânicos” da Seção 8.4.2).

Cabe ressaltar que tais estratégias baseadas no aumento do custo da biomassa se mostram bem vantajosas em processos com elevadas taxas de crescimento da levedura. No processo industrial brasileiro, com elevada densidade de células e baixa taxa de propagação da levedura, provavelmente o impacto será de menor magnitude. As condições estressantes do processo industrial já impõem uma elevada energia de manutenção que onera o custo energético da biomassa, de modo que a margem para tais estratégias pode ser reduzida.

Nesse particular, é digno de menção um dos raros trabalhos que abordam aspectos fisiológicos de *Saccharomyces cerevisiae* gerando etanol em condições de “crescimento quase zero” (*near-zero growth*). Em tais condições fisiológicas, provavelmente próximas às do processo de algumas destilarias brasileiras, praticamente toda a energia produzida na dissimilação do açúcar é despendida como energia de manutenção da biomassa (BOENDER et al., 2009). Sem sombra de dúvidas uma melhor compreensão do metabolismo e da fisiologia da fermentação nas condições do processo industrial brasileiro redundará em estratégias para uma melhor eficiência na produção de bioetanol.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, H. Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 124, p. 17-22, 1994.
- ALTERTHUM, F.; INGRAM, L. O. Efficient ethanol production from glucose, lactose and xylose by recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 55, p. 1943-1948, 1989.
- ALVES, D. M. G. *Respostas fisiológicas de duas linhagens de Saccharomyces cerevisiae frente ao potássio durante a fermentação alcoólica*. 2000. 118 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2000.
- AMORIM, H. V.; BASSO, L. C. *Processo para aumentar os teores alcoólico do vinho e protéico da levedura após o término da fermentação*. INPI, Pedido de Privilégio de Propriedade Industrial, sob número 9102738, 1991.

- AMORIM, H. V.; LEÃO, R. M. *Fermentação alcoólica - ciência e tecnologia*. Piracicaba: Fermentec, 2005.
- AZMAT, U. et al. Quantitative analysis of the modes of growth inhibition by weak organic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 23, p. 8377-8387, 2012.
- BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Mobilização e armazenamento dos carboidratos de reserva durante a fermentação alcoólica. *Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica - ESALQ/USP*, Piracicaba, v. 8, p. 44-47, 1988.
- BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Consumo de açúcar para a produção de biomassa: comparação entre as leveduras Fleischmann e PE-2. *Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica*, Piracicaba, v. 22, p. 13-17, 2002.
- BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIM, H. V. The antibacterial action of succinic acid produced by yeast during fermentation. *Revista de Microbiologia (Suppl.1)*, v. 28, p. 77-82, 1997.
- BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: BERNARDES, M. A. S. (Ed.). *Biofuel Production - Recent Developments and Prospects*. Croácia: INTECH, 2011. p. 85-100.
- BASSO, L. C. et al. Dominância das leveduras contaminantes sobre as linhagens industriais avaliada pela técnica da cariotipagem. Congresso Nacional da STAB, 5, Águas de São Pedro, 1993. *Anais*, v. 1, p. 246-250, 1993.
- BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol in Brazil. *FEMS Yeast Research*, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.
- BASSO, T. O. et al. Homo- and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 105, n. 1, p. 169-177, 2014.
- BOENDER, L. G. M. et al. Quantitative physiology of *Saccharomyces cerevisiae* at near-zero specific growth rates. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 15, p. 5607-5614, 2009.
- DA SILVA, E. A. et al. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 88, n. 1, p. 13-23, 2005.
- DIAS, M. O. S. et al. Second generation ethanol in Brazil: Can it compete with electricity production? *Bioresource Technology*, v. 102, p. 8964-8971, 2011.
- GALLO, C. R. *Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica*. 1990. 338 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade de Campinas, Campinas, 1990.
- GANCEDO, C.; SERRANO, R. Energy-yielding metabolism. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (Ed.). *The Yeasts*. 2. ed. Oxford: Academic Press, 1989. v. 3. p. 205-259.

- GOMBERT, A. K.; VAN MARIS, A. J. A. Improving conversion yield of fermentable sugars into fuel ethanol in 1st generation yeast-based production processes. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 33, p. 81-86, 2015.
- GUADALUPE-MEDINA, V. et al. Carbon dioxide fixation by Calvin-Cycle enzymes improves ethanol yield in yeast. *Biotechnology for Biofuels*, v. 6, 2013.
- HAHN-HAGERDAL, B. et al. Bioethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, v. 24, p. 549-556, 2006.
- HARRISON, J. S. Food and fodder yeast. In: ROSE, A.; HARRISON, J. S. (Ed.). *The Yeasts*. 2. ed. Oxford: Academic Press Limited, 1993. v. 5. p. 399-433.
- HOHMANN, S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 66, n. 2, p. 300-372, 2002.
- JENNINGS, D. H. Polyol metabolism in fungi. *Advances in Microbial Physiology*, v. 25, p. 149-193, 1984.
- LAGUNAS, R.; GANCEDO, J. M. Reduced pyridine-nucleotides balance in glucose-growing *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, v. 37, p. 90-94, 1973.
- LEITE, R. C. C. *Biomassa, a esperança verde para poucos*. 2005. Disponível em: <<http://www.agrisustentavel.com/san/biomassa.htm>>. Acesso em: 23 mar. 2011.
- LEHNINGER, A. L. *Principles of biochemistry*. New York: Worth Publications, 1982.
- LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U. A. et al. (Ed.). *Biocnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v. 3. p. 1-43.
- LUCENA, B. T. L. et al. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. *BMC Microbiology*, v. 10, p. 298, 2010.
- NISSEN, T. L. et al. Optimization of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of the ammonium assimilation. *Metabolic Engineering*, v. 2, n. 1, p. 69-77, 2000.
- OURA, E. Reaction products of yeast fermentations. *Process Biochemistry*, v. 12, n. 3, p. 644-651, 1977.
- PAGLIARDINI, J. et al. The metabolic costs of improving ethanol yield by reducing glycerol formation capacity under anaerobic conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, v. 12, 2013.
- PAMPULHA, M. E.; LOUREIRO-DIAS, M. C. Energetics of the effect of acetic acid on growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 84, p. 69-72, 2000.
- PAULILLO, S. C. L. *Mobilização do glicogênio e trealose endógenos de leveduras industriais*. 2001. 86 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2001.

- QUINTAS, C. et al. A model of the specific rate inhibition by weak acids in yeast based in energy requirements. *International Journal of Food Microbiology*, v. 100, p. 125-130, 2005.
- SEMKIV, M. V. et al.. Increased ethanol accumulation from glucose via reduction of ATP level in a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing alkaline phosphatase. *BMC Biotechnology*, v. 14, 2014.
- SHAPOURI, H. et al. *Energy calance for the corn-ethanol industry*. 2008. Disponível em: <www.usda.gov/oce/reports/energy/2008Ethanol_June_final.pdf>. Acesso em: 27 fev. 2011.
- STEPHANOPOULOS, G. N.; ARISTIDOU, A. A.; NIELSEN, J. *Metabolic engineering: principles and methodologies*. New York: Academic Press, 1998.
- VERDUYN, C. et al. Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *Journal of General Microbiology*, v. 136, p. 395-403, 1990.
- VOET, D.; VOET, J. G. *Bioquímica*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- WALKER, G. *Yeast physiology and biotechnology*. Chichester: John-Wiley & Sons, 1998.
- WHEALS, A. E. et al. Fuel ethanol after 25 years. *Trends in Biotechnology*, v. 17, n. 12, p. 461-506, 1999.