

# **Efeitos inibitórios do hidroximetilfurfural na fermentação alcoólica: avaliação por Citometria de Fluxo**

**Cátia Vanessa Rodrigues Baptista**

Dissertação para obtenção do grau de mestre em  
**Engenharia Alimentar**

Orientadora: Doutora Maria Teresa Saraiva Lopes da Silva

Coorientadora: Doutora Paula Cristina Lima Varela Passarinho

Coorientadora: Doutora Maria Luísa Louro Martins

## **Júri:**

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com Agregação  
do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutor José Carlos Pereira Roseiro, Investigador Principal do Laboratório Nacional  
de Energia e Geologia, I. P.

Doutora Paula Cristina Lima Varela Passarinho, Investigadora Auxiliar do  
Laboratório Nacional de Energia e Geologia, I.P.

Lisboa, 2013

## Agradecimentos

Agradeço à minha família, amigos e namorado pela ajuda, pela paciência, pelos conselhos e pela confiança. Um obrigado especial ao meu pai pelo apoio imprescindível ao longo de mais uma etapa do meu percurso académico.

O meu muito obrigado à Professora Luísa Louro, em primeiro lugar por me dar a conhecer o tema que me permitiu a realização da tese de mestrado, e pela dedicação e apoio ao longo da realização deste trabalho.

Obrigado à Doutora Paula Passarinho pelo acompanhamento durante o estágio, pelo rigor, pela confiança, pelos conhecimentos transmitidos, pelos materiais de apoio facultados e pela paciência e disponibilidade no esclarecimento de dúvidas.

Agradeço à Doutora Teresa Lopes da Silva pelos conhecimentos transmitidos, pelos materiais de apoio facultados, pela paciência, pelo apoio, pela confiança, pelo otimismo e pela disponibilidade no esclarecimento de dúvidas.

Obrigado à Dona Natércia dos Santos pela ajuda com o material de laboratório e à Dona Graça da Conceição pela simpatia e apoio prestado.

Muito obrigado à Doutora Paula Soares Marques, ao Doutor Alberto Reis, à Ana Paula Batista, à Carole Neves pela simpatia e ajuda.

Agradeço a todos aqueles com quem tive o prazer de trabalhar, especialmente a toda a equipa dos pavilhões G e F do Laboratório Nacional de Energia e Geologia, com quem mais contactei e que me receberam com toda a simpatia, mostrando-se sempre disponíveis e dispostos a apoiar-me, bem como a integrar-me no grupo.

## Resumo

O presente trabalho baseia-se na crescente importância dos biocombustíveis, como o bioetanol na sociedade atual como alternativa ao petróleo. A escassez de informação sobre o efeito de um dos principais inibidores da fermentação alcoólica presente nos hidrolisados lenhocelulósicos, o hidroximetilfurfural (HMF) na fisiologia de uma levedura pertencente ao género *Saccharomyces* (dos mais utilizados) justifica o interesse e a relevância deste estudo, cujo objetivo foi avaliar o efeito do HMF na fisiologia das células de *Saccharomyces carlsbergensis* durante a fermentação alcoólica. Esse estudo foi realizado utilizando a citometria de fluxo multiparamétrica para avaliação do potencial e integridade da membrana citoplasmática, da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e da composição lipídica celular.

Verificou-se que concentrações crescentes de HMF inibem o crescimento celular ( $K_i=0,188$  L/g), embora o efeito na produção de etanol não seja tão drástico (20% de redução até 10 g/L de HMF). Apenas na presença de 15 g/L de HMF se observou inibição total sem crescimento ou produção de etanol significativos.

As análises de citometria de fluxo multiparamétrica revelaram que concentrações crescentes de HMF induzem despolarização e perda de integridade da membrana citoplasmática, bem como produção de ROS e diminuição progressiva dos teores em lípidos intracelulares, polares e neutros.

Palavras-chave: Bioetanol, *Saccharomyces carlsbergensis*, inibição, hidroximetilfurfural, citometria de fluxo multiparamétrica.

## Abstract

The growing importance of biofuels, such as bioethanol, in today's society as an alternative to oil, was the driving force of this work.

The lack of information about the effect of a major alcoholic fermentation inhibitor present in lignocellulosic hydrolysates towards a yeast of the genus *Saccharomyces* (the most widely used in bioethanol production) justifies the interest and relevance of this study that aim at assessing the inhibitory effect of hydroxymethylfurfural (HMF) during alcoholic fermentation by the yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. The physiological effects evaluation was performed by multiparametric flow cytometry by detecting changes in the cytoplasmic membrane, lipids composition and oxygen reactive species (ROS) production.

It was observed that increasing concentrations of HMF inhibit growth ( $K_i = 0.188$  L/g) and ethanol production although in lesser extent in the latter case (20% reduction with 10 g/L). Only in the presence of 15 g/L it was observed neither growth nor ethanol production. The analysis by multiparameter flow cytometry with the use of specific dyes has proved to be an indispensable tool in this study, showing that increasing concentrations of HMF induce loss of cytoplasmic membrane integrity and polarization, production of ROS and changes in the cellular lipid fraction.

Keywords: Bioethanol, *Saccharomyces carlsbergensis*, inhibition, hydroxymethylfurfural, multiparametric flow cytometry.

## Extended Abstract

The growing importance of biofuels in today's society as an alternative to oil, was the driving force for this work. The most produced biofuel in the world is bioethanol, a substitute for gasoline that can be obtained from lignocellulosic biomass. Pretreatment of lignocellulosic biomass generates fermentable sugars as well as other products such as hydroxymethylfurfural with detrimental effect over the fermentation process.

The lack of information about the effect of this inhibitor towards a yeast of the genus *Saccharomyces* (the most widely used in bioethanol production) justified the interest and importance of this study that aimed at assessing the inhibitory effect of hydroxymethylfurfural (HMF) during alcoholic fermentation by the yeast *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 6269. For a more complete analysis of the effect of HMF were monitored pH, growth, glucose and ethanol concentrations as well as secondary metabolites such as acetic acid and glycerol. HMF changes were also quantified. Besides, the physiological effects evaluation was performed by multiparametric flow cytometry by detecting changes in the cytoplasmic membrane, lipids composition and oxygen reactive species (ROS) production.

From the data obtained it was possible to conclude that increasing concentrations of HMF inhibit growth ( $K_i = 0.188$  L/g) and ethanol production although in lesser extent in the latter case (20% reduction with 10 g/L). Only in the presence of 15 g/L it was detected neither growth nor ethanol production.

It was also observed that the yeast present the ability of detoxifying the culture medium by converting HMF into an alcohol derivative occurring the fermentative process along with the detoxification.

As the concentration of hydroxymethylfurfural in lignocellulosic hydrolysates is usually between 0.5 and 11 g/L, this work has showed that the yeast *Saccharomyces carlsbergensis* is highly adequate to be used in fermentation processes for bioethanol industrial production.

The analysis by multiparameter flow cytometry with the use of specific dyes has proved to be an indispensable tool in this study, showing that increasing concentrations of HMF induce loss of cytoplasmic membrane integrity and polarization, accumulation of ROS and changes in the cellular lipid fraction. So, multiparameter flow cytometry, is an analytical technique allowing to obtain results in real time about the physiological changes of the yeast cells that permit to efficiently control the fermentation process.

## Índice

Agradecimentos .....	I
Resumo.....	II
Abstract.....	III
Extended Abstract.....	IV
1 Objetivos do trabalho desenvolvido.....	1
2 Introdução.....	2
2.1 Bioetanol como combustível.....	2
2.2 Processos de Produção de Bioetanol .....	4
2.2.1 Produção de bioetanol a partir de substratos lenhocelulósicos.....	5
2.2.1.1 Pré-tratamento e hidrólise.....	5
2.2.1.2 Fermentação.....	7
2.3 Citometria de Fluxo Multiparamétrica.....	10
3 Materiais e Métodos.....	15
3.1 Microrganismo .....	15
3.2 Meio de cultura .....	15
3.3 Reagentes.....	15
3.4 Pré-inóculos.....	15
3.5 Efeito do HMF na fermentação alcoólica.....	16
3.6 Avaliação das características fisiológicas das células- Citometria de Fluxo.....	17
3.7 Métodos Analíticos.....	18
3.7.1 Quantificação da quantidade de biomassa – reta de calibração DO vs Peso Seco.....	18
3.7.2 Quantificação do etanol produzido – Cromatografia Gasosa.....	19
3.7.3 Quantificação da glucose e HMF consumidos e de alguns subprodutos da fermentação alcoólica - HPLC.....	19
3.8 Determinação de variáveis cinéticas.....	20

3.8.1	Taxa específica de crescimento.....	20
3.8.2	Rendimento em biomassa.....	20
3.8.3	Rendimento em etanol.....	21
3.8.4	Constante de inibição do crescimento em presença do HMF.....	21
4	Resultados e Discussão .....	22
4.1	Curva de crescimento da levedura <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> .....	22
4.2	Efeito do HMF na fermentação alcoólica .....	23
4.2.1	Crescimento da levedura.....	23
4.2.2	Consumo de glucose e produção de etanol .....	28
4.2.3	Evolução do HMF.....	31
4.2.4	Libertação de produtos secundários da fermentação .....	33
4.3	Citometria de Fluxo .....	35
4.3.1	Controlos Prévios .....	36
4.3.2	Análises de citometria de fluxo multiparamétrica .....	39
5	Considerações finais e perspectivas futuras .....	47
6	Referências Bibliográficas .....	49
	Anexo I.....	i
	Anexo II.....	ii
	Anexo III.....	iii

## Índice de Quadros

Quadro 3.1 – Valores máximos para o desvio padrão associados às determinações analíticas.....	17
Quadro 4.1 - Taxa específica de crescimento da levedura <i>S. carlsbergensis</i> em meio de cultura com 50 g/L de glucose (T=30°C, 150 rpm).....	23
Quadro 4.2 – Valores de variáveis relacionadas com a produção de biomassa em ensaios de fermentação por <i>S. carlsbergensis</i> com 50 g/L de glucose e em presença de HMF. ....	25
Quadro 4.3 – Valores para fatores relacionados com o consumo de glucose e a produção de etanol ao longo da fermentação por <i>S. carlsbergensis</i> em presença de HMF e de 50 g/L de glucose (T=30°C; 150 rpm). ....	30
Quadro Anexo I.1 - Reagentes químicos utilizados no trabalho.....	i

## Índice de Figuras








































Figura 2.1– Produção de bioetanol na Europa em 2011e 2012 (adaptado de BP, 2013).....	3
Figura 2.2 – Produção total de bioetanol na Europa de 2009 a 2012 (adaptado de BP, 2013). .....	3
Figura 2.3 - Estrutura molecular do 5-Hidroximetilfurfural (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ). (Fonte: Almeida <i>et al.</i> , 2007).....	6
Figura 2.4 – Configuração de um citómetro de fluxo (adaptado de Lopes da Silva <i>et al.</i> , 2004).....	11
Figura 4.1 - Curva de Crescimento da levedura <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> em meio de cultura com 50 g/L de glucose (T=30°, 150 rpm). ....	22
Figura 4.2 – Crescimento da levedura <i>S. carlsbergensis</i> em 50 g/L de glucose e na presença de HMF:  0 g/L;  0,5 g/L;  1 g/L;  5 g/L;  7,5 g/L;  8,5 g/L;  10 g/L;  15 g/L (T=30°C; 150 rpm) (os resultados apresentados são médias de 2 ou 3 valores com um desvio padrão inferior a 15%).....	24
Figura 4.3 – Efeito inibidor do HMF sobre a taxa específica de crescimento da levedura <i>S.</i> <i>carlsbergensis</i> . ....	26
Figura 4.4 – Variação do pH ao longo da fermentação de 50 g/L de glucose por <i>S.</i> <i>carlsbergensis</i> em presença de HMF:  0 g/L;  0,5 g/L;  1 g/L;  5 g/L;  7,5 g/L;  8,5 g/L;  10 g/L;  15 g/L (T=30°C; 150 rpm) (os resultados apresentados são médias de 2 ou 3 valores com um desvio padrão inferior a 6%).....	27
Figura 4.5 - Consumo de glucose ao longo da fermentação de 50 g/L de glucose por <i>S.carlsbergensis</i> em presença de HMF:  0 g/L;  0,5 g/L;  1 g/L;  5 g/L;  7,5 g/L;  8,5 g/L;  10 g/L;  15 g/L (T=30°C; 150 rpm) (os resultados apresentados são médias de 2 ou 3 valores com um desvio padrão inferior a 15%).....	28
Figura 4.6 - Produção de etanol ao longo da fermentação de 50 g/L de glucose por <i>S.carlsbergensis</i> em presença de HMF:  0 g/L;  0,5 g/L;  1 g/L;  5 g/L;  7,5 g/L;  8,5 g/L;  10 g/L;  15 g/L (T=30°C; 150 rpm) (os resultados apresentados são médias de 2 ou 3 valores com um desvio padrão inferior a 13%).....	29
Figura 4.7 – Variação da concentração de HMF ao longo da fermentação de 50 g/L de glucose por <i>S. carlsbergensis</i> em presença de HMF:  0,5 g/L;  1 g/L;  5 g/L;  7,5 g/L;  8,5 g/L;  10 g/L;  15 g/L (T=30°C; 150 rpm) (os resultados apresentados são médias de 2 ou 3 valores com um desvio padrão inferior a 10%).....	31
Figura 4.8 – Cromatograma de uma amostra de meio após 104 h de fermentação por células de <i>S. carlsbergensis</i> em 50 g/L de glucose e na presença de 10 g/L de HMF. a) Indica o pico do provável metabolito derivado do HMF. ....	32

Figura 4.9 - Variação da concentração do intermediário detetado por HPLC ao longo da fermentação de 50 g/L de glucose por *S.carlsbergensis* em presença de HMF:  $\blacklozenge$  0 g/L;  $\blacklozenge$  0,5 g/L;  $\blacktriangle$  1 g/L;  $\blacktriangle$  5 g/L;  $\blacksquare$  7,5 g/L;  $\blacksquare$  8,5 g/L;  $\circ$  10 g/L;  $\blacklozenge$  15 g/L (T=30°C; 150 rpm).....33

Figura 4.10 - Produção de ácido acético ao longo da fermentação de 50 g/L de glucose por *S.carlsbergensis* em presença de HMF:  $\blacklozenge$  0 g/L;  $\blacklozenge$  0,5 g/L;  $\blacktriangle$  1 g/L;  $\blacktriangle$  5 g/L;  $\blacksquare$  7,5 g/L;  $\blacksquare$  8,5 g/L;  $\circ$  10 g/L;  $\blacklozenge$  15 g/L (T=30°C; 150 rpm) (os resultados apresentados são médias de 2 ou 3 valores com um desvio padrão inferior a 20%). .....34

Figura 4.11 - Produção de glicerol ao longo da fermentação de 50 g/L de glucose por *S.carlsbergensis* em presença de HMF:  $\blacklozenge$  0 g/L;  $\blacklozenge$  0,5 g/L;  $\blacktriangle$  1 g/L;  $\blacktriangle$  5 g/L;  $\blacksquare$  7,5 g/L;  $\blacksquare$  8,5 g/L;  $\circ$  10 g/L;  $\blacklozenge$  15 g/L (T=30°C; 150 rpm) (os resultados apresentados são médias de 2 ou 3 valores com um desvio padrão inferior a 19%). .....35

Figura 4.12 - Gráficos de densidade de células de *S. carlsbergensis* coradas com DiOC<sub>6</sub>(3) e IP. a) Células colhidas em fase exponencial. b) Células colhidas em fase exponencial tratadas com CCCP. c) Células colhidas em fase estacionária. Foram diferenciadas quatro subpopulações: 1) Células com a membrana citoplasmática intacta e polarizada. 2) Células com a membrana citoplasmática intacta mas despolarizada. 3) Células com a membrana citoplasmática permeabilizada.....36

Figura 4.13 – Gráfico de densidade de células de *S. carlsbergensis* coradas com DHR-123. a) Células em fase exponencial. b) Células em fase estacionária. c) Células em fase estacionária avançada. Foram identificadas duas subpopulações: 1) Células que acumularam ROS. 2) Células que não acumularam ROS. ....37

Figura 4.14 – Gráficos de fluorescência de células de *S. carlsbergensis* coradas com Vermelho do Nilo. A. Células em fase estacionária. B. Células em fase estacionária avançada. Foram distinguidas duas subpopulações de lípidos: em FL3 – Lípidos Polares; em FL2 – Lípidos Neutros. Estas duas subpopulações constituem os Lípidos Totais: FL3+FL2.....38

Figura 4.15 - Gráficos de densidade de células de *S. carlsbergensis* coradas com DiOC<sub>6</sub>(3) e IP, colhidas nas fases de latência, exponencial, estacionária e estacionária avançada. Foram diferenciadas três subpopulações: 1) Células com a membrana citoplasmática intacta e polarizada. 2) Células com a membrana citoplasmática intacta, despolarizada. 3) Células com a membrana citoplasmática permeabilizada. ....41

Figura 4.16 - Gráficos de densidade de células de *S. carlsbergensis* coradas com DiOC<sub>6</sub>(3) e IP e colhidas durante o ensaio com 15 g/L de HMF. Foram diferenciadas três subpopulações: 1) Células com a membrana citoplasmática intacta e polarizada. 2) Células com a membrana citoplasmática intacta, despolarizada. 3) Células com a membrana citoplasmática permeabilizada.....42

Figura 4.17 - Gráficos de densidade de células de *S. carlsbergensis* coradas com DHR-123 e colhidas nas fases de latência, exponencial, estacionária e estacionária avançada. Foram

identificadas duas subpopulações: 1) Células que acumularam ROS. 2) Células que não acumularam ROS.....	43
Figura 4.18 - Gráficos de densidade de células de <i>S. carlsbergensis</i> coradas com DHR-123 e colhidas durante o ensaio com 15g/L de HMF. Foram identificadas duas subpopulações: 1) Células que acumularam ROS. 2) Células que não acumularam ROS.....	44
Figura 4.19 – Variação da fluorescência de células de <i>S. carlsbergensis</i> coradas com VN, ao longo de ensaios de fermentação com 50 g/L de glucose e na presença de diferentes concentrações de HMF: Fases de latência (A), exponencial (B), estacionária (C) e estacionária avançada (D). ●-Lípidos Polares, □-Lípidos Neutros, ▲ Lípidos Totais.....	45
Figura 4.20 – Variação da fluorescência de células de <i>S. carlsbergensis</i> coradas com VN, ao longo de ensaios de fermentação com 50 g/L de glucose e na presença de diferentes concentrações de HMF. ●-Lípidos Polares, □-Lípidos Neutros, ▲ Lípidos Totais.....	46
Figura II.1 - Correlação entre densidade ótica a 640 nm e biomassa para suspensões celulares de <i>S. carlsbergensis</i> .....	ii
Figura III.1 - Evolução da concentração de biomassa, da DO, do pH e das concentrações de glucose, de etanol, de ácido acético e de glicerol ao longo da fermentação por <i>S. carlsbergensis</i> na ausência de HMF (T=30°C; 150 rpm). ....	iii
Figura III.2 - Evolução da concentração de biomassa, da DO, do pH e das concentrações de glucose, de etanol, de ácido acético e de glicerol ao longo da fermentação por <i>S. carlsbergensis</i> na presença de 0,5 g/L de HMF (T=30°C; 150 rpm). ....	iv
Figura III.3 - Evolução da concentração de biomassa, da DO, do pH e das concentrações de glucose, de etanol, de ácido acético e de glicerol ao longo da fermentação por <i>S. carlsbergensis</i> na presença de 1 g/L de HMF (T=30°C; 150 rpm). ....	v
Figura III.4 - Evolução da concentração de biomassa, da DO, do pH e das concentrações de glucose, de etanol, de ácido acético e de glicerol ao longo da fermentação por <i>S. carlsbergensis</i> na presença de 5 g/L de HMF (T=30°C; 150 rpm). ....	vi
Figura III.5 - Evolução da concentração de biomassa, da DO, do pH e das concentrações de glucose, de etanol, de ácido acético e de glicerol ao longo da fermentação por <i>S. carlsbergensis</i> na presença de 7,5 g/L de HMF (T=30°C; 150 rpm). ....	vii
Figura III.6 - Evolução da concentração de biomassa, da DO, do pH e das concentrações de glucose, de etanol, de ácido acético e de glicerol ao longo da fermentação por <i>S. carlsbergensis</i> na presença de 8,5 g/L de HMF (T=30°C; 150 rpm). ....	viii
Figura III.7 - Evolução da concentração de biomassa, da DO, do pH e das concentrações de glucose, de etanol, de ácido acético e de glicerol ao longo da fermentação por <i>S. carlsbergensis</i> na presença de 10 g/L de HMF (T=30°C; 150 rpm). ....	ix

Figura III.8 - Evolução da concentração de biomassa, da DO, do pH e das concentrações de glucose, de etanol, de ácido acético e de glicerol ao longo da fermentação por *S. carlsbergensis* na presença de 15 g/L de HMF (T=30°C; 150rpm). .....x

## Lista de Abreviaturas

ATP – Trifosfato de adenosina

BOX – bis-(1,3)-ácido dibutilbarbitúrico-trimetano-oxonol

CCCP - Cianina carbonil m-clorofenilhidrazona

DIOC<sub>6</sub>(3) – Iodeto de 3,3'- dihexiloxacarbocianina

DO – Densidade ótica

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DHR-123 – 123-dihidrorodamina

EtOH<sub>máx</sub> – Concentração máxima de etanol produzido

FSC – Forward scatter (dispersão frontal)

Glu – Concentração de glucose

HMF – 5-Hidroximetilfurfural

HPLC – Cromatografia líquida de alta pressão

IP – Iodeto de propídeo

Ln – Logaritmo natural

PBS – Phosphate buffered saline (tampão fosfato salino)

ROS – Reactive oxygen species (espécies reativas de oxigénio)

SSC – Side scatter (dispersão lateral)

VN – Vermelho de nilo

X – Concentração de biomassa

X<sub>máx</sub> – Concentração máxima de biomassa

$\mu$  - Taxa específica de crescimento

$\mu_{SI}$  – Taxa específica de crescimento no ensaio sem inibidor

Y<sub>X/Glu</sub> – Rendimento em biomassa

Y<sub>EtOH/Glu</sub> – Rendimento em etanol

K<sub>i</sub> – Constante de inibição

## 1 Objetivos do trabalho desenvolvido

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar os efeitos do 5-Hidroximetilfurfural (HMF) na fisiologia das células da levedura *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 6269 durante o processo de fermentação alcoólica para produção de bioetanol. Durante as fermentações alcoólicas que utilizam hidrolisados de compostos lenhocelulósicos nos meios de cultura, as células de levedura são expostas a várias condições adversas, entre as quais a presença do etanol que se vai acumulando no meio e de produtos inibidores (como por exemplo, o HMF), resultantes da hidrólise de materiais lenhocelulósicos, que podem afetar a sua atividade metabólica. A citometria de fluxo permite avaliar, em tempo real (ou seja, durante a evolução da fermentação), o efeito desses inibidores em determinadas funções celulares, entre as quais a integridade da membrana citoplasmática, o potencial da membrana citoplasmática, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e o teor de lípidos polares e neutros, como resposta a condições de stresse. Essa informação, obtida em tempo real, permite otimizar os bioprocessos (à escala de bancada, piloto e industrial) de forma rápida e eficaz.

Para além da análise de citometria de fluxo, foram quantificados o consumo de glucose, a produção de biomassa, de etanol e de alguns subprodutos da fermentação, de forma a estudar-se o efeito de diferentes concentrações de HMF no processo de produção do bioetanol pela levedura *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 6269.

## 2 Introdução

### 2.1 Bioetanol como combustível

Atualmente, a economia mundial encontra-se altamente dependente de fontes de energia fósseis, como o petróleo, o carvão e o gás natural, para a produção de combustível. Tendo em conta o caráter não renovável das reservas fósseis, o aumento do preço dos combustíveis resultante do aumento do consumo dos mesmos e dos custos acrescidos para os extrair, bem como a crescente preocupação com as questões ambientais, nomeadamente a emissão de gases de efeito de estufa, surge a necessidade de procura de fontes de energia renováveis.

Biomassa é a designação atribuída à matéria-prima de origem vegetal ou animal com possibilidade de utilização para produção de energia, sendo esta uma das primeiras fontes de energia utilizadas pelo Homem (Direção Geral de Energia e Geologia, 2012). Os principais constituintes da biomassa utilizada na produção de energia são (Direção Geral de Energia e Geologia, 2012):

- Resíduos florestais, agrícolas e industriais (sobretudo de indústrias agro-alimentares);
- Fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos.

Segundo o Plano de Ação para a Biomassa, divulgado pela Comissão Europeia (Direção Geral de Energia e Geologia, 2012), apenas 4% das necessidades energéticas na União Europeia em 2005 eram satisfeitas a partir da utilização de biomassa, prevendo-se que esta percentagem iria duplicar até 2010 sem desrespeito pelas boas práticas agrícolas e sem afetar significativamente a produção sustentável de biomassa, bem como a produção interna de produtos alimentares. Segundo o Relatório Anual de Biocombustíveis EU-27 de 2011, a Comissão Europeia estima que até 2020, 20% das necessidades energéticas sejam satisfeitas a partir da utilização de biomassa.

A partir da biomassa podem ser produzidos os biocombustíveis, combustíveis líquidos ou gasosos utilizados nos transportes. Um exemplo de biocombustível é o bioetanol, que corresponde ao etanol produzido a partir de biomassa e/ou da fração biodegradável de resíduos. O bioetanol é o biocombustível mais produzido a nível mundial, tendo sido produzidos cerca de 5 milhares de milhões de litros em 2012 (Biofuels Platform, 2012) (fig. 2.2) e a OCDE (Organização para a Cooperação Económica e Desenvolvimento) e a FAO (Organização para a Agricultura e Alimentação) preveem que a produção mundial de bioetanol duplique, no período compreendido entre 2007 e 2017 (Biofuels Platform, 2012).

Em 2011 e 2012 os principais países produtores de bioetanol na Europa eram a Alemanha, França, Espanha e o Reino Unido (fig. 2.1).

De acordo com o Plano de Ação para a Biomassa, divulgado pela Comissão Europeia, a Europa apresenta uma capacidade de produção de bioetanol superior à de biodiesel, por ocupação de uma menor área, o que permite uma redução dos custos através de economias de escala e da existência de margem para aumento das importações a partir de países terceiros.

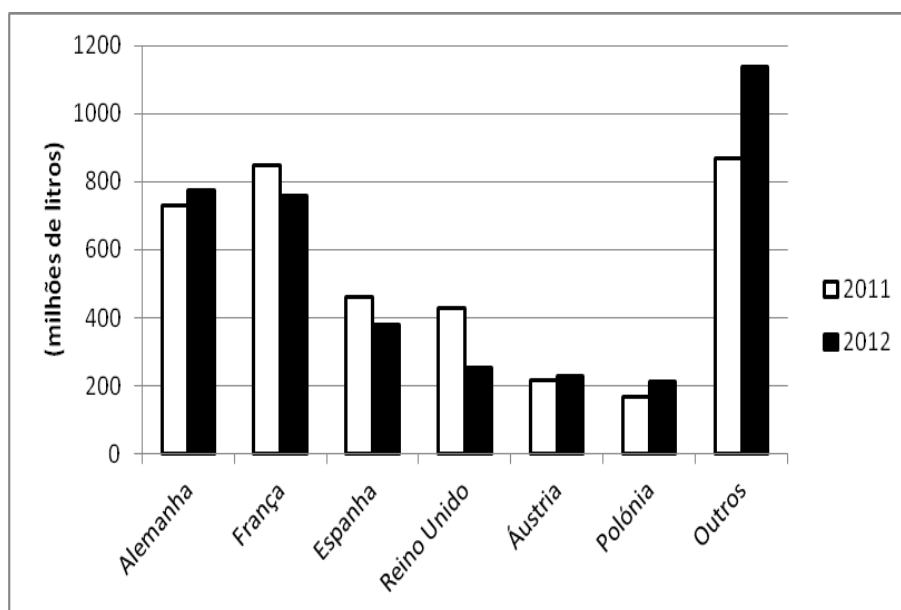


Figura 2.1– Produção de bioetanol na Europa em 2011 e 2012 (adaptado de BP, 2013).

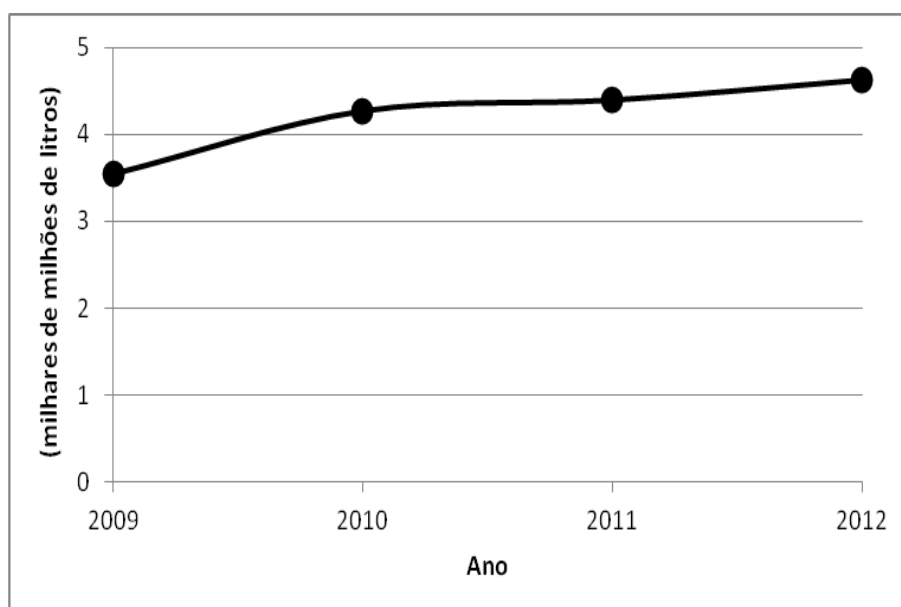


Figura 2.2 – Produção total de bioetanol na Europa de 2009 a 2012 (adaptado de BP, 2013).

Estatísticas mais recentes publicadas pelo Barómetro dos Biocombustíveis indicam que o consumo de biocombustíveis na Europa aumentou 3% entre 2010 e 2011, tendo aumentado também entre 2011 e 2012 e prevendo-se que este valor continue a aumentar nos próximos anos. Nesse sentido, na Diretiva 2009/28/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, foi estabelecida uma percentagem mínima obrigatória de 10% em teor energético, de energias renováveis no setor dos transportes para todos os estados membros.

O bioetanol pode, na sua forma pura, ser misturado com a gasolina e utilizado como combustível. Neste último caso, o bioetanol aumenta o teor em oxigénio da gasolina, de forma a permitir uma melhor oxidação dos hidrocarbonetos e uma diminuição da emissão de gases com efeito de estufa para a atmosfera (Lopes da Silva *et al*, 2012).

Na Alemanha e na França este biocombustível começou a ser utilizado em 1894 e no Brasil a sua utilização teve início em 1925 (Torres, 2010).

## **2.2 Processos de Produção de Bioetanol**

O bioetanol é o bioalcool mais produzido a nível mundial, com uma produção superior à dos outros biocombustíveis líquidos.

O bioetanol de primeira geração é produzido a partir de biomassa contendo açúcares na sua composição, nomeadamente cana-de-açúcar, beterraba sacarina, sorgo sacarino e biomassa amilácea (milho, trigo, cevada). Apesar de economicamente aceite, a utilização de culturas alimentares para a produção de bioetanol não é sustentável, uma vez que estas culturas competem pelo terreno agrícola que pode ser utilizado para culturas destinadas à alimentação humana e animal. Por sua vez, na produção de etanol de segunda geração, a matéria-prima utilizada é a biomassa lenhocelulósica (madeira, palha, gramíneas, resíduos ou subprodutos agrícolas), sendo aproveitadas todas as partes constituintes destes materiais. A utilização de materiais lenhocelulósicos como matéria-prima para a produção de bioetanol, elimina a competitividade com culturas alimentares, existente quando se produz etanol a partir de amido ou açúcares simples. Características dos materiais lenhocelulósicos tais como o baixo custo, a abundância e o carácter renovável dos mesmos, justificam também a sua utilização na produção de bioetanol.

Existe também o bioetanol de terceira geração que utiliza microrganismos como as microalgas como substrato para a fermentação. A utilização destes microrganismos requer a extração prévia dos açúcares acumulados intracelularmente (Miranda, 2011). Contudo, os processos de tratamento da biomassa algal mais promissores em termos económicos são análogos aos já aplicados a matérias-primas convencionais (Miranda, 2011).

## 2.2.1 Produção de bioetanol a partir de substratos lenhocelulósicos

A produção de bioetanol de segunda geração a partir de materiais lenhocelulósicos efetua-se em três etapas principais (Romaní *et al.*, 2012):

- pré-tratamento da matéria-prima (por exemplo, por fracionamento) para facilitar o processamento posterior (obtendo-se simultaneamente em alguns casos, derivados de alto valor).
- hidrólise enzimática da celulose a açúcares.
- conversão biológica dos açúcares a etanol.

### 2.2.1.1 Pré-tratamento e hidrólise

A biomassa lenhocelulósica é, essencialmente constituída por três componentes principais: 30 a 50% de celulose; 15 a 35% de hemicelulose e 10 a 20% de lenhina (Limayem *et al.*, 2012). As moléculas de celulose e hemicelulose encontram-se ligadas às de lenhina através de ligações covalentes, que tornam a estrutura robusta e resistente a qualquer tratamento (Limayem *et al.*, 2012). Por este motivo, é essencial realizar um pré-tratamento cujo objetivo é eliminar a interação entre os principais componentes da parede celular, libertando os açúcares que serão utilizados na produção de etanol (Soccol *et al.*, 2010). Assim sendo, o pré-tratamento é a operação unitária determinante para o sucesso da conversão de materiais lenhocelulósicos em etanol, sendo responsável por grande parte dos custos operacionais.

Durante o pré-tratamento do material lenhocelulósico obtêm-se glúcidos derivados de hemicelulose, quer na fração líquida sob a forma de mono e oligossacáridos, quer no material sólido. Consequentemente, os requisitos para a hidrólise no passo seguinte são variáveis (Gírio *et al.*, 2010).

Podem aplicar-se dois tipos de hidrólise à produção de bioetanol a partir de lenhocelulose: a hidrólise ácida e a hidrólise enzimática, apresentando a hidrólise ácida uma viabilidade económica superior sendo, por isso, a mais utilizada. Contudo, da hidrólise ácida resulta a formação de produtos inibidores da fermentação a partir dos hidrolisados. A hidrólise ácida pode ser realizada com utilização de ácido concentrado a baixa temperatura ou ácido diluído a alta temperatura, sendo o ácido sulfúrico o mais amplamente utilizado. A hidrólise com ácido diluído apresenta como vantagens o menor consumo de ácido e, consequentemente, uma menor corrosão dos equipamentos e menor necessidade de energia para a recuperação do ácido (Qureshi *et al.*, 2011). Contudo, este processo requer a

utilização de temperaturas mais elevadas, libertando-se uma maior quantidade de produtos de degradação. Por sua vez, a hidrólise ácida com utilização de ácido concentrado permite operar a baixas/médias temperaturas, o que resulta na redução dos custos operacionais, formando-se, neste processo, uma menor quantidade de produtos de degradação. Os dois tipos de hidrólise ácida mencionados requerem a remoção/neutralização do ácido antes da fermentação, o que resulta numa elevada quantidade de resíduos.

Em simultâneo com o pré-tratamento da biomassa lenhocelulósica ocorre portanto a formação de produtos de degradação que são inibidores microbianos, isto é produtos que reduzem a taxa de crescimento da levedura e a produção de etanol. Os principais inibidores presentes nos hidrolisados lenhocelulósicos são (Lopes da Silva *et al.*, 2012):

- i. Furanos, como o furfural e o HMF, que afetam a atividade de enzimas glicolíticas e proteínas, danificam as paredes e membranas celulares e inibem a síntese de RNA nos microrganismos. A concentração de derivados de furano nos hidrolisados lenhocelulósicos depende da fonte de biomassa e do tipo de pré-tratamento realizado, podendo variar entre 0,5 e 11 g/L.
- ii. Ácidos fracos, como os ácidos acético e o fórmico que induzem a acumulação de células na fase G1 do ciclo celular (síntese de proteínas) e afetam o potencial da membrana citoplasmática (Freitas *et al.*, 2012).
- iii. Compostos fenólicos, que afetam a integridade da membrana celular.

Um dos inibidores da fermentação alcoólica que se forma a partir da degradação de hexoses (monossacáridos como a manose, a galactose e a glucose), provenientes de hemicelulose e celulose, durante o pré-tratamento e hidrólise da biomassa lenhocelulósica é um aldeído furano designado 5-hidroximetilfurfural. Da sua estrutura molecular fazem parte um anel furano, um grupo funcional aldeído e um álcool (figura 2.3) e o seu aparecimento

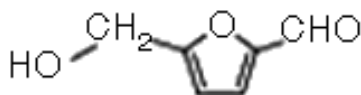


Figura 2.3 - Estrutura molecular do 5-Hidroximetilfurfural ( $C_6H_6O_3$ ). (Fonte: Almeida *et al.*, 2007)

tem sido associado ao processamento térmico. Alguns estudos já realizados demonstram o efeito inibidor do HMF sobre o crescimento celular de *C. beijerinckii* P260 em experiências realizadas com hidrolisado de palha de trigo (Qureshi *et al.*, 2011). Um outro estudo relata o efeito do furfural, HMF e ácido acético em estirpes microbianas indígenas isoladas para produção de bioetanol (Wikandari *et al.*, 2010).

O sucesso da fermentação de hidrolisados lenhocelulósicos depende do equilíbrio entre a formação de compostos inibitórios e a capacidade de desintoxicação, *in vivo*, das células de levedura. Assim sendo, é fundamental perceber o efeito dos compostos inibitórios na fisiologia das células, devendo, para tal, utilizar-se estratégias de controlo da fermentação que não comprometam o rendimento do processo (Lopes da Silva *et al.*, 2012).

Pode ainda recorrer-se à destoxicação dos hidrolisados removendo os inibidores do meio de fermentação (Almeida *et al.*, 2007) por via física, química ou bioquímica. O objetivo deste processo é eliminar o efeito inibitório destes compostos, facilitando a fermentação alcoólica. Contudo, trata-se de um processo dispendioso e que pode resultar na perda de açúcares fermentescíveis (Almeida *et al.*, 2007). Em alternativa a este processo surge o desenvolvimento e utilização de estirpes geneticamente modificadas, com maior tolerância aos inibidores, nomeadamente aos furanos.

### 2.2.1.2 Fermentação

O processo de fermentação engloba a glicólise e o metabolismo anaeróbio do piruvato. De acordo com a espécie e as condições de cultura, as leveduras têm a capacidade de metabolizar uma vasta gama de glúcidos, do tipo mono, di e trissacáridos, predominantemente através da glicólise. O metabolismo dos di e trisacáridos inicia-se com a sua hidrólise por ação de enzimas extracelulares ou por hidrólise intracelular após passagem para o interior da célula através da membrana plasmática (Guimarães, 2008).

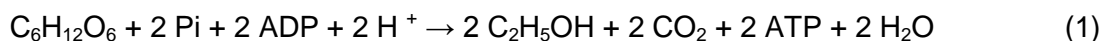
Após hidrólise do material lenhocelulósico (secção 2.2.1.1), os sacáridos necessitam de ser transportados através da membrana celular, variando o sistema de transporte de acordo com o microrganismo e as condições envolventes, nomeadamente o substrato, a concentração do açúcar, a disponibilidade de oxigénio, a temperatura e o pH. A captação do açúcar pode ocorrer através de duas classes de sistemas de transporte: difusão passiva, que não requer energia metabólica, sendo apenas necessário um gradiente de concentração; e transporte ativo, que requer uma elevada quantidade de energia, e que gera um potencial eletroquímico através da membrana citoplasmática (por exemplo, protão-simporte).

As hexoses entram na parte superior da glicólise (no caso das leveduras *E.coli* e *S. cerevisiae*) através de transportadores dependentes ou independentes da fosforilação, seguindo-se o processo de isomerização, no caso da D-manose ou a via *Leloir* no caso da D-galactose (Gírio *et al.*, 2010). A glicólise consiste na conversão de glucose em piruvato

através de uma sequência de reações enzimáticas que ocorrem no citosol, de que resulta a produção de ATP (Guimarães, 2008).

O piruvato formado na glicólise pode originar diferentes produtos consoante as condições e o processo em causa. Em condições anaeróbias o piruvato pode ser convertido em etanol num processo designado fermentação alcoólica ou, em ácido láctico através da fermentação láctica. Na presença de oxigénio o piruvato pode ser utilizado no processo de respiração.

A fermentação alcoólica é traduzida pela seguinte equação:



O principal produto metabólico da fermentação alcoólica é o etanol, cujo aumento de concentração durante a fermentação pode atingir níveis tóxicos resultando na redução do tamanho e viabilidade celulares, na redução da respiração e captação de glucose, na inativação enzimática, na modificação lipídica, na perda da força motriz de protões através da membrana plasmática, bem como no aumento da permeabilidade da membrana e na diminuição do pH citoplasmático (Lopes da Silva *et al.*, 2012).

A síntese do glicerol dá-se no citosol, por ação da enzima glicerol-3-fosfato, a partir do fosfato de di-hidroxiacetona. No entanto, é desejável reduzir a produção de glicerol num processo fermentativo pois compete com a produção de etanol, sendo responsável pelo consumo de cerca de 5% dos açúcares fermentescíveis (Campos, 1998).

Além de etanol e glicerol, as leveduras excretam, frequentemente pequenas quantidades de outros produtos de fermentação, em particular ácidos orgânicos (por exemplo, acético e succínico), álcoois superiores, ésteres e aldeídos (Guimarães, 2008).

A conversão de açúcares em bioetanol é um processo semelhante à produção de vinho ou de cerveja (Lopes da Silva *et al.*, 2012). A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, normalmente utilizada na produção de cerveja e vinho, apresenta uma elevada tolerância à inibição por produtos gerados durante os pré-tratamentos dos materiais lenhocelulósicos, pelo que se tem estudado a utilização deste microrganismo na produção de bioetanol. As condições adversas a que as leveduras são sujeitas durante a fermentação, nomeadamente a limitação de nutrientes, as temperaturas elevadas, a toxicidade do etanol e o stress osmótico (Lopes da Silva *et al.*, 2012), justificam os requisitos exigidos aos microrganismos utilizados no processo fermentativo. Assim sendo, um método de produção de etanol comercialmente viável requer a utilização de um microrganismo que apresente como características (Sarkar *et al.*, 2012):

- Extensa utilização do substrato;
- Elevado rendimento em etanol;

- Elevada produtividade;
- Capacidade para resistir a altas concentrações de etanol e a altas temperaturas;
- Tolerância aos inibidores presentes no hidrolisado;

As leveduras, fungos unicelulares são os microrganismos mais utilizados na produção industrial de bioetanol. São eucariontes inferiores classificados pelos biólogos como pertencentes ao chamado "quinto reino", sendo esta classificação baseada no seu modo de nutrição.

As leveduras mais amplamente utilizadas na fermentação de hidrolisados lenhocelulósicos para produção de etanol são a *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida Shehatae*, *Pichia stipitis*, *Kluyveromyces marxianus* (Limayem *et al.*, 2012).

A levedura *S. cerevisiae* é anaeróbia facultativa, sendo amplamente utilizada na produção de bioetanol baseada em sacarose, amido e celulose. Como vantagens da sua utilização na fermentação alcoólica podem destacar-se a elevada tolerância ao etanol e a inibidores químicos e a capacidade de obtenção de elevados rendimentos em etanol (>90%) (Limayem *et al.*, 2012). No entanto, a utilização deste microrganismo na fermentação alcoólica de substratos lenhocelulósicos apresenta como desvantagens a sua incapacidade de fermentar pentoses como a xilose e a arabinose, bem como de sobreviver às elevadas temperaturas da hidrólise enzimática em processos de fermentação e sacarificação simultâneas (SSF) (Limayem *et al.*, 2012).

*Candida Shehatae* é uma levedura capaz de fermentar xilose (Limayem *et al.*, 2012). Este microrganismo apresenta no entanto uma baixa tolerância ao etanol, obtendo-se baixos rendimentos, além de que requer condições microaerófilas para crescer, bem como baixos níveis de pH para fermentar a xilose (Limayem *et al.*, 2012).

A levedura *Pichia stipitis* é capaz de fermentar hexoses e pentoses como a xilose, a glucose, a galactose e a celobiose, permitindo obter elevados rendimentos em etanol (>82%) (Limayem *et al.*, 2012). Contudo, este microrganismo não tolera concentrações de etanol superiores a 40 g/L, é incapaz de fermentar xilose a baixos níveis de pH, é sensível a inibidores químicos, necessita de ambientes microaerófilos para atingir o seu máximo desempenho e assimila o etanol formado (Limayem *et al.*, 2012).

*Kluyveromyces marxianus* é uma levedura termófila (capaz de crescer a temperaturas acima de 52°C) pelo que a sua utilização na fermentação alcoólica permite reduzir os custos com o arrefecimento, bem como a ocorrência de contaminações. Apesar deste microrganismo ser capaz de fermentar vários açúcares, a fermentação da xilose não é eficiente e obtém-se xilitol como produto. Além disso, esta levedura apresenta uma baixa tolerância ao etanol (Limayem *et al.*, 2012).

### **2.3 Citometria de Fluxo Multiparamétrica**

De forma a otimizar o rendimento de um processo que envolva microrganismos deve monitorizar-se a concentração dos produtos, da biomassa, dos nutrientes e de outros substratos ou subprodutos bem como da viabilidade celular (Lopes da Silva et al., 2004). Durante a produção de bioetanol a avaliação da resposta fisiológica da levedura às condições de stress a que está sujeita permite alterar a estratégia de controlo do processo, tornando possível a redução da proporção de células que não contribuem para a biotransformação (inativas ou mortas), e desta forma o aumento da eficiência da mesma (Lopes da Silva *et al.*, 2004).

A monitorização da proliferação e da viabilidade celular de uma cultura num processo de fermentação é normalmente realizada através de técnicas de microbiologia clássica tais como a leitura espectrofotométrica da densidade ótica, a determinação do peso seco e a contagem de colónias após plaqueamento em agar ou ao microscópio (Lopes da Silva et al., 2004). Contudo, estas técnicas apresentam alguns inconvenientes, nomeadamente o facto de não fornecerem informação sobre o estado fisiológico das células e o elevado tempo associado à obtenção de resultados principalmente na determinação do peso seco e na contagem de colónias em agar, o que impede a utilização destes dados para otimização do processo durante a evolução deste (Lopes da Silva et al., 2004).

Neste contexto utilizou-se a citometria de fluxo neste trabalho porque esta técnica permite avaliar, quase em tempo real, as características fisiológicas de cada célula a nível individual, do ponto de vista qualitativo e quantitativo. Também consegue diferenciar populações de células, com base na sua estrutura e atividade metabólica, fornecendo estas informações alguns minutos após a recolha da amostra. Esta técnica é particularmente útil para avaliar a resposta das células quando sujeitas a condições de stress, como é o caso das fermentações alcoólicas. A citometria de fluxo tem sido amplamente aplicada na indústria alimentar, nomeadamente na monitorização de fermentações alcoólicas durante o processo de fabrico da cerveja e do vinho (Lopes da Silva *et al.*, 2012). Da mesma forma, esta técnica permite monitorizar e otimizar a produção microbiana de bioetanol.

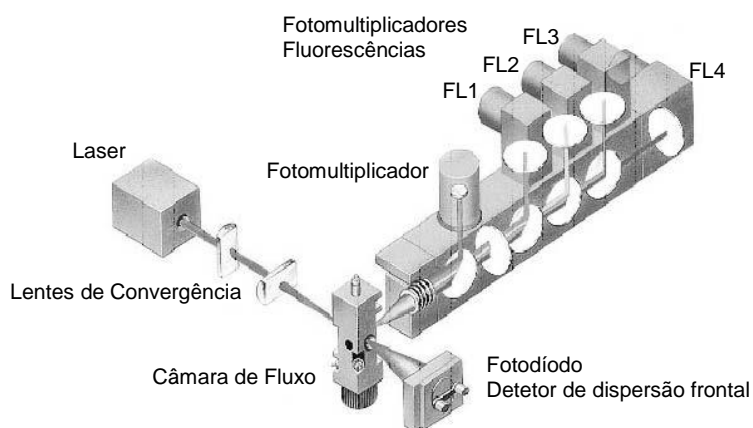


Figura 2.4 – Configuração de um citômetro de fluxo (adaptado de Lopes da Silva *et al.*, 2004).

Um citômetro de fluxo (fig. 2.4) é constituído pelos seguintes elementos (Lopes da Silva *et al.*, 2004):

- Fonte(s) de radiação (lâmpada de mercúrio ou laser);
- Câmara de fluxo;
- Unidades de filtros óticos que permitem selecionar um determinado intervalo de comprimento de onda;
- Fotodíodos ou fotomultiplicadores com capacidade de deteção sensível e possibilidade de processamento dos sinais com interesse;
- Unidade de processamento dos dados recolhidos.

A análise de citometria inicia-se com a injeção no aparelho de uma mistura constituída pela amostra contendo as células e por uma solução tampão salina (fluido de revestimento). Na câmara de fluxo ocorre a passagem individual das células, intercetando uma a uma o feixe de radiação laser, num total que pode atingir 100 000 células em poucos segundos. Nos citómetros de fluxo, a deteção das células tem como base dois tipos de dispersão da radiação (Lopes da Silva *et al.*, 2012):

- Dispersão frontal (FSC), que permite obter informações sobre o tamanho da célula, sendo medida no próprio plano do feixe.
- Dispersão lateral (SSC), que fornece informações acerca da granularidade e complexidade interna das células, sendo medida a 90° em relação ao laser.

Os fotomultiplicadores detetam a radiação fluorescente emitida quer por compostos intracelulares fluorescentes (ex: NADPH) quer por corantes fluorescentes (fluorocromos) que se utilizam para caracterizar determinados compartimentos ou funções celulares (Lopes da Silva *et al.*, 2012). Os fotomultiplicadores amplificam e convertem os sinais luminosos detetados em sinais elétricos, que são posteriormente convertidos em sinais digitais e

acumulados em tempo real em histogramas visíveis no computador e que explicitam as distribuições dos valores da frequência e/ou densidade de cada parâmetro celular (Côrte-Real *et al.*, 2002).

Através da medição dos sinais emitidos em FSC e SSC é possível detetar a presença de contaminantes durante as fermentações alcoólicas, ainda numa fase incipiente, quando ainda é possível eliminar a contaminação sem ser necessário terminar o processo (Lopes da Silva *et al.*, 2012).

O impacto do stress causado nas células microbianas pela presença de compostos inibidores e do etanol em fermentações de hidrolisados lenhocelulósicos tem sido detetado e avaliado por citometria de fluxo, através da utilização de corantes específicos (Freitas *et al.*, 2012). Estes corantes apresentam duas formas distintas de atuação (Lopes da Silva *et al.*, 2012):

- Estabelecimento de ligações específicas com moléculas das células, tais como lípidos ou proteínas;
- Acumulação seletiva nos compartimentos celulares ou alteração das suas propriedades por desencadeamento de reações bioquímicas ao nível do pH intracelular, da polarização e integridade da membrana, e das atividades enzimática e respiratória em resposta a modificações do meio.

Durante a fermentação alcoólica, os locais mais afetados pelo etanol são as membranas celulares. Uma célula metabolicamente ativa possui uma membrana íntegra que a protege do exterior, e que permite o transporte regular ativo e passivo através da mesma, polarizando-a. Um dos parâmetros mais frequentemente utilizados para determinar a atividade metabólica celular durante a fermentação é a integridade e o potencial da membrana. A citometria de fluxo tem sido utilizada para detetar alterações no potencial e na integridade da membrana citoplasmática das leveduras a partir da utilização de corantes fluorescentes, tais como o iodeto de 3,3'- dihexiloxacarbocianina (DIOC<sub>6</sub>(3)) e o iodeto de propídeo (IP) (Freitas *et al.*, 2012). O fluorocromo DiOC<sub>6</sub>(3) permite avaliar o potencial das membranas citoplasmática e mitocondrial que é gerado pela diferença de concentração de iões no interior e no exterior das membranas. Sendo o seu comprimento de onda de emissão de 525 nm, a fluorescência emitida pelo corante poderá ser detetada no canal FL1.

O fluorocromo IP é detetado no canal FL3 e permite avaliar a integridade da membrana citoplasmática, atravessando as células cuja membrana perdeu a integridade e corando-as. A utilização simultânea destes corantes permite a diferenciação entre células intactas com a membrana citoplasmática polarizada, células com a membrana citoplasmática despolarizada e células com a membrana citoplasmática permeabilizada, dependendo de estas serem ou

não coradas por um, por outro ou por ambos os corantes. A despolarização da membrana citoplasmática de uma célula ocorre quando esta é sujeita a determinadas condições de stress, afetando alguns dos seus sistemas de transporte ativo, o que altera a distribuição das cargas no interior e no exterior da membrana. Se as condições de stress se mantiverem sobre as células, a despolarização da membrana citoplasmática antecede a permeabilização da mesma, que corresponde à morte celular. Posteriormente ocorre o colapso da membrana e a perda de integridade da célula, por perda de conteúdo intracelular. As células saudáveis, caracterizadas por conterem uma distribuição de cargas negativas no seu interior e de cargas positivas no exterior são coradas pelo DiOC<sub>6</sub>(3), cuja molécula é carregada positivamente. Numa célula despolarizada existe uma menor distribuição de cargas negativas no interior da membrana, acumulando-se o corante no exterior da membrana, onde existe uma menor distribuição de cargas positivas.

A citometria de fluxo possibilita também a avaliação da resposta da levedura ao ambiente de stress que esta sofre durante a fermentação alcoólica, através da quantificação de subprodutos do metabolismo celular, designadamente as espécies reativas de oxigénio (ROS). Estes subprodutos incluem o peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), o anião superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e o radical hidroxilo (OH<sup>·</sup>), ocorrendo a sua formação nas mitocôndrias e aumentando a mesma de acordo com as condições ambientais, mutações genéticas e idade da célula (Allen *et al.*, 2010). As espécies reativas de oxigénio hidrolizam a 123-dihidrorodamina (DHR-123, corante não fluorescente) a rodamina, esta última emitindo fluorescência a 536 nm. Assim, células coradas com DHR-123 e que emitam fluorescência no comprimento de onda da rodamina, conterão ROS. Este corante tem sido utilizado na deteção de células de *S. carlsbergensis* com ROS durante a fermentação alcoólica (Freitas *et al.*, 2012).

Os lípidos neutros, constituídos por mono, di e triglicéridos são reservas intracelulares de carbono e energia que as células produzem como mecanismo de sobrevivência a condições adversas tais como as presentes nas fermentações durante a produção de bioetanol (Muller *et al.*, 2004). Os lípidos polares, essencialmente constituídos por fosfolípidos são constituintes das membranas celulares. A determinação destes compostos permite compreender o impacto que o ambiente adverso das fermentações alcoólicas tem sobre as membranas celulares. A citometria de fluxo permite quantificar lípidos neutros e polares, utilizando o corante vermelho do nilo. Este corante é excitado a 488 nm e emite fluorescência amarela ou laranja (>528 nm) quando dissolvido em lípidos neutros (>528 nm) e vermelho (>590 nm) quando dissolvido em lípidos polares (Lopes da Silva *et al.*, 2012).

Nos últimos anos têm sido realizados alguns estudos utilizando citometria de fluxo para avaliação do estado fisiológico de células em processos de produção de bioetanol. Num dos

estudos foram utilizados dois tipos de corantes fluorescentes, DHR-123 e bis-(1,3)- ácido dibutilbarbitúrico-trimetano-oxonol (BOX) para caracterização das células de levedura em termos de ROS e de potencial de membrana, respetivamente (Kobayashi *et al.*, 2007).

Apesar de todas as vantagens inerentes à utilização da citometria de fluxo, nomeadamente a rapidez e precisão na análise celular individual, esta é uma técnica ainda pouco utilizada devido à complexidade, custo inicial e custo de manutenção dos citómetros (Lopes da Silva *et al.*, 2012).

## **3 Materiais e Métodos**

### **3.1 *Microrganismo***

A estirpe de levedura utilizada neste trabalho experimental foi a estirpe *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 6269. A cultura foi mantida em rampas com meio sólido de repicagem contendo 20 g/L de glucose, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de peptona e 20 g/L de agar, previamente esterilizado em autoclave (Uniclave 88 A. J. Costa, Portugal). A levedura foi incubada em estufa (Memmert, Alemanha) a 30°C durante um período de 3 dias e as rampas guardadas a 4°C.

### **3.2 *Meio de cultura***

Para os ensaios de crescimento da levedura, o meio de cultura utilizado apresentava a seguinte composição: 50 g/L de glucose, 5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de sulfato de amónio, 5 g/L de dihidrogenofosfato de potássio e 1 g/L de sulfato de magnésio heptahidratado.

Para o estudo do efeito inibitório foi ainda adicionado ao meio de cultura 5-hidroximetilfurfural em concentrações de 0,5, 1, 5, 7,5, 8,5, 10 e 15 g/L.

O meio foi preparado juntando sob assepsia duas frações duplamente concentradas, de glucose e de sais com inibidor, previamente esterilizadas em autoclave durante 15 minutos e cujo valor de pH inicial foi medido (InoLab pH 730, WTW, Alemanha) e ajustado a 5 com ácido sulfúrico (1M), antes de se proceder à esterilização.

### **3.3 *Reagentes***

Os reagentes utilizados neste trabalho estão descritos no quadro I.1 do Anexo I.

### **3.4 *Pré-inóculos***

O crescimento da levedura foi realizado em frascos *erlenmeyer* de 1 L, contendo 500 mL de meio de cultura inoculado com uma ansada retirada de uma rampa, tapados com rolhas de algodão e incubados a 30°C e 150 rpm sob agitação orbital (G25, New Brunswick Scientific, EUA).

Para determinar a duração das fases de crescimento da levedura, nomeadamente a fase exponencial, procedeu-se à construção de uma curva de crescimento monitorizando o crescimento celular através de leituras espectrofotométricas de densidade ótica (DO) a 640 nm (U-2000, Hitachi, Japão) de amostras retiradas ao longo do tempo sob assepsia e diluídas de modo a garantir que as leituras de absorvância obtidas obedecessem à Lei de Lambert-Beer.

### **3.5 Efeito do HMF na fermentação alcoólica**

O efeito do HMF na fermentação alcoólica de *Sacharomyces carlsbergensis* ATCC 6265 foi estudado através da realização de ensaios em frascos *enlenmeyer* de 1 L, contendo 500 mL de meio de cultura e tapados com rolhas de borracha perfuradas com agulhas, a fim de se garantir o desenvolvimento anaeróbio da levedura. O meio foi inoculado com 150 mg/L de levedura (5 mL) proveniente de um pré-inóculo em fase exponencial de crescimento (14 h). As células utilizadas foram previamente recolhidas, concentradas por centrifugação (Biofuge 28 RS Heraeus Sepatech, Alemanha) durante 7 min a 10 000 rpm e 20°C, lavadas por duas vezes com água destilada esterilizada e finalmente ressuspensas num volume adequado para obtenção de uma suspensão com 15 g/L de células de levedura. Após inoculação os frascos foram incubados a 30°C e 150 rpm sob agitação orbital.

Para todos os ensaios foram recolhidas ao longo do tempo amostras para caracterização em termos de biomassa (leitura da densidade ótica a 640 nm e peso seco) e pH e, após centrifugação durante 5 min a 15000 rpm (VWR, Himac CT15E) avaliação da glucose consumida e quantidade de etanol produzido (4.2.2), quantidade de HMF consumida (4.2.3) e variação da quantidade de alguns subprodutos da fermentação (4.2.4). Em vários dos ensaios as análises foram realizadas em duplicado para avaliar o erro associado à determinação (quadro 3.1). No caso da determinação de HMF por HPLC a avaliação foi feita apenas nos ensaios com as concentrações mais elevadas.

Quadro 3.1 – Valores máximos para o desvio padrão associados às determinações analíticas.

Parâmetro	$\sigma_{med}$	$\sigma_{min}$	$\sigma_{max}$
pH	0,01	0,00	0,02
Biomassa (g/L)	0,02	0,00	0,24
Etanol (g/L)	0,07	0,00	0,42
Glucose (g/L)	1,00	0,06	3,61
Glicerol (g/L)	0,08	0,00	0,48
Ácido acético (g/L)	0,03	0,00	0,13
HMF (g/L)	0,40	0,19	0,52

Para cada valor de concentração de inibidor realizaram-se dois ensaios de fermentação, um primeiro cujo objetivo foi determinar os pontos do crescimento da levedura mais adequados à realização de análises de citometria de fluxo e um segundo em que se realizaram essas mesmas análises, a fim de se detetar as alterações ocorridas nas células ao longo do processo de fermentação. Em simultâneo com os ensaios para recolha das amostras a analisar por citometria de fluxo, realizou-se também um ensaio controlo sem inibidor, a fim de comparar o estado fisiológico da levedura na ausência e na presença de HMF.

### ***3.6 Avaliação das características fisiológicas das células- Citometria de Fluxo***

Para avaliação do estado fisiológico das células de levedura durante a fermentação, utilizou-se a citometria de fluxo multiparamétrica (citómetro FACScan Becton Dickinson Instruments, Bélgica) equipado com laser de argon de 488 nm. Assim recolheram-se sob assépsia volumes de 2 mL da cultura a diferentes tempos/fases (latência, exponencial, estacionária e estacionária avançada) do processo fermentativo que foram submetidos, antes de cada análise a um tratamento com ultra-sons (Transonic 660/H, Elma, Bélgica) durante 10 s, de modo a desagregar as células de levedura. Diluíram-se então as amostras com uma solução tampão salina, (PBS), de modo a acertar o número de eventos entre 800-1000/s, adequado à análise citométrica

A monitorização do potencial e da integridade da membrana citoplasmática da levedura foi realizada por coloração simultânea com DiOC<sub>6</sub>(3) e IP.

A concentração da solução-mãe de DiOC<sub>6</sub>(3) era de 10 µg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO) e a concentração final na suspensão celular foi de 10 ng/mL, procedendo-se a uma incubação prévia das amostras durante 10 min no escuro. Uma vez em contacto com as células de levedura, o DiOC<sub>6</sub>(3) requer um tempo de incubação para penetrar na membrana mitocondrial. No contexto do trabalho realizado o DiOC<sub>6</sub>(3) foi utilizado apenas para avaliar o potencial da membrana citoplasmática, pois os ensaios foram realizados em condições anaeróbias pelo que a atividade mitocondrial é desprezável.

A concentração da solução-mãe de IP era de 1 mg/mL em água destilada e a concentração final na suspensão celular foi de 1 µg/mL. Foram também realizadas análises de controlo prévio utilizando o composto cianina carbonil m-clorofenilhidrazona (CCCP) numa concentração de 15 µg/mL para despolarizar as células de levedura, anulando o potencial da membrana citoplasmática por destruição do gradiente de protões (Freitas *et al.*, 2012).

O corante 123-dihidrorodamina (DHR-123) foi utilizado para monitorizar a presença de ROS através da fluorescência emitida pelas células coradas com este fluorocromo. A concentração da solução-mãe de DHR-123 era de 1mM, tendo sido diluída 1:10 sendo a concentração final de 1,4 µg/mL.

A fluorescência emitida pelas células coradas com o corante vermelho do nilo permitiu monitorizar o teor de lípidos da levedura. A concentração da solução-mãe de Vermelho do Nilo era de 0,033 mg/mL em acetona, obtendo-se uma concentração final de 0,3 µg/mL. Seguidamente, a solução foi incubada durante 2 min a 37°C, no escuro.

### **3.7 Métodos Analíticos**

#### **3.7.1 Quantificação da quantidade de biomassa – reta de calibração DO vs Peso Seco**

Para a determinação da quantidade de biomassa seca presente em amostras a partir de leituras espectrofotométricas da densidade ótica a 640 nm, recolheu-se um volume de 50 mL de um pré-inóculo em fase estacionária, que se centrifugou a 18°C e 10000 rpm, durante 7 min. Após lavagem com igual volume de água destilada voltou a centrifugar-se nas mesmas condições. No final, ressuspendeu-se o *pellet* de células de modo a obter uma leitura espectrofotométrica de 0,5 com uma diluição 1:10. A partir dessa suspensão-mãe

procedeu-se à preparação, em balões volumétricos de 100 mL, de novas soluções com diluições de 1:2, 1:3, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30, 1:40, 1:60 e 1:100. Para essas suspensões procedeu-se depois à medição da densidade ótica a 640 nm.

A determinação do peso seco foi realizada filtrando (Whatman GF-C de fibra de vidro) em quadruplicado, sob vácuo, tomas de 5 mL da suspensão-mãe. Os filtros contendo as células foram secos em estufa (Mettler, Alemanha) a 80°C durante a noite e pesados (Mettler Toledo AB204-S), após arrefecimento em exsiccador durante 30 min.

Os resultados obtidos permitiram estabelecer uma regressão linear entre a biomassa seca e a absorvância das suspensões (Anexo II), a partir da qual se determinou a concentração de biomassa nas amostras retiradas durante os ensaios de fermentação.

### **3.7.2 Quantificação do etanol produzido – Cromatografia Gasosa**

A quantidade de etanol produzido durante a fermentação foi determinada por cromatografia gasosa num cromatógrafo (HP 5890, HEWLETT PACKARD, EUA) equipado com injetor *on-column* (coluna de enchimento 4% Carbowax 20M, 1% de ácido trimesílico, 80-120 Carbowax BDA) de 2 m de comprimento e 1/8' de diâmetro interno e detetor de ionização por chama. O gás de arrastamento era hélio e o volume de injeção 1 µL. As temperaturas do detetor, do injetor e da coluna eram, respetivamente, 200, 150 e 110°C. As amostras foram preparadas misturando 0,5 mL de amostra e 0,5 mL de solução com 1,5% (m/v) de 2-propanol (padrão interno). Para a calibração utilizou-se uma solução padrão de etanol com uma concentração de 1,5 % (m/v).

### **3.7.3 Quantificação da glucose e HMF consumidos e de alguns subprodutos da fermentação alcoólica - HPLC**

Para avaliação da variação das concentrações de glucose, HMF, ácido acético e glicerol ao longo da fermentação, realizaram-se análises nas amostras previamente filtradas (filtros de acetato de celulose com porosidade de 0,2 µm e diâmetro de 13 mm) por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) num cromatógrafo Agilent 1100 Series, equipado com uma coluna Aminex HPX-87H (Biorad, Alemanha). A temperatura da coluna era de 50°C, decorrendo a análise a um fluxo de 0,5 mL/min e tendo-se utilizado como eluente uma solução de ácido sulfúrico 5 mM previamente filtrada (filtros com poro de 0,2 µm e diâmetro de 47 mm de polietersulfona hidrofílica – Supoc 200; Pall Life Sciences) e desgaseificada.

Foram também preparadas e injetadas soluções de calibração para cada um dos compostos a analisar, utilizadas como padrões externos.

### **3.8 Determinação de variáveis cinéticas**

#### **3.8.1 Taxa específica de crescimento**

A taxa específica de crescimento ( $\mu$ ), determinada para cada ensaio corresponde ao valor do declive da reta:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t \quad (2)$$

em que  $\ln X$  é logaritmo natural da concentração de biomassa no final da fase exponencial de crescimento,  $\ln X_0$  é o logaritmo natural da concentração de biomassa no início da fase exponencial de crescimento,  $\mu$  é a taxa específica de crescimento e  $t$  o tempo (h). O valor da taxa específica de crescimento obtém-se através do gráfico que representa a variação do logaritmo natural da densidade ótica em função do tempo durante a fase exponencial de crescimento da levedura.

#### **3.8.2 Rendimento em biomassa**

O rendimento em biomassa para cada ensaio realizado foi calculado com base na seguinte equação:

$$Y_{X/Glu} = \frac{X_f - X_0}{Glu_0 - Glu_f} \quad (3)$$

em que  $(X_f - X_0)$  é a diferença entre a concentração final e a concentração de biomassa no tempo 0, expressa em g/L, e  $(Glu_0 - Glu_f)$  é a diferença entre a concentração de glucose no tempo 0 e a concentração final de glucose, expressa em g/L.

### 3.8.3 Rendimento em etanol

Para cada ensaio foi calculado o rendimento em etanol, com base na seguinte equação:

$$Y_{\text{EtOH/Glu}} = \frac{\text{EtOH}_{\text{máx}}}{\text{Glu}_0 - \text{Glu}_f} \quad (4)$$

em que  $\text{EtOH}_{\text{máx}}$  é a concentração máxima de etanol produzida (g/L) e  $(\text{Glu}_0 - \text{Glu}_f)$  é a concentração de glucose consumida (g/L) durante o intervalo de tempo em que se atingiu a concentração máxima de etanol.

### 3.8.4 Constante de inibição do crescimento em presença do HMF

A constante de inibição do crescimento ( $K_i$ ) associada à presença de HMF corresponde ao valor do declive da reta de regressão linear que relaciona os logaritmos naturais da taxa de crescimento ( $\mu$ ) e a concentração de inibidor ( $A$ ) (Freitas *et al.*, 2012):

$$\ln \mu_A = \ln \mu_0 + K_i \times A \quad (5)$$

em que  $\mu_a$  representa a taxa específica de crescimento em presença da concentração  $A$  de inibidor (g/L),  $\mu_0$  a taxa específica de crescimento obtida na ausência de inibidor e  $K_i$  representa a constante de inibição.

## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 Curva de crescimento da levedura *Saccharomyces carlsbergensis*

Este trabalho iniciou-se pela caracterização do crescimento em descontínuo da levedura *Saccharomyces carlsbergensis* (fig. 4.1) em meio com 50 g/L de glucose. Assim sendo, foi realizado um ensaio em que foi medida a absorvância a 640 nm de amostras recolhidas ao longo de quarenta e seis horas, obtendo-se a curva de crescimento da levedura, o que permitiu a determinação da duração da fase exponencial de crescimento. Este procedimento foi essencial para a determinação do intervalo de tempo a que seria oportuno recolher as células para inoculação dos ensaios de fermentação.

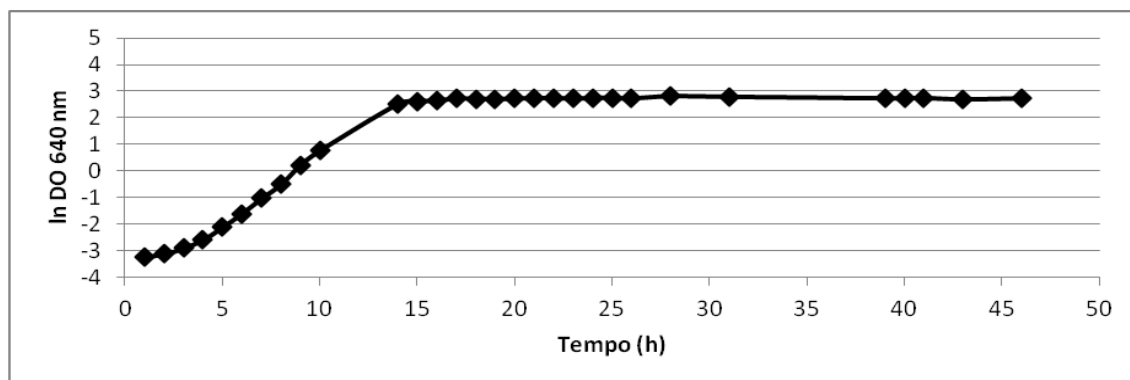


Figura 4.1 - Curva de Crescimento da levedura *Saccharomyces carlsbergensis* em meio de cultura com 50 g/L de glucose (T=30°, 150 rpm).

Com base na curva de crescimento obtida (Fig. 4.1) é possível verificar que a fase exponencial de crescimento da levedura *S. carlsbergensis* se situa entre as 5 e as 12 h após inoculação do meio. Deste modo, as células de levedura utilizadas nos ensaios de fermentação foram sempre colhidas às 12 h de crescimento do pré-inóculo.

A elaboração de uma reta de calibração que relaciona a absorvância a 640 nm das suspensões celulares colhidas ao longo do tempo e o peso seco das mesmas (Anexo II) permitiu quantificar a biomassa produzida durante o ensaio de crescimento e com os dados obtidos, calcular a taxa específica de crescimento da levedura *S. carlsbergensis* (quadro 4.1).

Quadro 4.1 - Taxa específica de crescimento da levedura *S. carlsbergensis* em meio de cultura com 50 g/L de glucose (T=30°C, 150 rpm).

$\mu$ (/h)	Coefficiente de Correlação ( $R^2$ )
0,453	0,997

## 4.2 Efeito do HMF na fermentação alcoólica

### 4.2.1 Crescimento da levedura

Para avaliar o efeito da presença de HMF em processos fermentativos para a produção de etanol pela levedura *S. carlsbergensis*, realizaram-se vários ensaios na presença de concentrações de HMF compreendidas entre 0,5 e 15 g/L (fig. 4.2). O ensaio com 15 g/L de HMF foi monitorizado até às 241h (anexo III). Contudo, não se verificaram alterações significativas ao longo do tempo e por este motivo os gráficos apresentados nesta secção apenas contém pontos até às 120h, permitindo assim uma visualização proporcionada de todos os resultados.

Dado que o processo fermentativo não foi feito em estrita anaerobiose observou-se crescimento da levedura simultaneamente com a produção de etanol. Assim, e através da observação da figura 4.2 é possível concluir que a adição de concentrações crescentes de HMF afetou o crescimento da levedura provocando um aumento da duração das fases de latência e exponencial, com diminuição do valor da taxa de crescimento ( $\mu$ ) e da concentração máxima de biomassa produzida ( $X_{m\acute{a}x}$ ) (fig.4.2; quadro 4.2).

Os ensaios com concentrações de HMF mais elevadas (8,5 e 10 g/L) foram aqueles em que foi mais notório o aumento da duração das fases de latência e exponencial (fig.4.2). Nestes ensaios os teores máximos de biomassa produzida foram atingidos às 47h e 70h, respetivamente, enquanto que nos ensaios com concentrações inferiores de HMF (1 e 5 g/L) estes valores ocorrem cerca das 24h. O ensaio com maior concentração de HMF (15 g/L) foi aquele em que mais se evidenciou o efeito inibitório do HMF, visto que durante as 241h de ensaio a levedura não conseguiu ultrapassar a fase de latência do crescimento (figs. 4.2 e III.8), pelo que não foi possível calcular a taxa específica de crescimento para esta concentração de HMF.

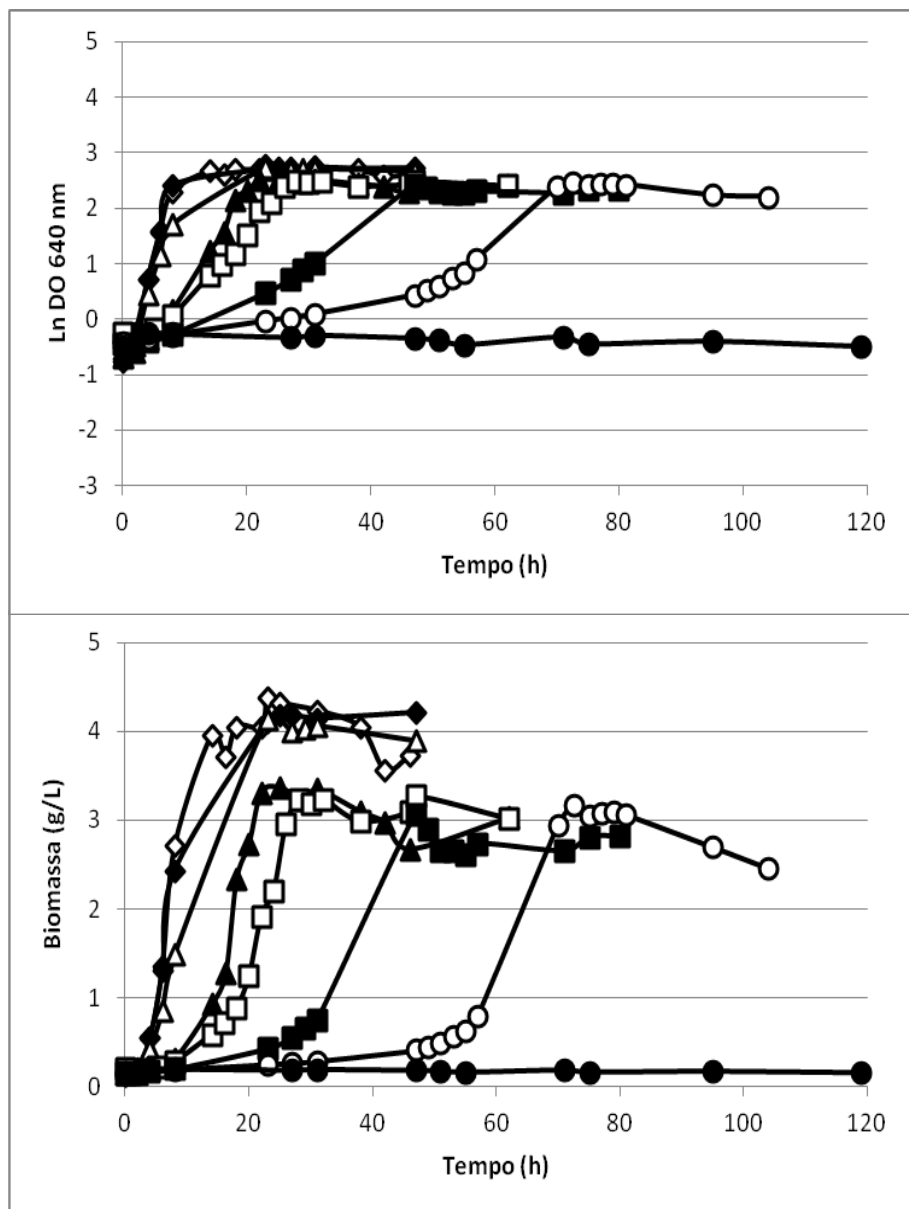


Figura 4.2 – Crescimento da levedura *S. carlsbergensis* em 50 g/L de glucose e na presença de

HMF:  $\diamond$  0 g/L;  $\blacklozenge$  0,5 g/L;  $\triangle$  1 g/L;  $\blacktriangle$  5 g/L;  $\square$  7,5 g/L;  
 $\blacksquare$  8,5 g/L;  $\circ$  10 g/L;  $\bullet$  15 g/L (T=30°C; 150 rpm) (os resultados apresentados são médias de 2 ou 3 valores com um desvio padrão inferior a 15%).

Este resultado está de acordo com o resultado obtido num estudo sobre a resposta fisiológica de leveduras ao furfural e ao HMF (Liu *et al.*, 2004) em que o crescimento de duas culturas de *S. cerevisiae* e *Pichia stipitis* foi completamente inibido a 120 mM (cerca de 15 g/L) de HMF. O mesmo estudo revela ainda que, no caso da levedura *Pichia stipitis* não foi verificado crescimento sequer na presença de 60 mM de HMF (7,56 g/L de HMF), o que sugere que a levedura em questão apresenta uma menor tolerância a este inibidor do que a levedura *S. carlsbergensis*. Um outro estudo sobre a resistência da levedura *S. cerevisiae*

K35 a compostos derivados de lenhocelulose (Lee *et al.*, 2011) relata uma forte inibição do crescimento desta levedura após 12h de incubação, na presença de concentrações de HMF superiores a 3 g/L.

Quadro 4.2 – Valores de variáveis relacionadas com a produção de biomassa em ensaios de fermentação por *S. carlsbergensis* com 50 g/L de glucose e em presença de HMF.

HMF (g/L)	$\mu$ (/h)	$\mu/\mu_{SI}$	$X_{m\acute{a}x}$ (g/L)	$Y_{X/Glu}$ (g/g)	$Y_{X/Glu}/Y_{X/GluSI}$
0	0,449 ± 0,009	1	4,27 ± 0,24	0,080 ± 0,006	-
0,5	0,408 ± 0,005	0,909	4,18 ± 0,09	0,080 ± 0,001	1,003
1	0,360 ± 0,012	0,802	4,08 ± 0,02	0,079 ± 0,001	0,985
5	0,166 ± 0,029	0,370	3,33 ± 0,08	0,063 ± 0,004	0,782
7,5	0,122 ± 0,003	0,272	3,15 ± 0,09	0,058 ± 0,001	0,729
8,5	0,087 ± 0,013	0,194	3,07 ± 0,03	0,059 ± 0,001	0,734
10	0,085 ± 0,010	0,189	2,93 ± 0,22	0,055 ± 0,003	0,687
15	-	-	0,19 ± 0,01	0,009 ± 0,001	0,110

O trabalho de Zhang e colaboradores (Zhang *et al.*, 2012) mostra também que, durante a fermentação para butanol por *Clostridium Acetobutylicum*, a adição de 1-3 g/L de HMF provoca uma diminuição da taxa específica de crescimento.

Já em relação à levedura estudada neste trabalho há estudos realizados recentemente sobre o impacto da presença de outros inibidores, resultantes da hidrólise de resíduos lenhocelulósicos, nas fermentações alcoólicas (Neves *et al.*, 2012; Freitas *et al.*, 2012). Deste modo foi relatada a inibição total do crescimento da levedura na presença de 20 g/L de ácido acético e uma redução acentuada (80%) do crescimento em presença de 20 g/L de ácido fórmico, o que sugere que, em relação a estes dois compostos, o HMF tem um efeito inibidor muito mais acentuado sobre o crescimento da levedura.

O efeito inibitório do HMF sobre as células de levedura traduz-se não só na redução da quantidade de biomassa produzida mas também na diminuição do valor da taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) com o aumento da concentração de inibidor. Aliás, no ensaio com maior concentração de HMF (15 g/L) não foi possível calcular a taxa específica de crescimento, uma vez que a levedura não conseguiu atingir a fase exponencial de crescimento.

Num outro estudo sobre os efeitos fisiológicos do HMF em *S. cerevisiae* em crescimento num meio com 50 g/L de glucose (Taherzadeh *et al.*, 2000) foi relatado que a adição de 4 g/L de HMF provocou a diminuição da taxa de crescimento da levedura de cerca de 32%, valor mais elevado do que o observado neste trabalho para 5 g/L (20%).

A concentração máxima de biomassa produzida diminuiu com o aumento da concentração de HMF, obtendo-se o valor de 4,27 g/L no ensaio sem adição de inibidor. A redução atingiu 32% do valor de biomassa produzida e 80% do valor da taxa específica de crescimento com a adição de 10 g/L de HMF mas, no ensaio com maior concentração de inibidor (15 g/L) já não houve produção de biomassa. Apesar do maior efeito inibitório revelado pelo HMF sobre a taxa específica de crescimento, os valores do rendimento em biomassa obtidos nos ensaios com adição de HMF foram superiores aos obtidos nos trabalhos com adição de ácido acético (Freitas *et al.*, 2012) e aos obtidos com adição de ácido fórmico (Neves *et al.*, 2012).

Como consequência da redução observada no teor de biomassa produzido, o rendimento em biomassa também decresceu com o aumento da concentração de HMF. Este efeito inibitório do HMF sobre o crescimento da levedura pode ser explicado pelo redirecionamento da energia das células de levedura para a reparação dos danos causados pela presença do inibidor, bem como pela diminuição dos níveis intracelulares de ATP e NAD(P)H (Almeida *et al.*, 2007).

O efeito da inibição pelo HMF pode avaliar-se calculando o valor da constante de inibição,  $K_i$ , a partir da relação linear entre a taxa específica de crescimento da levedura *S. carlsbergensis* e a concentração de HMF (fig. 4.3).

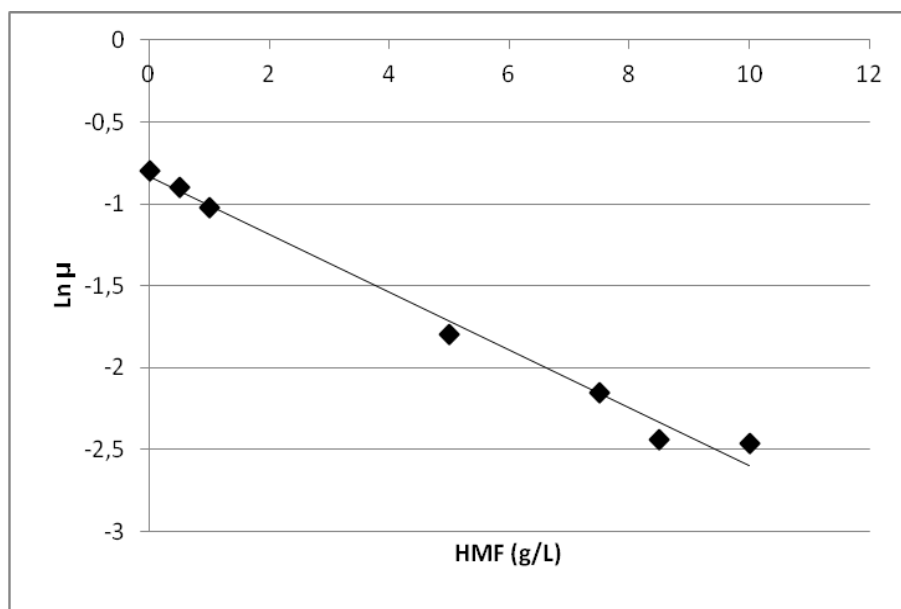


Figura 4.3 – Efeito inibidor do HMF sobre a taxa específica de crescimento da levedura *S. carlsbergensis*.

O valor obtido para a constante de inibição do HMF foi de 0,188 L/g ( $R^2 = 0,997$ ). Comparando este valor com os obtidos em trabalhos realizados recentemente (Freitas *et al*, 2012 e Neves *et al*, 2012) com a mesma levedura e outros inibidores, conclui-se que a constante de inibição do HMF é superior à obtida para o ácido acético (0,121 L/g) e para o ácido fórmico (0,13 L/g). Estes resultados mostram que, para a levedura *S. carlsbergensis*, o carácter inibidor do HMF é superior ao do ácido acético e do ácido fórmico apesar do maior tamanho da molécula de HMF que implica maior dificuldade de difusão e menor número de moles numa dada concentração.

Na figura 4.4 é possível observar a variação do pH do meio de fermentação, durante os ensaios na presença de concentrações crescentes de HMF. No início de cada ensaio o valor de pH do meio de cultura dos ensaios com inibidor foi ajustado a 5 (pH do meio sem inibidor), com uma solução concentrada de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ).

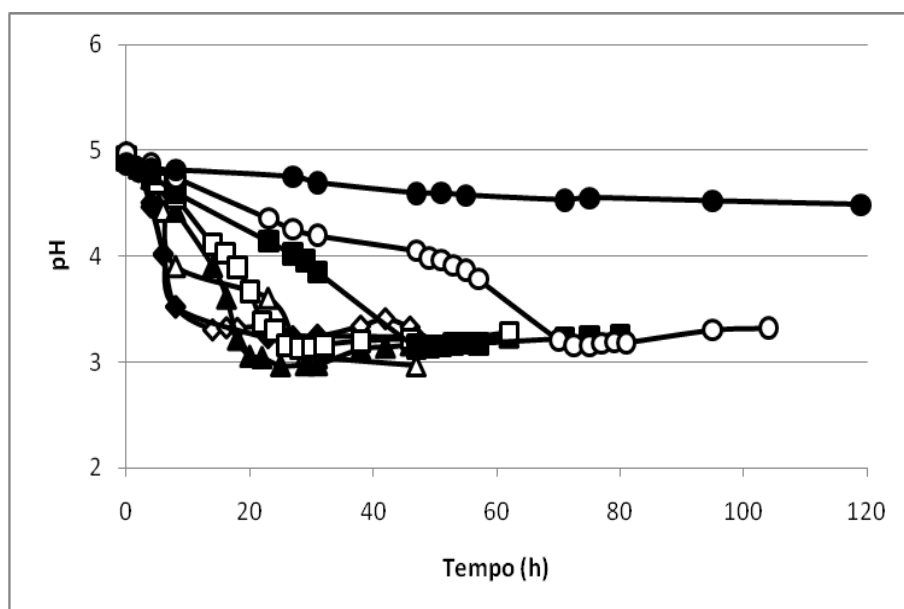


Figura 4.4 – Variação do pH ao longo da fermentação de 50 g/L de glucose por *S. carlsbergensis* em presença de HMF:  $\diamond$  0 g/L;  $\blacklozenge$  0,5 g/L;  $\blacktriangle$  1 g/L;  $\blacktriangle$  5 g/L;  $\square$  7,5 g/L;  $\blacksquare$  8,5 g/L;  $\circ$  10 g/L;  $\bullet$  15 g/L ( $T=30^{\circ}C$ ; 150 rpm) (os resultados apresentados são médias de 2 ou 3 valores com um desvio padrão inferior a 6%).

Através da observação do gráfico da figura 4.4 é possível concluir que o pH diminuiu ao longo do tempo de fermentação, tendo atingido um pH final de cerca de 3,2 em praticamente todos os ensaios. Apenas no ensaio com adição de 15 g/L de HMF se verificou que devido à reduzida ação microbiana o pH se manteve praticamente constante, atingindo o mínimo de 4,5 após 241 h.

A redução dos valores de pH ao longo dos ensaios de fermentação justifica-se pela maior produção de biomassa e, conseqüentemente pela maior produção simultânea de metabolitos ácidos.

#### 4.2.2 Consumo de glicose e produção de etanol

A levedura *S. carlsbergensis* utiliza a glicose como fonte de carbono, convertendo-a em etanol, no processo de fermentação. Por este motivo, o estudo da influência do HMF na fermentação alcoólica por esta levedura teve em conta a evolução da quantidade de glicose consumida e de etanol produzido que constam nas figuras 4.5 e 4.6.

Inicialmente tentou usar-se o método do ácido e DNS para determinação da glicose consumida. Contudo, ao longo do tempo concluiu-se que o HMF presente nas amostras emitia sinal no método de DNS, influenciando os resultados obtidos. Por este motivo, a concentração de glicose das amostras ao longo do tempo de fermentação foi obtida através de análises por HPLC.

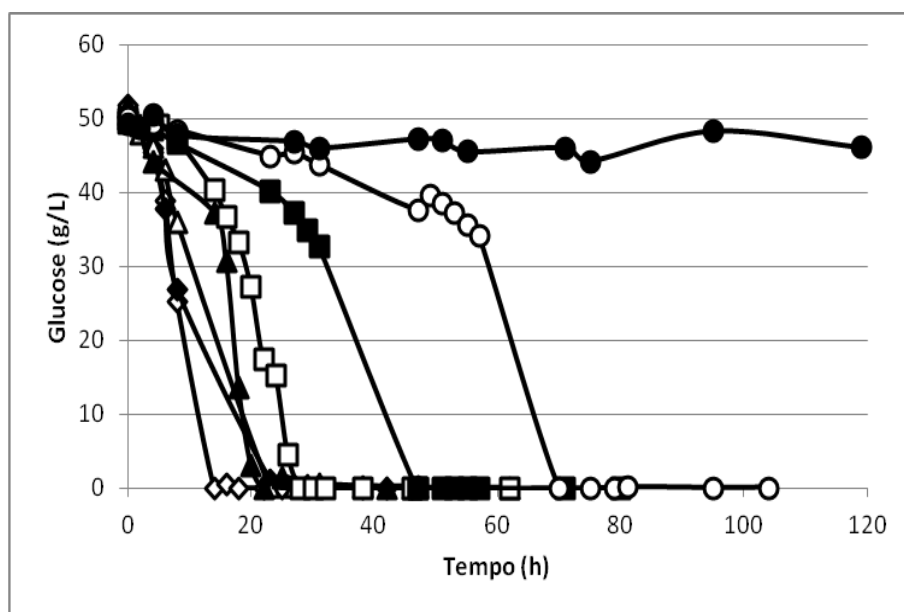


Figura 4.5 - Consumo de glicose ao longo da fermentação de 50 g/L de glicose por *S. carlsbergensis* em presença de HMF:  $\diamond$  0 g/L;  $\blacklozenge$  0,5 g/L;  $\triangle$  1 g/L;  $\blacktriangle$  5 g/L;  $\square$  7,5 g/L;  $\blacksquare$  8,5 g/L;  $\circ$  10 g/L;  $\bullet$  15 g/L (T=30°C; 150 rpm) (os resultados apresentados são médias de 2 ou 3 valores com um desvio padrão inferior a 15%).

No gráfico da figura 4.5 é possível observar que a glicose foi quase totalmente consumida em praticamente todos os ensaios, sendo a concentração de glicose residual geralmente inferior a 0,5 g/L (quadro 4.3). Estes resultados estão de acordo com os obtidos

num trabalho sobre os efeitos fisiológicos do HMF em *S. cerevisiae* que mesmo após adição de 4 g/L de HMF a concentração de glucose no meio diminuiu até consumo total (Taherzadeh *et al.*, 2000). Resultados idênticos foram relatados num outro estudo baseado no efeito do furfural, HMF e ácido acético em microrganismos endógenos isolados para produção de bioetanol (Wikandari *et al.*, 2010), em se observou o consumo completo da glucose por uma levedura isolada em Bekonang, na presença de concentrações de HMF superiores a 0,5 g/L.

Neste trabalho, apenas no ensaio com 15 g/L de HMF não se verificou consumo significativo de glucose, permanecendo no meio ao fim de 120h de fermentação uma concentração de glucose residual de 46 g/L e 45 g/L (figs. 4.5 e III.8).

Nos ensaios com maiores concentrações de HMF (8,5 e 10 g/L) a glucose demorou mais tempo a ser consumida (cerca de 47 e 70h, respetivamente) pois foi também mais alargada a fase de latência.

No gráfico da figura 4.6 é possível observar a evolução da concentração de etanol ao longo do processo fermentativo na presença de concentrações crescentes de HMF.

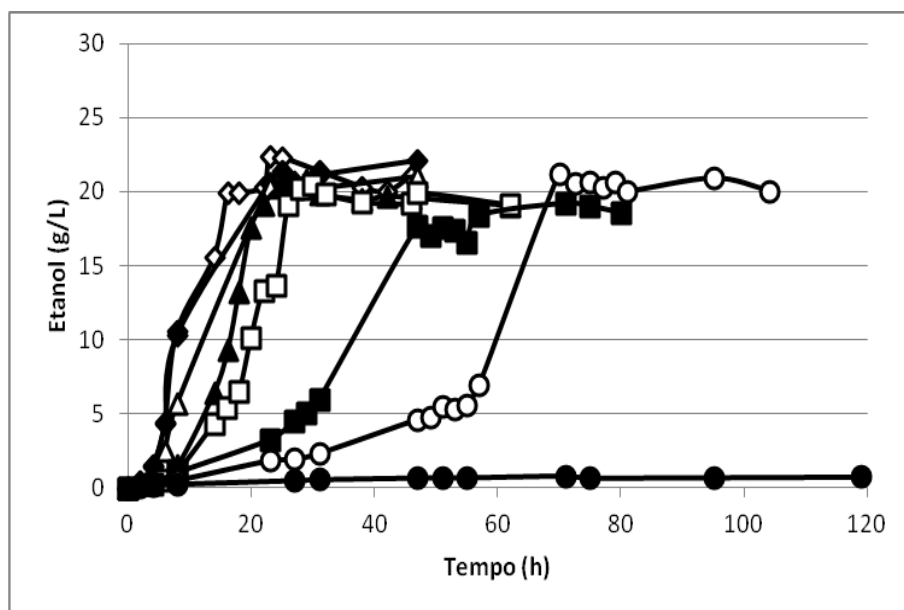


Figura 4.6 - Produção de etanol ao longo da fermentação de 50 g/L de glucose por *S. carlsbergensis* em presença de HMF:  $\diamond$  0 g/L;  $\blacklozenge$  0,5 g/L;  $\blacktriangle$  1 g/L;  $\blacktriangle$  5 g/L;  $\square$  7,5 g/L;  $\blacksquare$  8,5 g/L;  $\circ$  10 g/L;  $\bullet$  15 g/L (T=30°C; 150 rpm) (os resultados apresentados são médias de 2 ou 3 valores com um desvio padrão inferior a 13%).

Tal como esperado pelo consumo de glucose, em praticamente todos os ensaios se observou produção de etanol, sendo os valores finais obtidos relativamente próximos e da ordem de 20 g/L (quadro 4.3). Comparando a concentração máxima de etanol obtida no ensaio sem adição de inibidor (21,9 g/L), conclui-se que foi superior às concentrações em

etanol obtidas para os restantes ensaios. Estes resultados sugerem que existe um evidente efeito inibidor pelo HMF embora não muito pronunciado até concentrações de 10 g/L em HMF.

Uma possível explicação para estes resultados pode ser o facto da levedura necessitar de maiores quantidades de energia para manter o seu metabolismo na presença de HMF, facto já relatado num trabalho publicado por Taherzadeh e colegas (Taherzadeh *et al.*, 2000).

Tal como se constatou para a concentração máxima de etanol produzido, também os valores obtidos para o rendimento em etanol são bastante semelhantes em todos os ensaios, excepto no ensaio com 15 g/L de HMF, não se observando reduções superiores a 15%. O menor valor de rendimento em etanol obtido no ensaio com 15 g/L de HMF (0,173 g/g) corresponde ao esperado, tendo em conta que o crescimento é quase totalmente inibido na presença desta concentração de inibidor. Os efeitos de inibição dos furanos sobre a fermentação alcoólica podem explicar-se, segundo alguns autores, pela inibição direta das enzimas álcool desidrogenase (ADH), piruvato desidrogenase (PDH) e aldeído desidrogenase (ALDH) (Almeida *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2011).

No ensaio sem inibidor obteve-se o maior nível de etanol que, contudo, correspondeu apenas a 83% do máximo teórico (0,51 g de etanol por grama de glucose), pois parte da glucose consumida pela levedura não foi convertida em etanol mas em biomassa.

Quadro 4.3 – Valores para fatores relacionados com o consumo de glucose e a produção de etanol ao longo da fermentação por *S. carlsbergensis* em presença de HMF e de 50 g/L de glucose (T=30°C; 150 rpm).

HMF (g/L)	Glu <sub>res</sub> (g/L)	EtOH <sub>máx</sub> (g/L)	Y <sub>EtOH/Glu</sub> (g/g)	Y <sub>EtOH/Glu</sub> /Y <sub>EtOH/GluSI</sub>
0	0,12 ± 0,11	21,93 ± 2,86	0,421 ± 0,064	1,00
0,5	0,38 ± 0,47	21,65 ± 1,28	0,415 ± 0,009	0,99
1	0,19 ± 0,16	20,54 ± 1,86	0,411 ± 0,029	0,98
5	0,57 ± 0,88	19,54 ± 0,79	0,376 ± 0,030	0,89
7,5	0,06 ± 0,05	20,00 ± 0,45	0,400 ± 0,011	0,95
8,5	0,08 ± 0,10	17,68 ± 0,96	0,358 ± 0,019	0,85
10	0,06 ± 0,06	21,43 ± 0,79	0,405 ± 0,028	0,96
15	45,93 ± 1,32	0,84 ± 0,02	0,173 ± 0,173	0,41

Comparando estes resultados com os obtidos no estudo já referido em que se utilizou a mesma levedura e ácido acético como inibidor (Freitas *et al.*, 2012), conclui-se que o HMF exerce um maior efeito inibidor da produção de etanol, pois os valores máximos de etanol

produzido e de rendimento em etanol obtidos foram, em geral inferiores aos obtidos com o ácido acético.

Tendo em conta que a concentração de HMF nos hidrolisados lenhocelulósicos varia entre 0,5 e 11 g/L (Lopes da Silva *et al.*, 2012) e, com base nos resultados obtidos, nomeadamente na capacidade de crescimento e produção de etanol da levedura *S. carlsbergensis* na presença de 10 g/L de HMF é possível sugerir que a levedura *S. carlsbergensis* ATCC 6269 é adequada à fermentação alcoólica para produção de bioetanol a partir de materiais lenhocelulósicos.

### 4.2.3 Evolução do HMF

A quantificação do HMF existente no meio ao longo da fermentação (fig. 4.7) justifica-se por este composto, principal objeto de estudo deste trabalho, exercer um efeito inibidor da fermentação alcoólica e ser importante avaliar uma eventual variação ao longo do processo.

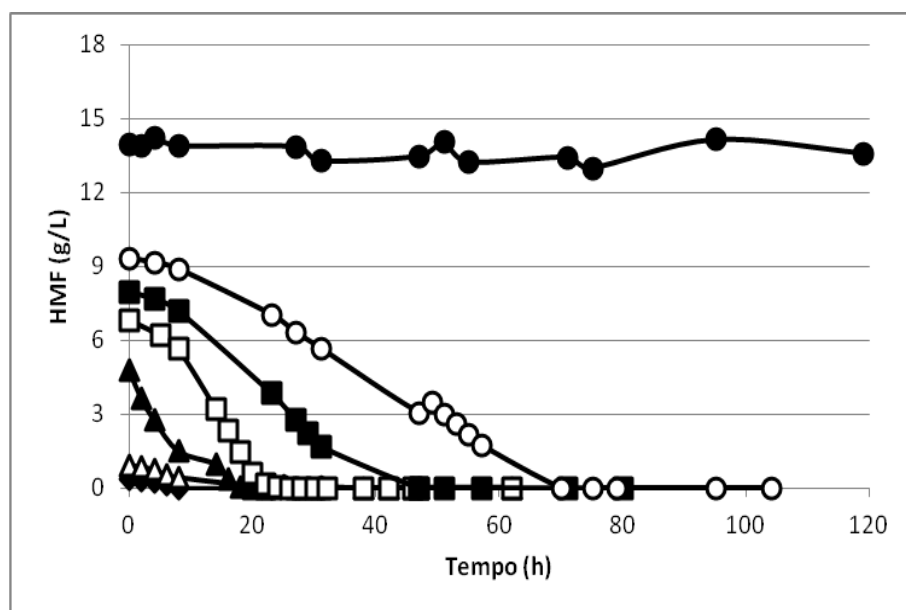


Figura 4.7 – Variação da concentração de HMF ao longo da fermentação de 50 g/L de glucose por *S. carlsbergensis* em presença de HMF: —●— 0,5 g/L; —△— 1 g/L; —▲— 5 g/L; —□— 7,5 g/L; —■— 8,5 g/L; —○— 10 g/L; —●— 15 g/L (T=30°C; 150 rpm) (os resultados apresentados são médias de 2 ou 3 valores com um desvio padrão inferior a 10%).

De acordo com o gráfico da figura 4.7 é possível observar que a concentração de HMF decresce para valores muito próximos de zero em quase todos os ensaios realizados, excepto no ensaio com 15 g/L de HMF, em que esta concentração se mantém elevada ao

longo do tempo de fermentação (~13 g/L). Estes resultados sugerem que o HMF poderá ter sido metabolizado pela levedura. Num trabalho elaborado por Liu e colaboradores (Liu *et al.*, 2004) sobre a resposta adaptativa das leveduras ao furfural e ao HMF foi identificado o aparecimento no meio de fermentação de um metabolito resultante da conversão do HMF pela levedura *S. cerevisiae*. Este composto é um derivado álcool do HMF, o 2,5-bis-hidroximetilfurano, cuja fórmula é  $C_6H_8O_3$ , e que resulta da redução do anel furano do HMF pelas leveduras. Tal como neste caso, foram já publicados alguns trabalhos que demonstram a capacidade de as leveduras metabolizarem o HMF, exercendo assim uma destoxificação do meio (Liu *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2007). Provavelmente, por esta razão se observa, comparando as figuras 4.6 a 4.7, que apenas após uma redução da concentração do HMF a cerca de metade se inicia o processo de fermentação, atingindo-se o seu final algum tempo depois do esgotamento do HMF.

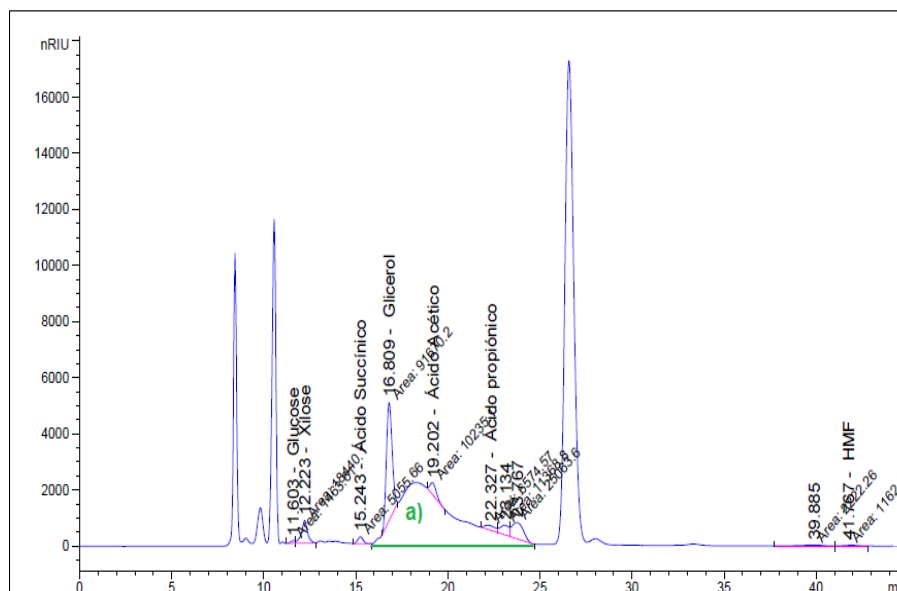


Figura 4.8 – Cromatograma de uma amostra de meio após 104 h de fermentação por células de *S. carlsbergensis* em 50 g/L de glucose e na presença de 10 g/L de HMF. a) Indica o pico do provável metabolito derivado do HMF.

Ao longo deste trabalho foi detetada, na realidade, nas análises por HPLC das amostras de fermentação na presença de concentrações crescentes de HMF, a presença de um pico estranho na zona dos tempos de retenção do ácido acético e do glicerol (fig. 4.8, a)). Inicialmente atribuiu-se este pico à presença de um metabolito desconhecido. Contudo, analisando a sua evolução ao longo dos ensaios de fermentação (fig. 4.9) em paralelo com a do desaparecimento do HMF (fig. 4.7), e em comparação com o descrito pelos autores acima referidos, supõe-se que este pico corresponda à presença do derivado 2,5-bis-hidroximetilfurano.

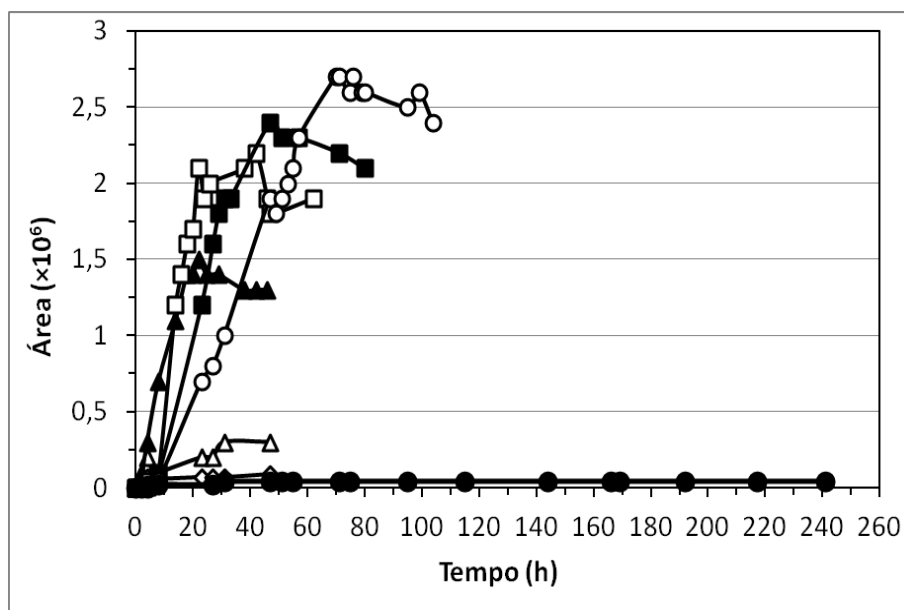


Figura 4.9 - Variação da concentração do intermediário detetado por HPLC ao longo da fermentação de 50 g/L de glicose por *S. carlsbergensis* em presença de HMF:

—◇— 0 g/L; —●— 0,5 g/L; —△— 1 g/L; —▲— 5 g/L; —□— 7,5 g/L; —■— 8,5 g/L;  
—○— 10 g/L; —●— 15 g/L (T=30°C; 150 rpm).

A partir do gráfico da figura 4.9 observa-se que a formação do metabolito evolui no sentido contrário ao do desaparecimento do HMF do meio de fermentação (fig. 4.7) tal como observado no estudo de Liu e colaboradores sobre a biotransformação de HMF por estirpes etanológicas de leveduras (Liu *et al.*, 2005). É possível afirmar que quanto maior a concentração inicial de HMF maior a área de pico gerada, à exceção do ensaio HMF 15 g/L em que a área detetada era muito reduzida por não ter havido capacidade da levedura para metabolizar o HMF. Deste modo, a maior área do pico detetada corresponde ao ensaio HMF 10 g/L, sendo esta área superior a  $2,5 \times 10^6$ .

No trabalho realizado por Liu e colaboradores (Liu *et al.*, 2004) os autores sugerem ainda que a acumulação deste metabolito biotransformado será menos tóxica para as leveduras do que o HMF, com base na aceleração do processo fermentativo e da taxa de crescimento da levedura associadas à conversão do HMF.

#### 4.2.4 Libertação de produtos secundários da fermentação

A partir das análises de HPLC foi estudada não apenas a evolução da concentração de HMF mas também avaliado o aparecimento no meio de alguns produtos secundários da fermentação tais como o ácido acético e o glicerol. Nestas análises foi ainda detetada a

presença dos ácidos propiônico, láctico e succínico. No entanto, estas concentrações eram demasiado reduzidas, tornando difícil uma quantificação e pareceram não variar significativamente ao longo do tempo. Por esta razão não são apresentados os respetivos resultados.

Por sua vez, o ácido acético e o glicerol são dois subprodutos importantes da fermentação alcoólica, tendo-se monitorizado a sua evolução.

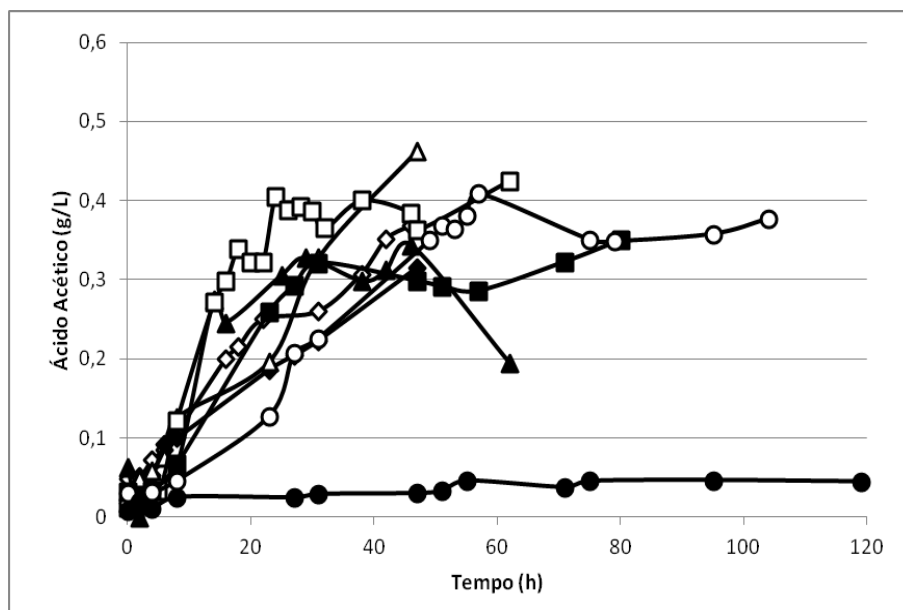


Figura 4.10 - Produção de ácido acético ao longo da fermentação de 50 g/L de glucose por *S. carlsbergensis* em presença de HMF:  $\diamond$  0 g/L;  $\blacklozenge$  0,5 g/L;  $\triangle$  1 g/L;  $\blacktriangle$  5 g/L;  $\square$  7,5 g/L;  $\blacksquare$  8,5 g/L;  $\circ$  10 g/L;  $\bullet$  15 g/L (T=30°C; 150 rpm) (os resultados apresentados são médias de 2 ou 3 valores com um desvio padrão inferior a 20%).

O gráfico da figura 4.10 permite observar que houve produção de ácido acético em todos os ensaios realizados, obtendo-se concentrações máximas que variam entre 0,31 e 0,46 g/L. Verificou-se que no ensaio sem inibidor a concentração máxima de ácido acético obtida foi de 0,36 g/L, e nos restantes ensaios os valores obtidos seguem sempre uma tendência de aumento embora em alguns casos em que se tiraram amostras mais tarde numa fase final de fermentação mais adiantada, se tenha observado decréscimos, como por exemplo no caso do ensaio com 5 g/L de HMF. No ensaio com 15 g/L de HMF a concentração máxima de ácido acético detetada era praticamente nula. Uma possível explicação para estes resultados poderá ser a maior necessidade de ATP que a presença de HMF no meio de cultura causa nas células de levedura, o que resulta na maior produção de etanol.

Na figura 4.11 pode observar-se a evolução da produção de glicerol ao longo da fermentação na presença de concentrações crescentes de HMF.

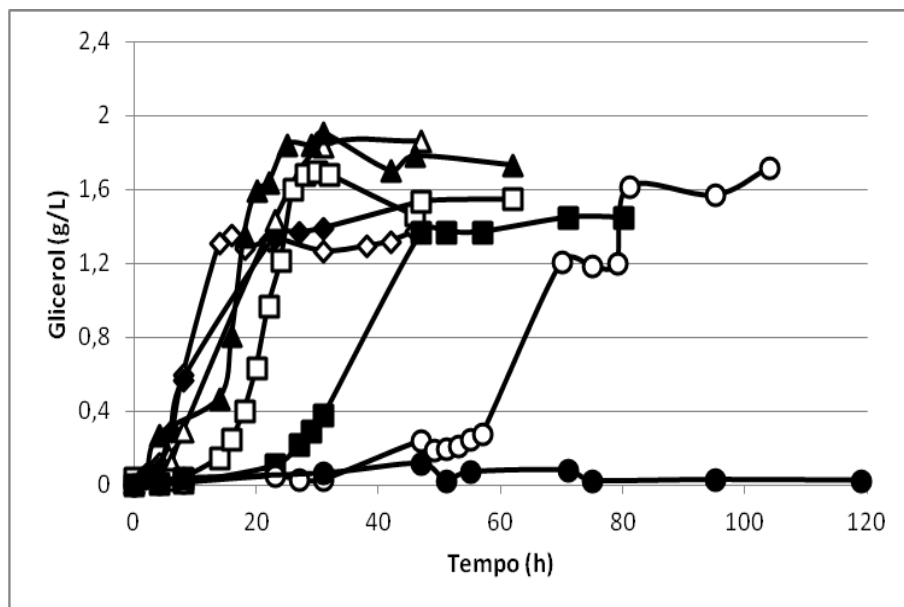


Figura 4.11 - Produção de glicerol ao longo da fermentação de 50 g/L de glucose por *S.carlsbergensis* em presença de HMF:  $\diamond$  0 g/L;  $\blacklozenge$  0,5 g/L;  $\blacktriangle$  1 g/L;  $\blacktriangle$  5 g/L;  $\square$  7,5 g/L;  $\blacksquare$  8,5 g/L;  $\circ$  10 g/L;  $\bullet$  15 g/L (T=30°C; 150 rpm) (os resultados apresentados são médias de 2 ou 3 valores com um desvio padrão inferior a 19%).

Neste caso observou-se também aumento da concentração de glicerol no meio ao longo da fermentação atingindo valores da ordem de 1,5 a 1,8 g/L. Em geral ao atingir a fase estacionária da fermentação também se observou paragem na libertação de glicerol.

### 4.3 Citometria de Fluxo

A resposta da levedura *S. carlsbergensis* ao stress causado pela exposição deste microrganismo a diferentes concentrações de HMF, foi analisada através da citometria de fluxo multiparamétrica. A seleção das horas de colheita das amostras para as análises de citometria baseou-se nos gráficos que relacionam os logaritmos naturais da densidade ótica da cultura e o tempo de fermentação para cada concentração de HMF estudada (anexo III, figuras III.1 a III.8).

A utilização desta técnica fornece informação sobre o estado fisiológico das células ao longo da fermentação, permitindo a monitorização e acompanhamento da evolução do processo, em tempo real.

### 4.3.1 Controles Prévios

Corantes fluorescentes tais como o DiOC<sub>6</sub>(3) e o IP permitem avaliar o potencial e a integridade de membrana dos microrganismos. De forma a demonstrar que a mistura DiOC<sub>6</sub>(3)/IP permite caracterizar células de *S. carlsbergensis* com a membrana citoplasmática em diferentes estados (intacta, despolarizada, permeabilizada) foram realizados alguns testes de controlo positivo. As células da levedura foram expostas a condições que induziram a despolarização e a permeabilização da membrana, sendo em seguida coradas com a mistura de corantes acima referida e analisadas no citómetro de fluxo.

A figura 4.12 mostra o gráfico de densidades correspondente a células de levedura colhidas nas fases exponencial e estacionária e coradas com a mistura DiOC<sub>6</sub>(3)/IP.

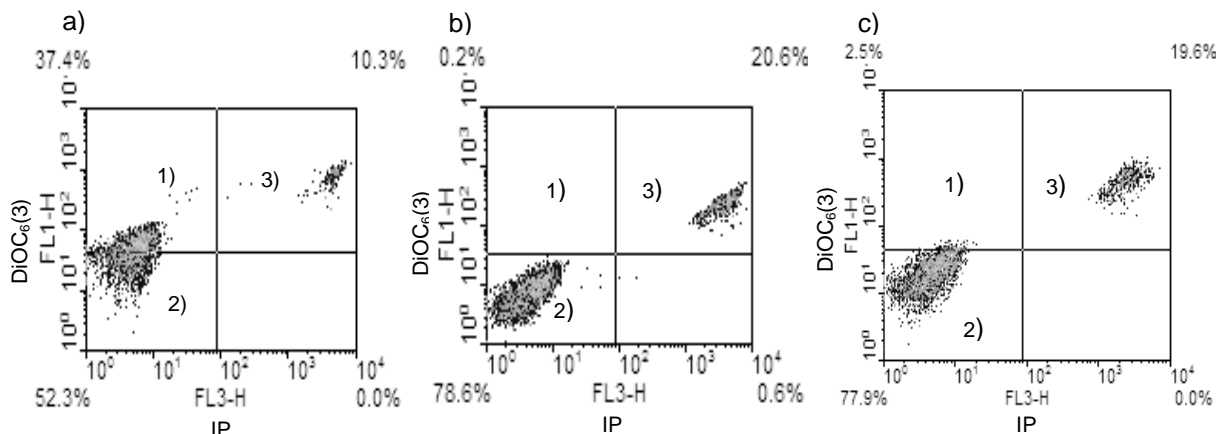


Figura 4.12 - Gráficos de densidade de células de *S. carlsbergensis* coradas com DiOC<sub>6</sub>(3) e IP. a) Células colhidas em fase exponencial. b) Células colhidas em fase exponencial tratadas com CCCP. c) Células colhidas em fase estacionária. Foram diferenciadas quatro subpopulações: 1) Células com a membrana citoplasmática intacta e polarizada. 2) Células com a membrana citoplasmática intacta mas despolarizada. 3) Células com a membrana citoplasmática permeabilizada.

Utilizando células colhidas em fase exponencial de crescimento, a mistura de corantes permitiu diferenciar três populações: 1) células intactas e polarizadas, coradas com DiOC<sub>6</sub>(3), com uma percentagem de 37,4%; 2) células intactas e despolarizadas, não coradas pelo DiOC<sub>6</sub>(3), com uma percentagem de 52,3% e 3) células permeabilizadas, duplamente coradas com DiOC<sub>6</sub>(3) e com IP, com uma percentagem de 10,3%. Em seguida, as células foram tratadas com cianina carbonil m-clorofenilhidrazona (CCCP), um composto que colapsa o potencial da membrana, e coradas com a mistura DiOC<sub>6</sub>(3)/IP. Verificou-se que a fluorescência do DiOC<sub>6</sub>(3) diminuiu após incubação com CCCP (fig. 4.12 b), quadrante 1, 0,2%) em relação às células não tratadas com aquele composto (fig. 4.12 a), quadrante 1, 37,4%). A proporção de células permeabilizadas duplicou (passou de 10,3 para

20,6%) indicando que, nalgumas células, o CCCP terá permeabilizado a membrana. Desta forma, foi possível verificar que alterações da fluorescência do DiOC<sub>6</sub>(3) refletem alterações do potencial da membrana citoplasmática. Quando se analisaram células submetidas a carência nutricional (fig. 4.12 c)), observou-se que a proporção de células permeabilizadas aumentou de 10,3 para 19,6% (quadrante 3).

Utilizou-se também o corante DHR-123 para detetar a presença de espécies reativas de oxigénio (ROS) nas células da levedura *S. carlsbergensis*. Quando as células são submetidas a uma situação de stress (nutricional ou ambiental) formam-se espécies reativas de oxigénio, na presença das quais o corante DHR-123 se converte em rodamina 123, que é fluorescente. As células da levedura *S. carlsbergensis* utilizadas foram colhidas nas fases exponencial, estacionária e estacionária avançada e coradas com DHR-123.

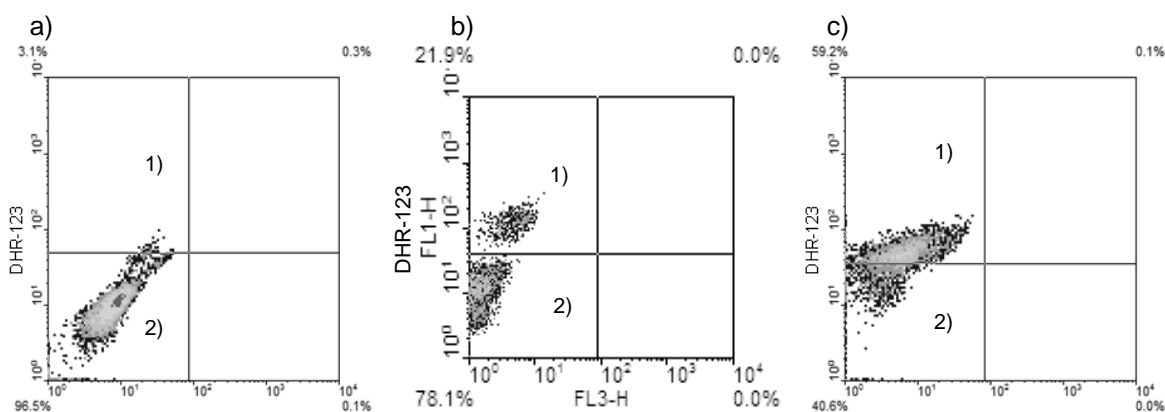


Figura 4.13 – Gráfico de densidade de células de *S. carlsbergensis* coradas com DHR-123. a) Células em fase exponencial. b) Células em fase estacionária. c) Células em fase estacionária avançada. Foram identificadas duas subpopulações: 1) Células que acumularam ROS. 2) Células que não acumularam ROS.

A figura 4.13 permite observar a evolução da percentagem de células com ROS (1) da fase exponencial (3,1%) para a estacionária (21,9%) e para a estacionária avançada (59,2%). Com base nestes resultados conclui-se que a percentagem de células de *S. carlsbergensis* com ROS aumenta com o stress nutricional por esgotamento da fonte de carbono e que a DHR-123 foi eficaz na sua deteção.

O corante vermelho do nilo (VN) foi utilizado na monitorização do teor de lípidos polares (constituintes da membrana citoplasmática) e de lípidos neutros (constituintes de materiais de reserva) das células da levedura *S. carlsbergensis* durante a fermentação alcoólica. A determinação dos lípidos polares foi realizada por deteção da fluorescência emitida por células coradas com VN no canal FL3 enquanto que os lípidos neutros são detetados através da fluorescência emitida por células coradas com VN no canal FL2. A quantidade total de lípidos polares e neutros constitui a fração lipídica total da célula. Para a

realização dos ensaios controlo foram utilizadas células da levedura *S. carlsbergensis* colhidas nas fases estacionária e estacionária avançada, que são alturas em que é suposto observar uma redução drástica dos lípidos totais (fig. 4.14). Para o teste com células colhidas em fase estacionária avançada utilizaram-se células de um ensaio de fermentação sem inibidor após 14 d (336 h) de incubação, para garantir um estado de carência extremo.

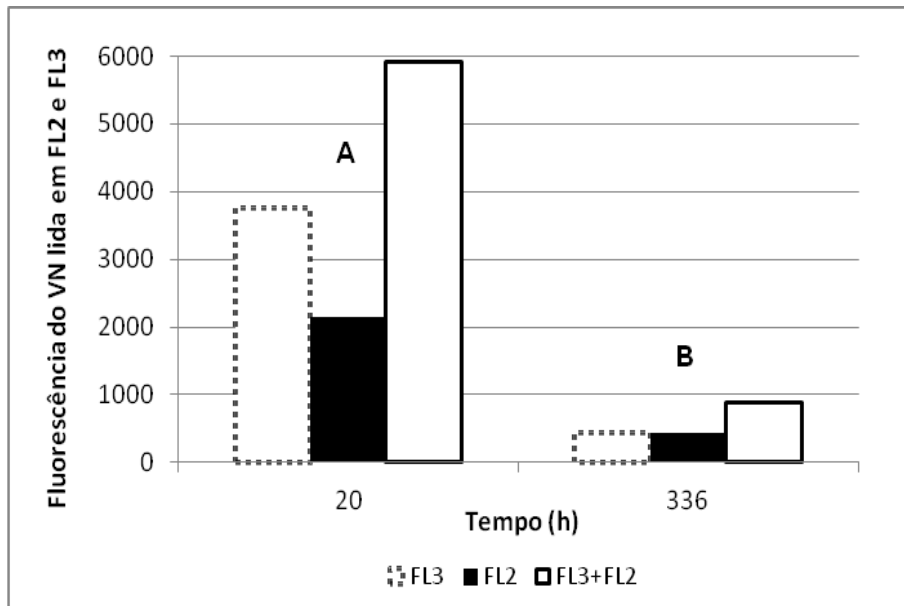


Figura 4.14 – Gráficos de fluorescência de células de *S. carlsbergensis* coradas com Vermelho do Nilo. A. Células em fase estacionária. B. Células em fase estacionária avançada. Foram distinguidas duas subpopulações de lípidos: em FL3 – Lípidos Polares; em FL2 – Lípidos Neutros. Estas duas subpopulações constituem os Lípidos Totais: FL3+FL2.

Efetivamente, através da deteção da fluorescência das células coradas com VN, observou-se uma diminuição dos teores de lípidos polares (FL3) e neutros (FL2) da fase estacionária (A) para a estacionária avançada (B), sendo esta diminuição mais evidente no teor de lípidos polares, cujo valor inicial é superior ao dos lípidos neutros (fig. 4.14). Estes resultados indicam que o esgotamento da fonte de carbono afeta negativamente os lípidos de membrana (lípidos polares), bem como as reservas energéticas da célula (lípidos neutros). De facto, quando as células são expostas a situações de privação de nutrientes muito prolongadas, consomem os seus materiais de reserva (lípidos neutros) como mecanismo de sobrevivência, o que explica a diminuição da fluorescência do VN detetada em FL2 com a idade da cultura. Por outro lado e uma vez que uma elevada percentagem de células apresenta a sua membrana permeabilizada quando sujeitas a privação de nutrientes na fase estacionária avançada (fig. 4.12 c)), é de esperar que a composição em lípidos

polares dessas membranas diminua, explicando assim a drástica diminuição dos lípidos polares observada nas células de *S. carlsbergensis* quando expostas a essa situação (fig. 4.14).

### 4.3.2 Análises de citometria de fluxo multiparamétrica

Em todos os ensaios de fermentação em presença de concentrações crescentes de HMF, foram colhidas amostras ao longo de três fases do processo fermentativo: fase exponencial, fase estacionária e fase estacionária avançada. Apenas no caso do ensaio de 10 g/L de HMF foram também colhidas amostras de células na fase de latência no sentido de se observar eventuais alterações fisiológicas das células de levedura.

Nas figura 4.15 e 4.16 estão apresentados os gráficos de densidade referentes às fluorescências do DiOC<sub>6</sub>(3) e IP, em amostras de *S. carlsbergensis* colhidas durante os ensaios de fermentação sem inibidor (controlo) e com adição de HMF, a várias concentrações.

Relativamente ao ensaio controlo é possível observar que a percentagem de células com a membrana citoplasmática intacta e polarizada diminui ligeiramente da fase exponencial (fig. 4.15 b) quadrante 1, 32,5%) para a estacionária (fig. 4.15, h), quadrante 1, 21,1%), aumentando da fase estacionária para a fase estacionária avançada (fig. 4.15, n) quadrante 1, 72,1%). Por sua vez, a percentagem de células com a membrana citoplasmática intacta mas despolarizada aumentou ligeiramente da fase exponencial (fig. 4.15, b), quadrante 2, 65,9%) para a estacionária (fig. 4.15, h), quadrante 2, 74,3%) e diminuiu bastante da fase estacionária para a estacionária avançada (fig. 4.15, n), quadrante 2, 18,2%). Por último observou-se que a percentagem de células com a membrana citoplasmática permeabilizada aumentou da fase exponencial (fig. 4.15, b), quadrante 3, 1,6%) para a estacionária (fig. 4.15, h), quadrante 3, 4,5%) e para a estacionária avançada (fig. 4.15, n), quadrante 3, 9,4%). A acidificação do meio (fig.4.4), o esgotamento da fonte de carbono (fig. 4.5) e o aumento da concentração de etanol (fig. 4.6) observados da fase exponencial para a estacionária permitem explicar o aumento da percentagem de células com a membrana citoplasmática intacta mas despolarizada (quadrante 2) e de células com a membrana citoplasmática permeabilizada (quadrante 3) verificados nestas fases.

Efetivamente, as células em carência de carbono esgotam as suas reservas de ATP, o que afeta o potencial da membrana citoplasmática. A acidez do meio também reduz a produção de ATP. O aumento da percentagem de células com membrana citoplasmática intacta e polarizada (quadrante 1) da fase estacionária para a fase estacionária avançada

sugere que as células de levedura estivessem a utilizar nutrientes/materiais libertados por lise para sobreviverem à carência de nutrientes que caracteriza a fase estacionária avançada.

Deste modo, as células foram capazes de recuperar o potencial da membrana citoplasmática apesar da proporção de células permeabilizadas ter aumentado de 4,5 para 9,4%, da fase estacionária para a fase estacionária avançada.

Relativamente aos ensaios na presença do inibidor, verificou-se que, de um modo geral, na fase exponencial, a maior parte das células apresenta a membrana despolarizada (fig. 4.15, c), e), f) e g) quadrante 2), sendo particularmente evidente o impacto do HMF na despolarização da membrana citoplasmática na fase estacionária avançada (fig. 4.15, p), q), r) e s) quadrante 2). No entanto, tal não foi observado na fermentação com menor quantidade de HMF (1 g/L), onde se verificou que uma parte das células recuperou o potencial da membrana na fase estacionária avançada (fig. 4.15, o), quadrante 1, 44,0%), à semelhança do que se observou para o ensaio controlo.

A proporção de células permeabilizadas aumentou progressivamente com o aumento da concentração de HMF e com a idade da cultura, sendo superior a 30% no ensaio com 7,5 g/L de HMF e 50% no ensaio com 10 g/L HMF, na fase estacionária avançada (fig. 4.15, r) e s), quadrante 3).

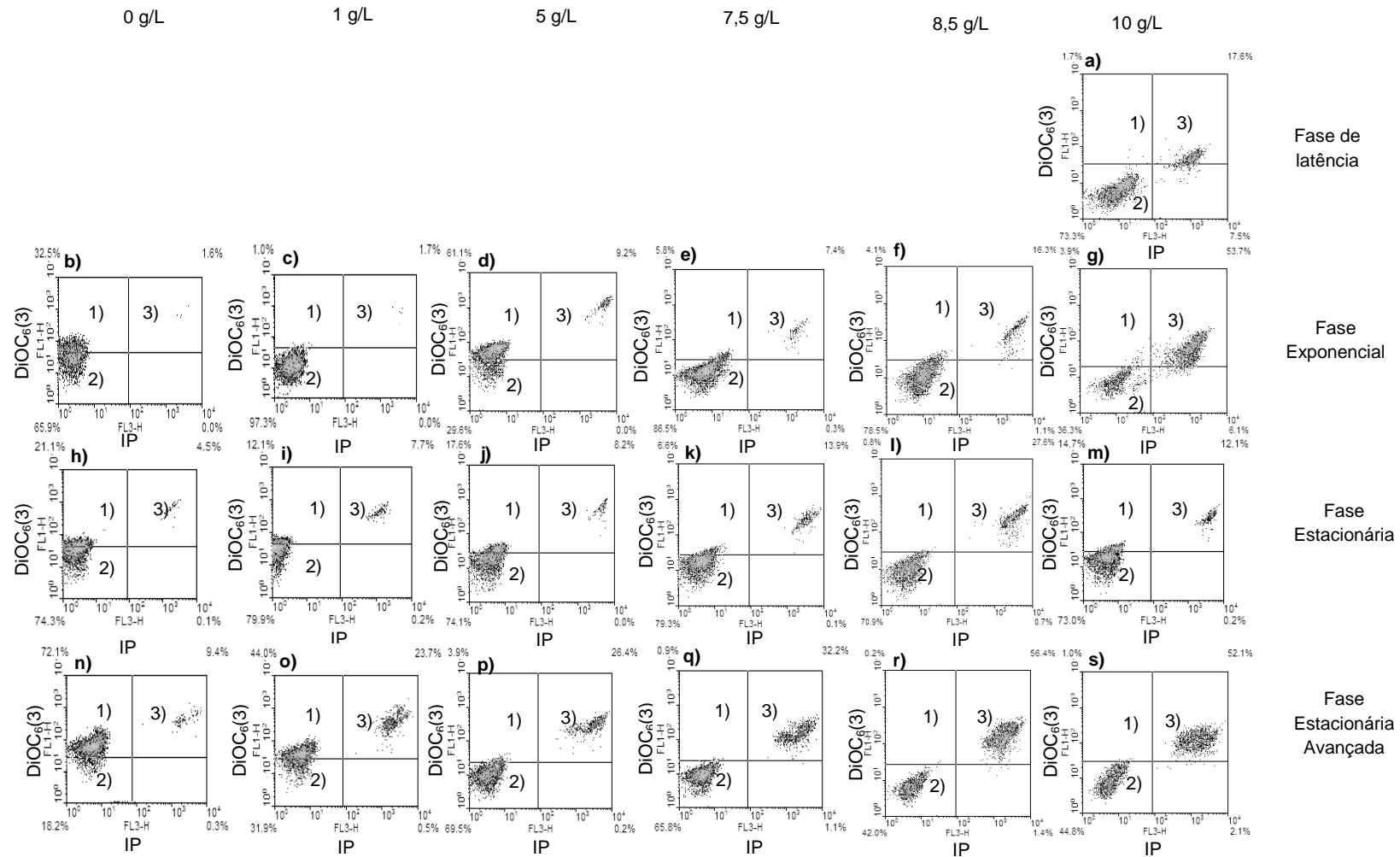


Figura 4.15 - Gráficos de densidade de células de *S. carlsbergensis* coradas com DiOC<sub>6</sub>(3) e IP, colhidas nas fases de latência, exponencial, estacionária e estacionária avançada. Foram diferenciadas três subpopulações: 1) Células com a membrana citoplasmática intacta e polarizada. 2) Células com a membrana citoplasmática intacta, despolarizada. 3) Células com a membrana citoplasmática permeabilizada.

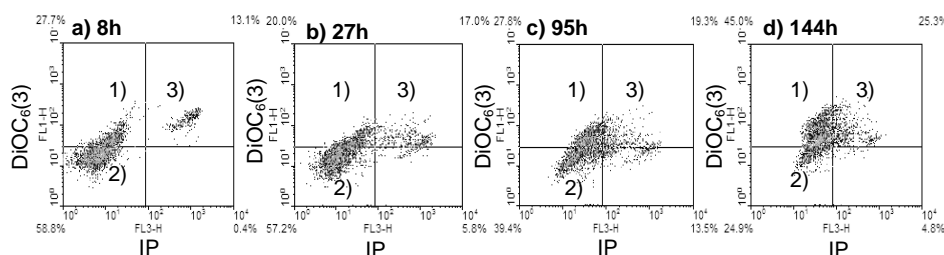


Figura 4.16 - Gráficos de densidade de células de *S. carlsbergensis* coradas com DiOC<sub>6</sub>(3) e IP e colhidas durante o ensaio com 15 g/L de HMF. Foram diferenciadas três subpopulações: 1) Células com a membrana citoplasmática intacta e polarizada. 2) Células com a membrana citoplasmática intacta, despolarizada. 3) Células com a membrana citoplasmática permeabilizada.

A má resolução dos gráficos relativos às últimas horas do ensaio com 15 g/L de HMF (fig. 4.16, c) e d)), que se traduziu por uma dificuldade de identificação correta da localização das populações deve-se possivelmente a interferência do HMF na análise citométrica já que mesmo após esterilização em autoclave, não houve dissolução total do HMF apresentando o meio algum pó em suspensão. As poeiras de HMF não dissolvidas no meio terão interferido na análise das células nas fases de crescimento mais avançadas quando as células reduzem o seu tamanho, tornando-se difícil a sua separação das poeiras de HMF, o que terá impedido a adequada penetração dos corantes nas células. Além disso poderá ter acontecido também adsorção do corante aos pós em suspensão.

Neste mesmo ensaio observou-se que as células de levedura não ultrapassaram a fase de latência de crescimento (fig. 4.2), tendo-se verificado apenas que a percentagem de células com a membrana citoplasmática intacta e polarizada diminuiu ligeiramente ao longo das primeiras 27h de ensaio (fig. 4.16, a) e b) quadrante 1, 27,7 e 20,0%, respetivamente). A percentagem de células com a membrana citoplasmática intacta mas despolarizada diminuiu ligeiramente de 58,8 para 57,2% (fig. 4.16, a) e b) quadrante 2) e a percentagem de células com a membrana citoplasmática permeabilizada aumentou de 13,1 para 17,0% (fig. 4.16, a) e b) quadrante 2). O stress induzido nas células de levedura pela presença de 15 g/L de HMF no meio de fermentação traduziu-se, portanto na permeabilização da membrana citoplasmática verificada nas primeiras 27h do ensaio.

Nas figuras 4.17 e 4.18 estão representados os gráficos de densidade de células coradas com DHR-123 obtidos para amostras colhidas durante os ensaios de fermentação na ausência e na presença de concentrações crescentes de HMF.

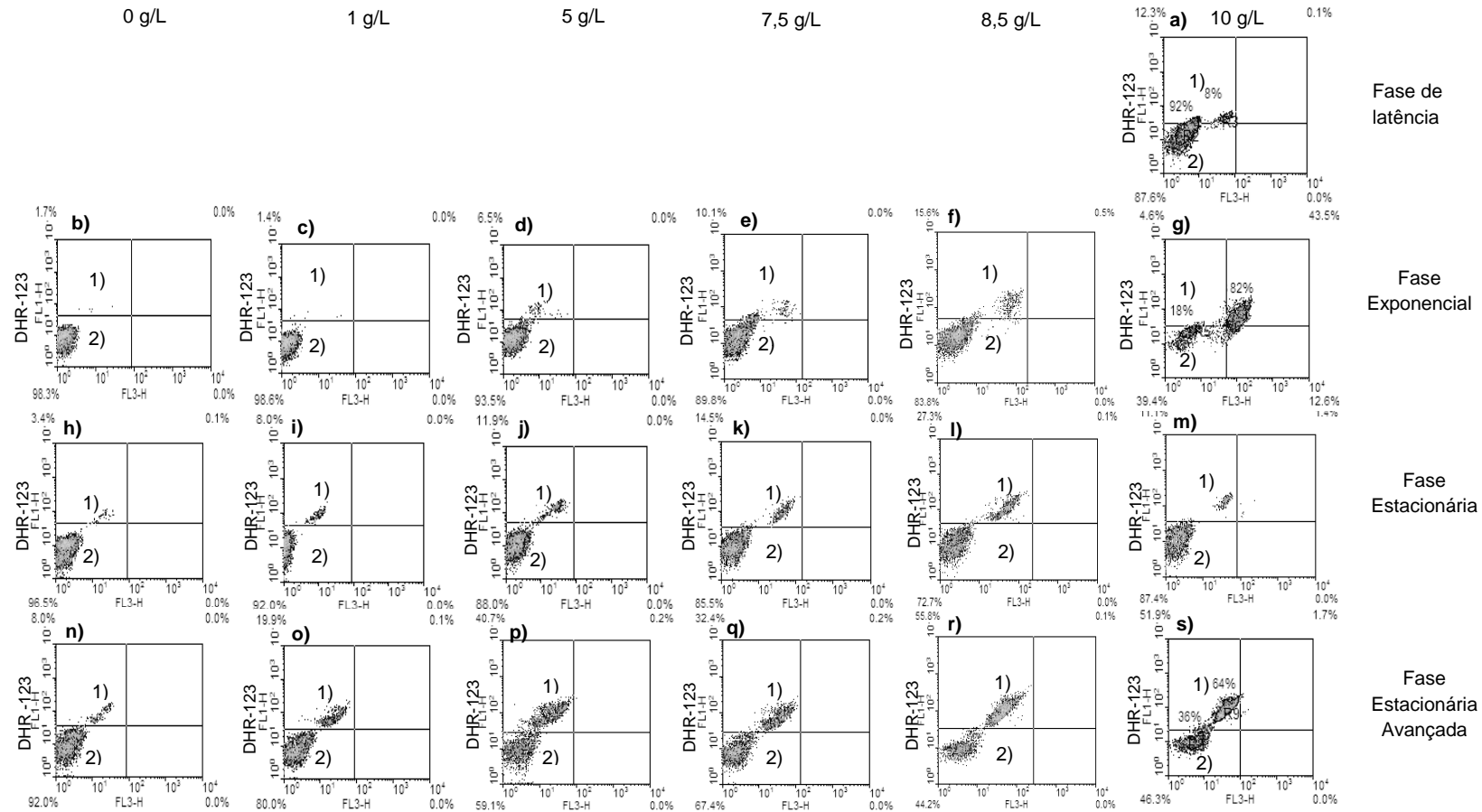


Figura 4.17 - Gráficos de densidade de células de *S. carlsbergensis* coradas com DHR-123 e colhidas nas fases de latência, exponencial, estacionária e estacionária avançada. Foram identificadas duas subpopulações: 1) Células que acumularam ROS. 2) Células que não acumularam ROS.

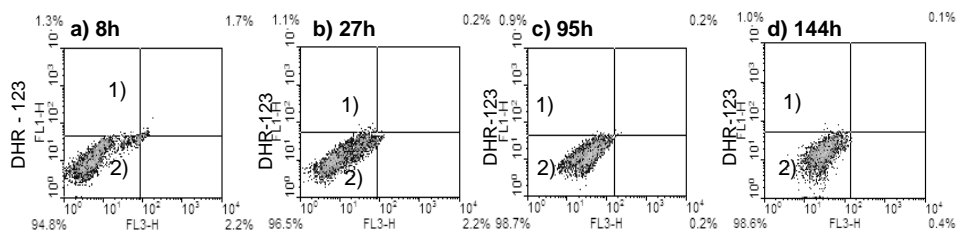


Figura 4.18 - Gráficos de densidade de células de *S. carlsbergensis* coradas com DHR-123 e colhidas durante o ensaio com 15g/L de HMF. Foram identificadas duas subpopulações: 1) Células que acumularam ROS. 2) Células que não acumularam ROS.

De um modo geral, verificou-se um aumento da percentagem de células com ROS (quadrante 1) com o aumento da concentração de HMF, sendo esta população particularmente evidente na fase estacionária avançada, cuja percentagem foi sempre acima de 20% (fig. 4.17 o), p), q), r) e s)). Efetivamente a produção de ROS foi também já descrita como uma resposta da levedura *S. cerevisiae* à presença de furfural, um composto da família dos furanos tal como o HMF e que tal como este é gerado na hidrólise de materiais lenhocelulósicos. Nesse trabalho foram observadas lesões nas membranas mitocondriais e nos vacúolos da levedura, consistentes com a acumulação de ROS nas células (Allen *et al.*, 2010).

Em leveduras têm também sido reportados danos ao nível do DNA, das proteínas, dos lípidos e do citosqueleto e indução da morte celular programada por acumulação de ROS nas células (Lopes da Silva *et al.*, 2012).

Em relação ao ensaio com 15 g/L, os gráficos a), b), c) e d) da figura 4.18 não revelam presença de população de células com ROS (quadrante 1), provavelmente devido à existência de pós em suspensão, tal como anteriormente referido, que terão impedido o corante DHR-123 de penetrar nas células.

Nas figuras 4.19 e 4.20 é visível a diminuição da fluorescência do VN lida no canal FL3 (correspondente aos lípidos polares) e da fluorescência do VN lida no canal FL2 (correspondente aos lípidos neutros) com o aumento da concentração de HMF, da fase exponencial para a estacionária e para a estacionária avançada. No ensaio sem inibidor foram observados teores de lípidos polares e neutros superiores aos dos ensaios com adição de concentrações crescentes de HMF. Estes resultados evidenciam o carácter inibidor do HMF na síntese de lípidos nas células pela levedura *S. carlsbergensis*.

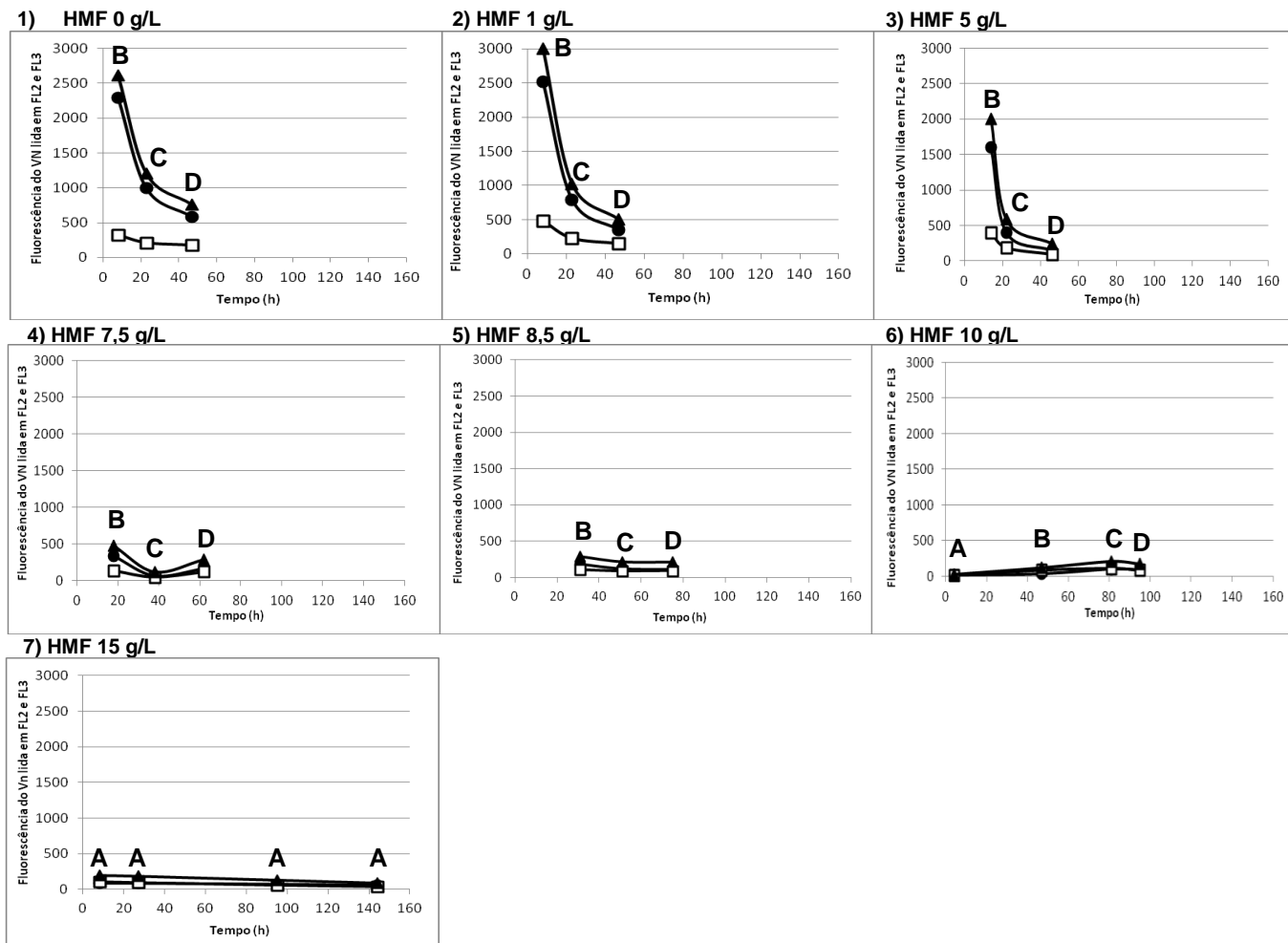


Figura 4.19 – Variação da fluorescência de células de *S. carlsbergensis* coradas com VN, ao longo de ensaios de fermentação com 50 g/L de glicose e na presença de diferentes concentrações de HMF: Fases de latência (A), exponencial (B), estacionária (C) e estacionária avançada (D). ● Lípidos Polares, □ Lípidos Neutros, ▲ Lípidos Totais.

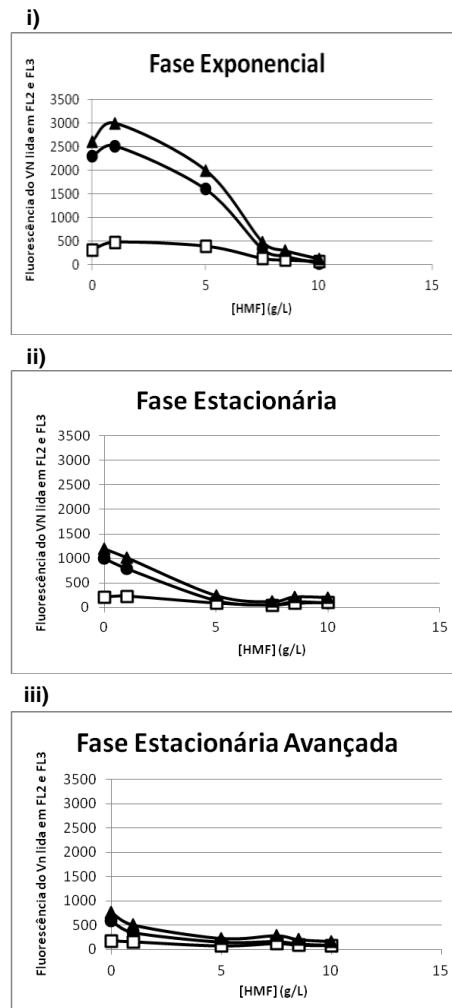


Figura 4.20 – Variação da fluorescência de células de *S. carlsbergensis* coradas com VN, ao longo de ensaios de fermentação com 50 g/L de glucose e na presença de diferentes concentrações de HMF. ● Lípidos Polares, □ Lípidos Neutros, ▲ Lípidos Totais.

As variações do teor de lípidos são mais evidentes em relação aos lípidos polares (fluorescência lida em FL3) (constituintes da membrana) do que em relação aos lípidos neutros (fluorescência lida em FL2). Contudo, a diferença entre o teor de lípidos polares e neutros diminui com o aumento da concentração do HMF, o que sugere que os lípidos de membrana sejam mais afetados pela presença do tóxico do que os lípidos neutros. A diminuição dos lípidos totais pode explicar-se pelo aumento da percentagem de células com a membrana citoplasmática permeabilizada ao longo das fases de crescimento (fig. 4.15, quadrante 3), o que leva a que as células percam lípidos de membrana e também de reserva, por perda do seu conteúdo interno, incluindo material lipídico de armazenamento (Lopes da Silva *et al.*, 2010).

## 5 Considerações finais e perspectivas futuras

O presente trabalho foi realizado no sentido de avaliar o efeito inibitório do hidroximetilfurfural na fermentação alcoólica por *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 6269 através da utilização da citometria de fluxo multiparamétrica.

Através dos resultados obtidos, foi possível concluir que o hidroximetilfurfural afeta o crescimento e a capacidade fermentativa da levedura, provocando a perda de integridade e de potencial da membrana citoplasmática. Uma das variáveis utilizadas no estudo do crescimento da levedura foi a taxa específica de crescimento, verificando-se a diminuição desta taxa com o aumento da concentração do inibidor, bem como a completa inibição do crescimento e fermentação da levedura na presença de 15 g/L de hidroximetilfurfural.

A avaliação da capacidade fermentativa da levedura *S. carlsbergensis* baseou-se essencialmente nas concentrações máximas em etanol obtidas para as diferentes concentrações de hidroximetilfurfural. A concentração máxima em etanol foi obtida no ensaio sem adição de inibidor (21,9 g/L), obtendo-se concentrações máximas em etanol próximas de 20 g/L para os restantes ensaios, o que corresponde a uma redução de cerca de 20% na concentração de etanol em relação ao ensaio sem adição de inibidor.

Através de análises por HPLC foi detetado ao longo do tempo de fermentação o aparecimento de um pico cuja área aumentava no sentido do desaparecimento do hidroximetilfurfural do meio de cultura. Este pico representa eventualmente o 2,5-bis-hidroximetilfurano, um derivado álcool do HMF resultante do metabolismo da levedura face ao HMF e cuja existência foi já descrita por alguns autores (Liu *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2007). Estes resultados permitem concluir que, na presença de concentrações de hidroximetilfurfural até 10 g/L a levedura *S. carlsbergensis* é capaz de converter este inibidor num produto menos tóxico ocorrendo a fermentação paralelamente ao desaparecimento do HMF. Esta característica representa um mecanismo de adaptação por parte da levedura a condições de stress resultantes da presença do inibidor no meio de cultura, revelando uma maior capacidade de tolerância ao HMF.

Com base neste trabalho podem salientar-se algumas características importantes e distintas da levedura *S. carlsbergensis* em relação a outras leveduras utilizadas na produção de bioetanol. Esta levedura tolera concentrações superiores de hidroximetilfurfural em relação à levedura *S. cerevisiae* (Lee *et al.*, 2011), crescendo e fermentando na presença de concentrações até 10 g/L de HMF. Nestas condições a levedura *S. carlsbergensis* é ainda capaz de produzir mais de 80% do etanol produzido na ausência de inibidor. Estas características permitem perspetivar a sua utilização na fermentação de hidrolisados

lenhocelulósicos para a produção de bioetanol, em que a concentração de HMF varia entre 0,5 e 11 g/L, sem comprometer a viabilidade económica e técnica do processo.

Relativamente aos efeitos da presença do inibidor na fisiologia da *S. carlsbergensis* foi mais evidente nos ensaios com adição de 8,5 e 10 g/L de HMF a perda de integridade da membrana citoplasmática, sendo evidente em todos os ensaios perda de potencial da membrana. No ensaio com adição de 15 g/L de HMF em que se observou inibição total do metabolismo da levedura o potencial da membrana citoplasmática não sofreu alterações significativas, ocorrendo apenas perda de integridade da membrana, até às 27h de fermentação.

A acumulação de espécies reativas de oxigénio, subprodutos do metabolismo celular formados como resposta da levedura ao stress durante a fermentação alcoólica, foi mais evidente no ensaio com adição de 10 g/L de HMF. Tal como seria de esperar observou-se em geral aumento do teor em ROS com o aumento da concentração de HMF.

Nos ensaios com menor concentração de inibidor a biomassa da levedura apresentou maiores teores de lípidos totais (polares e neutros), devido ao menor nível de stress induzido pelas baixas concentrações de HMF nas células de *S. carlsbergensis*. À medida que a concentração de HMF aumentou, o teor de lípidos totais diminuiu. O facto de se terem observado maiores reduções no teor de lípidos polares do que nos neutros com o aumento das concentrações de HMF resultará não só da resposta celular ao stress mas também de uma maior percentagem de células com a membrana citoplasmática permeabilizada, o que implica maiores perdas de conteúdo lipídico nas membranas. No ensaio com adição de 15 g/L de hidroximetilfurfural os teores de lípidos apenas diminuíram ligeiramente.

Através dos resultados obtidos neste trabalho com as análises por citometria de fluxo multiparamétrica, é possível concluir que se trata de uma técnica essencial para garantir o controlo eficiente da produção industrial de etanol. Graças à obtenção de resultados relativos a alterações fisiológicas das células no decorrer dos processos, esta técnica permite alterar parâmetros durante a fermentação no sentido de aumentar o rendimento obtido.

Uma vez que a levedura *S. carlsbergensis* parece revelar características que lhe conferem um especial potencial para a utilização na produção de bioetanol a partir de matérias-primas lenhocelulósicas, poder-se-ão realizar estudos complementares com esta levedura de modo a avaliar o efeito inibitório de outros inibidores gerados no processo, como o ácido levulínico ou o furfural.

## 6 Referências Bibliográficas

Allen, S. A., Clark, W., Mccaffery, J. M., Cai, Z., Lanctot, A., Slininger, P. J., Liu, Z. L., Gorsich, S. W. (2010) Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Sacharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, **3**, 1-10.

Almeida, J. R. M., Modig, T., Petersson, A., Hahn-Hagerdal, B., Lidén, G., Grauslund, M. (2007) Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **82**, 340-349.

BP, Biofuels Platform (2012). *Biofuels Platform data*. [http://www.biofuelstp.eu/global\\_overview.html](http://www.biofuelstp.eu/global_overview.html). Consultado a 29/03/2013.

BP, Biofuels Platform (2013). *EU-27 Annual Biofuels Report in Biofuels Platform*. [http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Biofuels%20Annual\\_The%20Hague\\_EU-27\\_8-13-2013.pdf](http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Biofuels%20Annual_The%20Hague_EU-27_8-13-2013.pdf). Consultado a 24/05/2013.

Campos, L. S. (1998) Entender a Bioquímica – O metabolismo fundamental em animais e plantas. *Escolar Editora*, Lisboa; ISBN: 972-8434-00-6.

Côrte-Real, M., Sansonetty, F., Ludovico, P., Prudêncio, C., Rodrigues, F., Fortuna, M., Sousa, M. J., Teixeira da Silva, M., Leão, C. (2002) Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. *Boletim de Biotecnologia*. **71**, 19-33.

Direção Geral de Energia e Geologia. Informação da direção geral de energia. <http://www.dgeg.pt/>. Consultado a 22/01/2013.

Gírio, F. M., Fonseca C., Carvalheiro F., Duarte L. C., Marques S., Bogel-Lukasik R. (2010) Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*. **101**, 4775-4800.

Gibson, B. R., Lawrence, S. J., Leclaire, J. P. R., Powell, C. D., Smart, K. A. (2007) Yeast responses to stress associated with industrial brewery handling. *Microbiology Review*. **31**, 535-569.

Guimarães, P. M. R. (2008) Physiology of yeasts in alcoholic fermentation processes. Dissertação para obtenção do grau de doutor em engenharia química e biológica. Universidade do Minho.

Kobayashi, M., Shimizu, H., Shioya, S. (2007) Physiological analysis of yeast cells by flow cytometry during serial-repitching of low-malt fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **103**, 451-456.

Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G., Nilvebrant, N. (1999) The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology*, **24**, 151-159.

Lighthelm, M., Prior, B., Preez, J. (1988) The effect of respiratory inhibitors on the fermentative ability of *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus* and *Sacharomyces cerevisiae* under various conditions of aerobiosis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **29**, 67-71.

Liu, Z. L., Slininger, P. J., Gorsich, S. W. (2005) Enhanced biotransformation of furfural and hydroxymethylfurfural by newly developed ethanologenic yeast strains. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **121-124**, 451-460.

Liu, Z. L., Slininger, P. J., Dien, B. S., Berhow, M. A., Kurtzman, C. P., Gorsich, S. W. (2004) Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **31**, 345-352.

Lopes da Silva, T., Roseiro, J. C., Reis, A. (2012) Applications and perspectives of multi-parameter flow cytometry to microbial biofuels production processes. *Trends in Biotechnology*. **30** (4), 225-232.

Lopes da Silva, T., Reis, A., Hewitt, C., Roseiro, J. C. (2004) Citometria de fluxo – Funcionalidade celular on-line em bioprocessos. *Boletim de Biotecnologia*. **77**, 22-40.

Miranda, J. R. P. C. (2011) Produção de bioetanol a partir da microalga *Scenedesmus obliquus*. Dissertação para obtenção do grau de mestre em energia e bioenergia. Universidade Nova de Lisboa.

Muller, S., Losche, A. (2004) Population profiles of a commercial yeast strain in the course of brewing. *Journal of Food Engineering*. **63**, 375-381.

Parajó, J. C., Domínguez, H., Domínguez, J. M. (1996) Xylitol from wood: study of some operational strategies. *Food Chemistry*. **57**, 531-535.

Qureshi, N., Bowman, M. J., Saha, B. C., Hector, R., Berhow, M. A., Cotta, M. A. (2011) Effect of celulosic sugar degradation products (furfural and hydroxymethyl furfural) on

acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation using *Clostridium beijerinckii* P260. *Food and Bioproducts Processing*. **90**, 533-540.

Rizzi, M., Erlenmann, P., Bui-Thann, N., Dellwag, H. (1988) Xylose fermentation by yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **29**, 148-154.

Romaní, A., Garrote, G., Parajó, J. C. (2012) Bioethanol production from autohydrolyzed *Eucalyptus globulus* by Simultaneous Saccharification and Fermentation operating at high solids loading. *Fuel*. **94**, 305-312.

Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S., Aikat, K. (2012) Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*. **37**, 19-27.

Taherzadeh, M. J., Gustafsson L., Niklasson C. (2000) Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **53**, 701-708.

Torres, M. H. (2010) Bioetanol a partir de hidrolisados lenhocelulósicos simulados, avaliação preliminar do papel das vias de regulação em *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Sistemas Bioenergéticos. Universidade Técnica de Lisboa.

Valente, C. M. M. (2010) Bioetanol a partir de hidrolisados lenhocelulósicos simulados, avaliação preliminar do papel de sistemas de transporte membranar de *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Sistemas Bioenergéticos. Universidade Técnica de Lisboa.

Wikandari, R., Millati, R., Syamsiyah, S., Muriana, R., Ayuningsih, Y. (2010) Effect of furfural, hydroxymethylfurfural and acetic acid on indigenous microbial isolate for bioethanol production. *Agricultural Journal*. **(5)** 2, 105-109.

Zhang, Y., Han, B., Ezeji, T. C. (2012) Biotransformation of furfural and 5 – hydroxymethyl furfural (HMF) by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 during butanol fermentation. *New Biotechnology*. **29**, 345-351.

## Anexo I

Quadro Anexo I.1 - Reagentes químicos utilizados no trabalho.

Designação	Fórmula Química	Massa Molar (g/mol)	Pureza (%)	Marca	Utilização
Ácido Acético	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H	60,05	99,8	Fluka	HPLC
Ácido Sulfúrico	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	98,08	95-97	Sigma-Aldrich	Ensaio de Fermentação
Agar	-	-	-	Merck	Meio de Repicagem
Cianina Carbonil-m-clorofenilhidrazona (CCCP)	C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> ClN <sub>4</sub>	204,62	-	Sigma	Citometria de fluxo
D- Glucose anidra	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	180,16	99,5	Pronalab	Meio de Cultura Meio de Repicagem
Dihidrogenofosfato de Potássio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09	99,5-100,5	Riedel-deHaën	Meio de Cultura
123- Dihidrorodamina (DHR-123)	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	346,38	-	Invitrogen	Citometria de Fluxo
Etanol Absoluto	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	46,07	99,5	Panreac	Cromatografia Gasosa
Extrato de Levedura	-	-	-	HiMedia Laboratories	Meio de Cultura Meio de Repicagem
Glicerol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	92,10	99,5	Fluka	HPLC
5-(Hidroximetil)furfural	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	126,11	≥99	Sigma-Aldrich	Ensaio de Fermentação HPLC
Iodeto de 3,3' – Dihexiloxacarbocianina [DiOC <sub>6</sub> (3)]	C <sub>29</sub> H <sub>37</sub> I <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	572,23	-	Invitrogen	Citometria de Fluxo
Iodeto de Propídeo	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> I <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	668,4	-	Invitrogen	Citometria de Fluxo
Vermelho do Nilo	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	318,37	≥98	Riedel de Haen	Citometria de Fluxo
2- Propanol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	60,10	99,7	Merck	Cromatografia Gasosa
Peptona	-	-	-	Panreac	Meio de Repicagem
Solução salina tamponada com fosfato (pH=7,3±0,2)	-	-	-	-	Citometria de Fluxo
Sulfato de Amônio	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	132,14	99	Riedel-deHaën	Meio de Cultura
Sulfato de Magnésio Heptahidratado	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	246,48	99,5	Merck	Meio de Cultura

## Anexo II

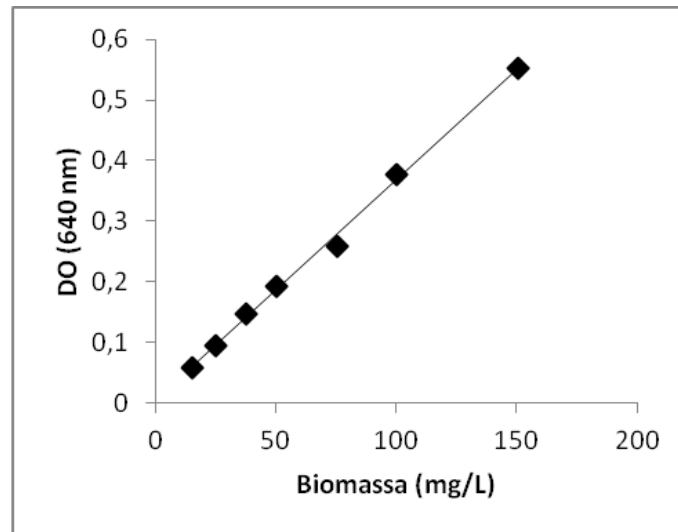


Figura II.1 - Correlação entre densidade ótica a 640 nm e biomassa para suspensões celulares de *S. carlsbergensis*.

A equação da reta padrão é a seguinte:

$$DO_{640nm} = 0,003 \text{ Biomassa} + 0,004$$

O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) é 0,997.

### Anexo III

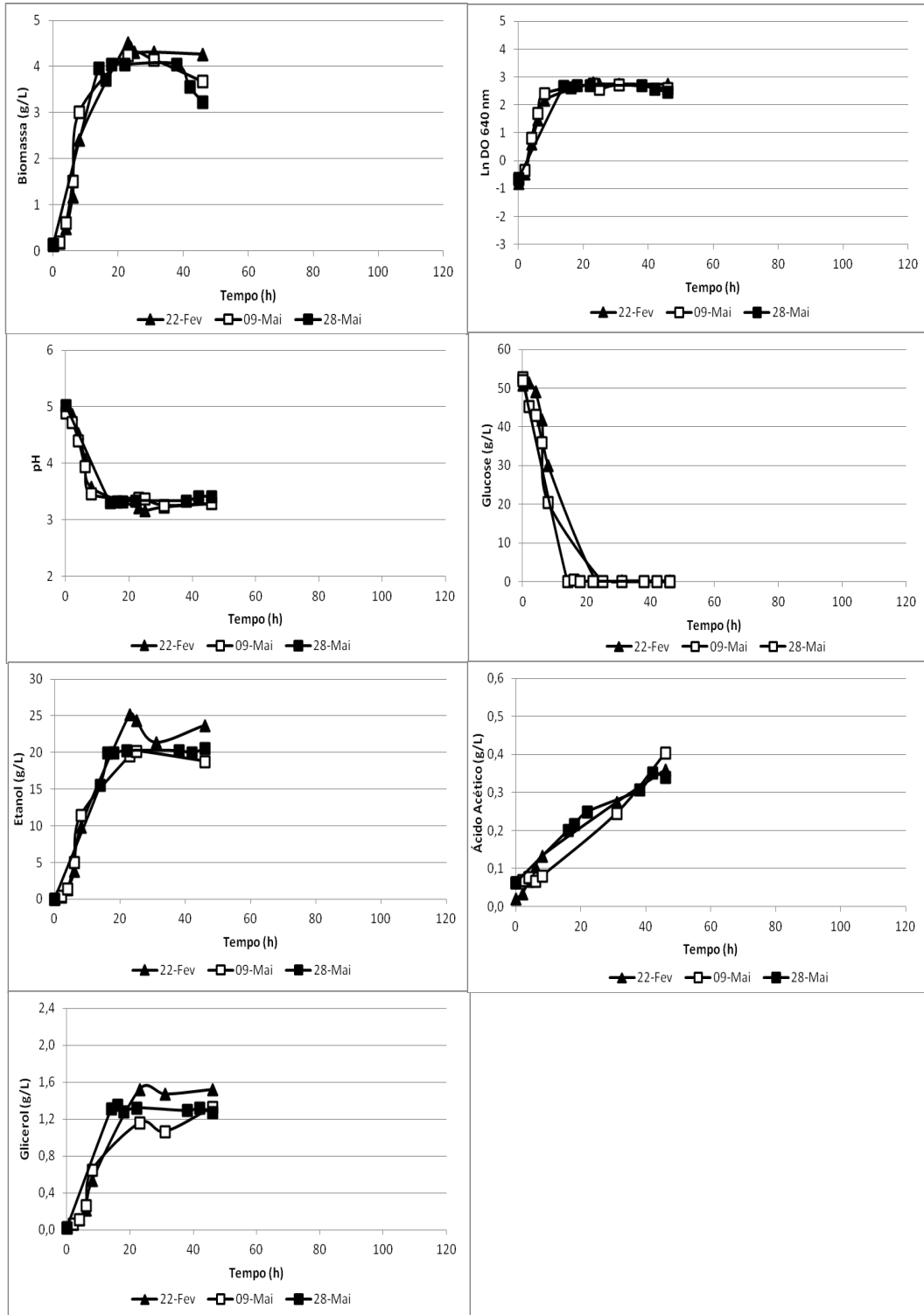


Figura III.1 - Evolução da concentração de biomassa, da DO, do pH e das concentrações de glucose, de etanol, de ácido acético e de glicerol ao longo da fermentação por *S. carlsbergensis* na ausência de HMF (T=30°C; 150 rpm).

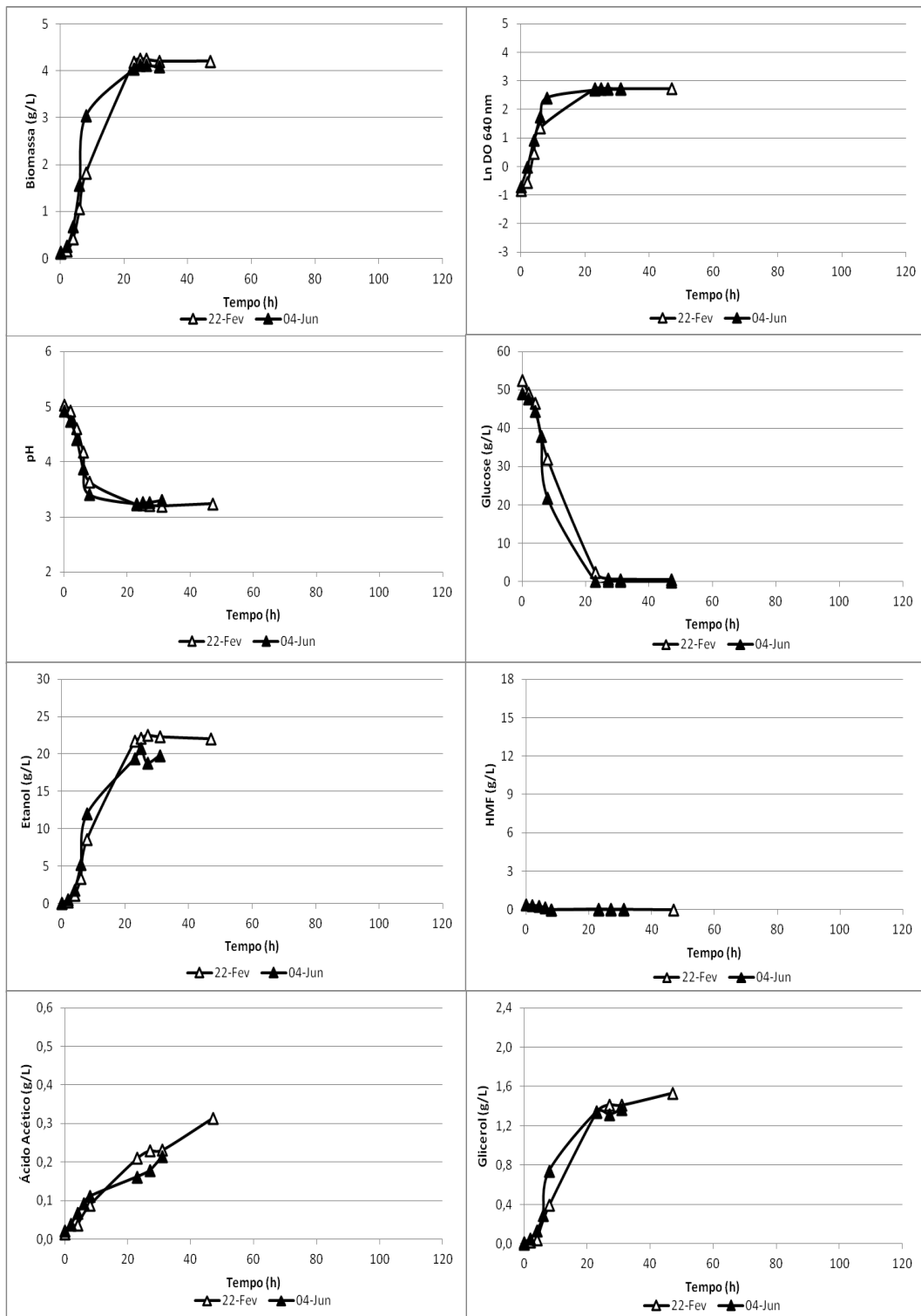


Figura III.2 - Evolução da concentração de biomassa, da DO, do pH e das concentrações de glucose, de etanol, de HMF, de ácido acético e de glicerol ao longo da fermentação por *S. carlsbergensis* na presença de 0,5 g/L de HMF (T=30°C; 150 rpm).

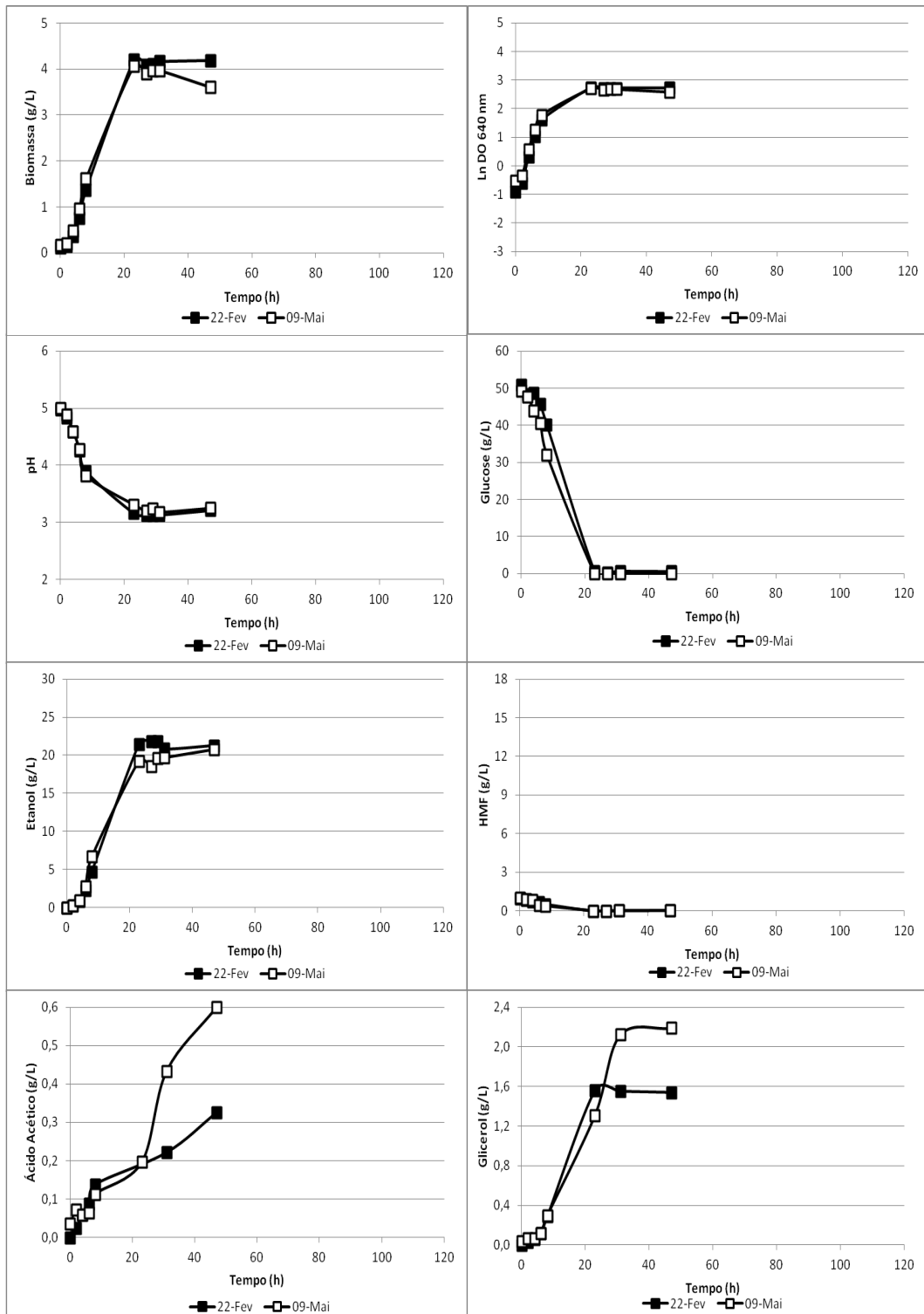


Figura III.3 - Evolução da concentração de biomassa, da DO, do pH e das concentrações de glucose, de etanol, de HMF, de ácido acético e de glicerol ao longo da fermentação por *S. carlsbergensis* na presença de 1 g/L de HMF (T=30°C; 150 rpm).

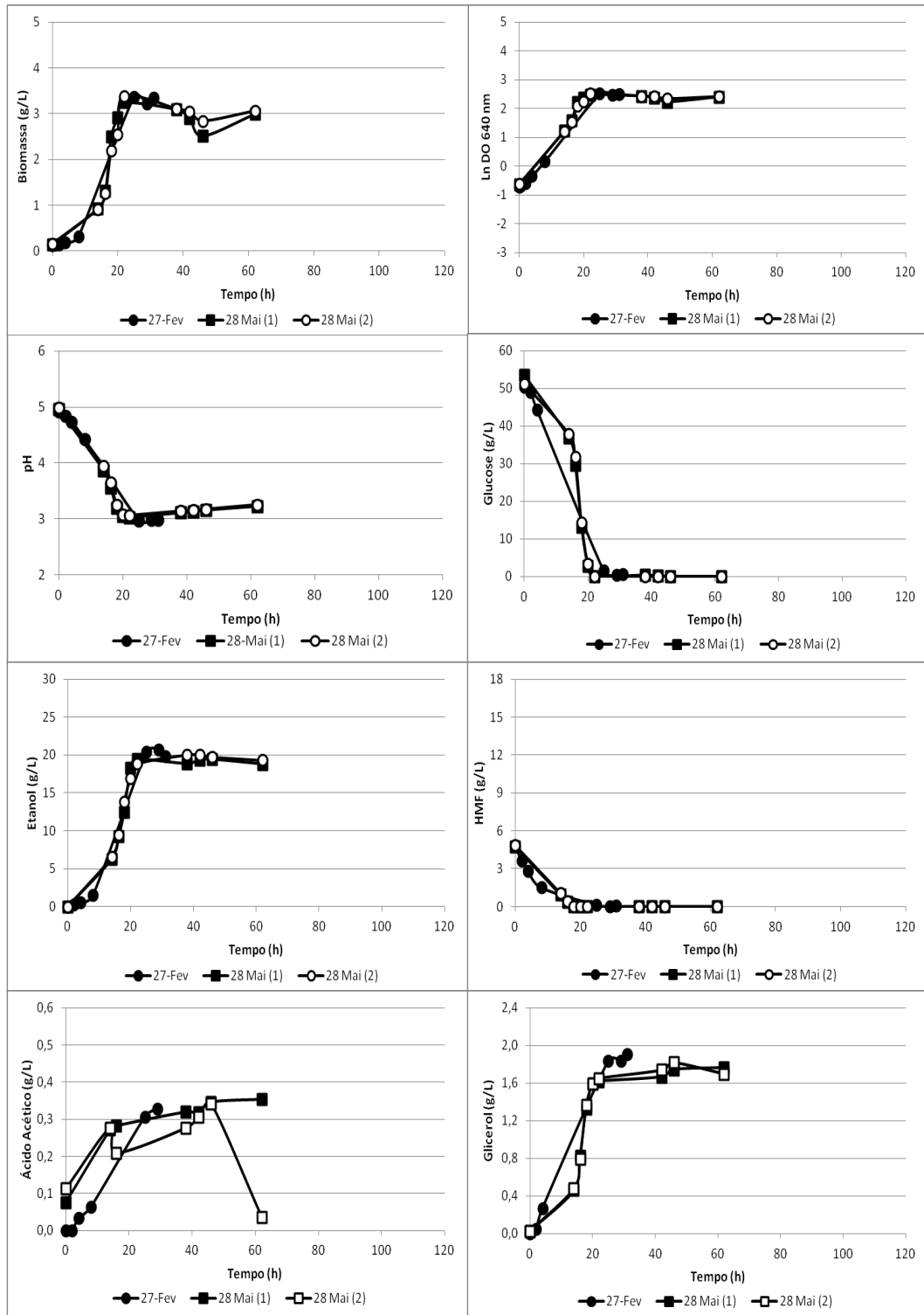


Figura III.4 - Evolução da concentração de biomassa, da DO, do pH e das concentrações de glucose, de etanol, de HMF, de ácido acético e de glicerol ao longo da fermentação por *S. carlsbergensis* na presença de 5 g/L de HMF (T=30°C; 150 rpm).

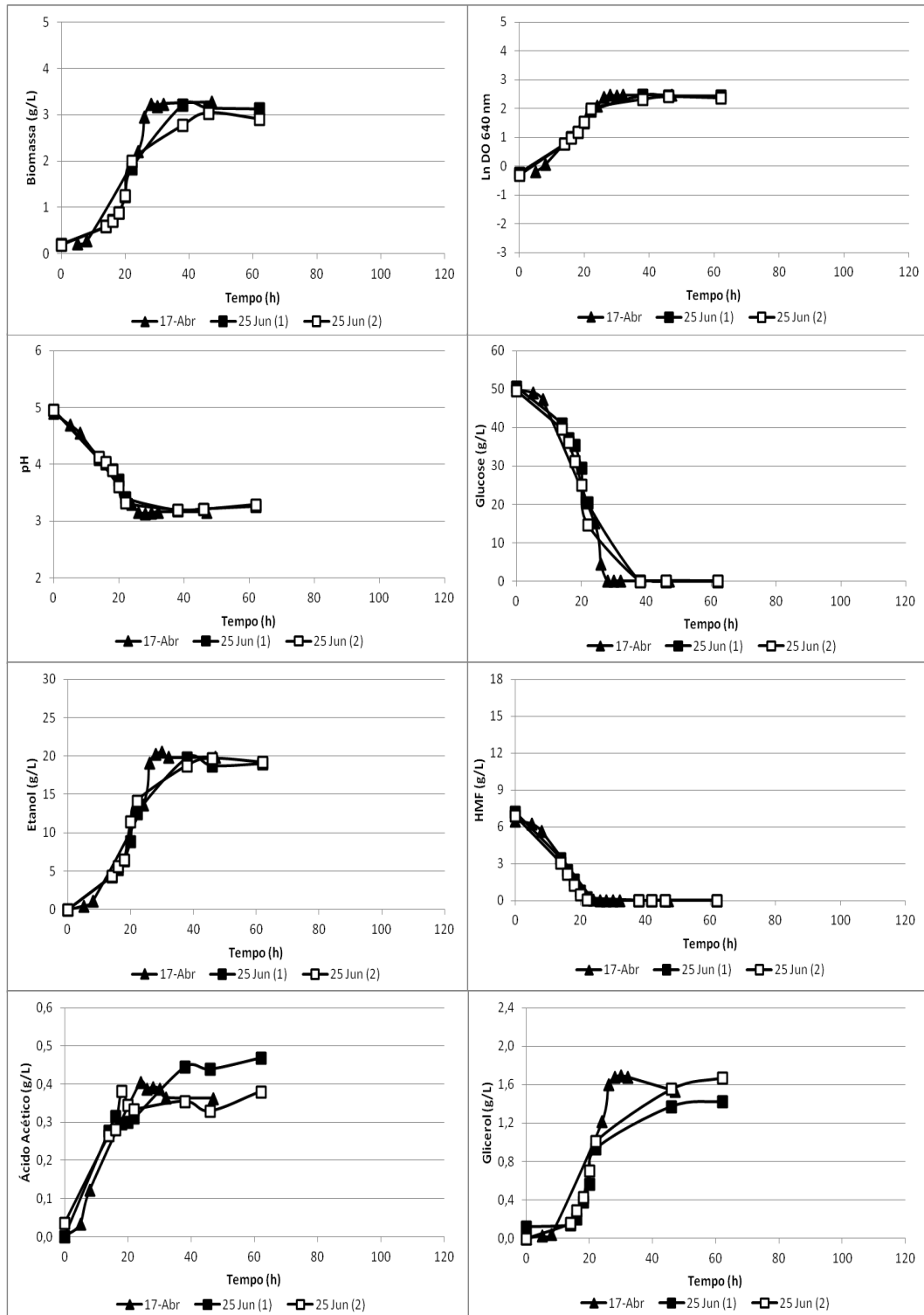


Figura III.5 - Evolução da concentração de biomassa, da DO, do pH e das concentrações de glucose, de etanol, de HMF, de ácido acético e de glicerol ao longo da fermentação por *S. carlsbergensis* na presença de 7,5 g/L de HMF (T=30°C; 150 rpm).

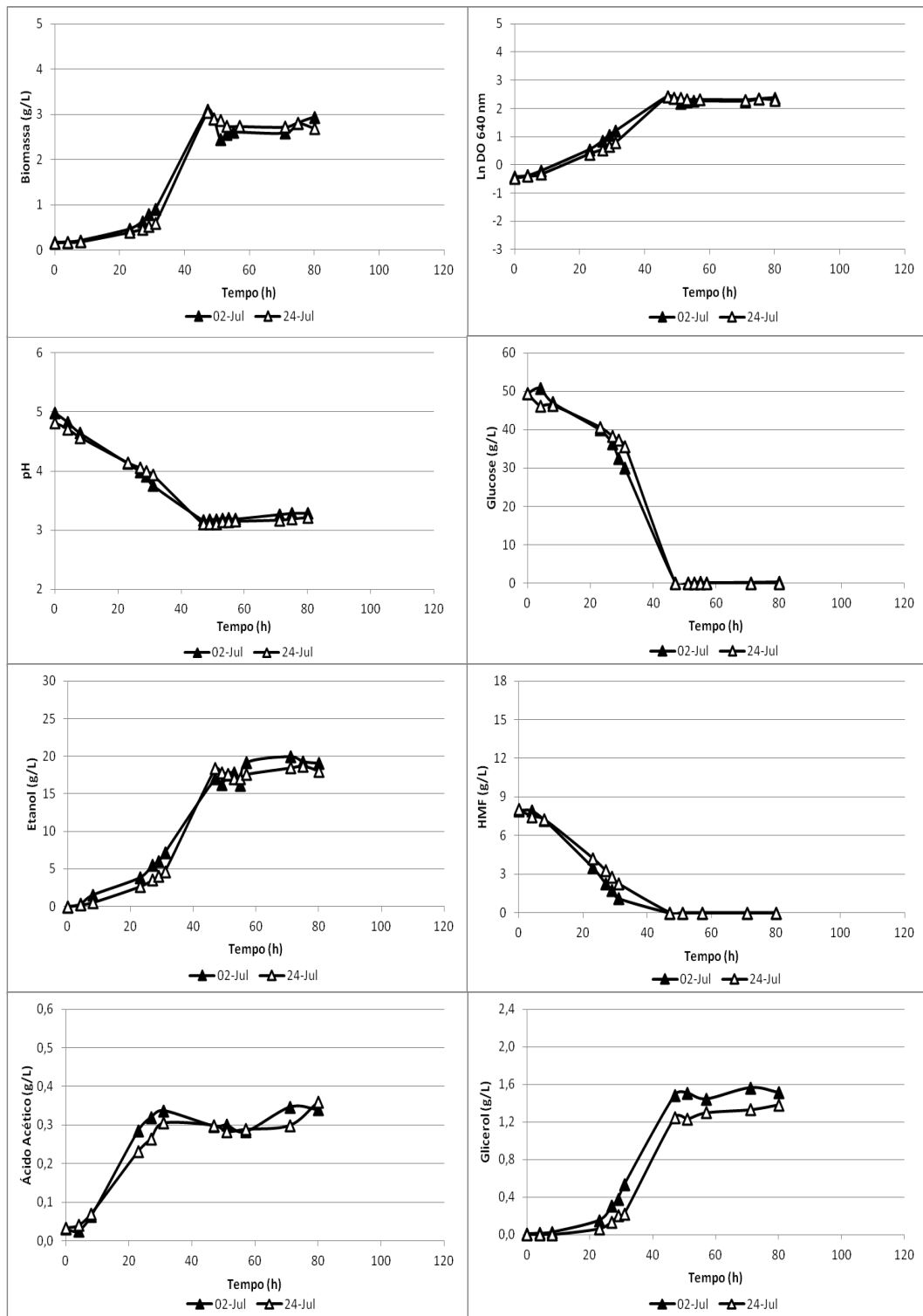


Figura III.6 - Evolução da concentração de biomassa, da DO, do pH e das concentrações de glucose, de etanol, de HMF, de ácido acético e de glicerol ao longo da fermentação por *S. carlsbergensis* na presença de 8,5 g/L de HMF (T=30°C; 150 rpm).

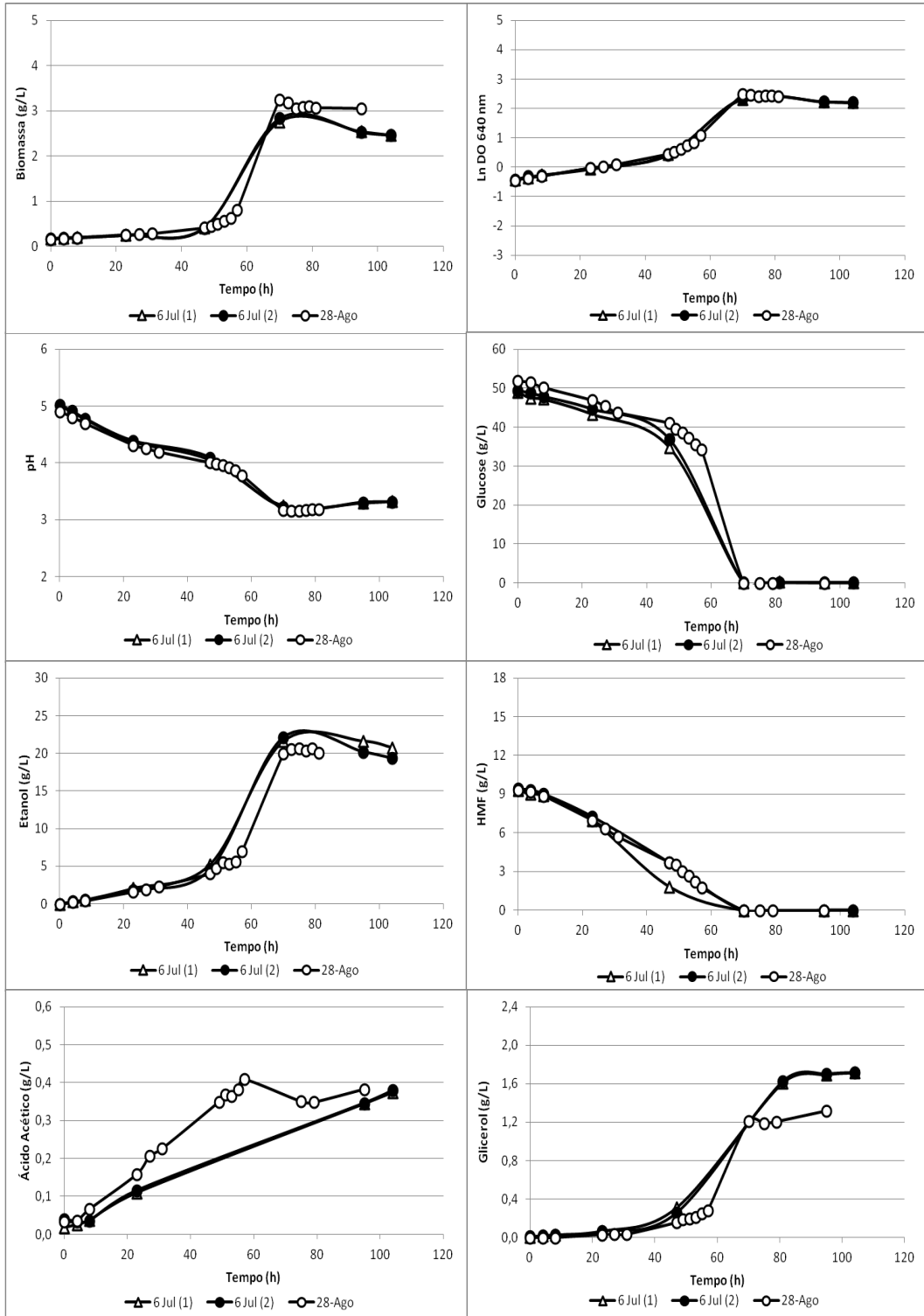


Figura III.7 - Evolução da concentração de biomassa, da DO, do pH e das concentrações de glucose, de etanol, de HMF, de ácido acético e de glicerol ao longo da fermentação por *S. carlsbergensis* na presença de 10 g/L de HMF (T=30°C; 150 rpm).

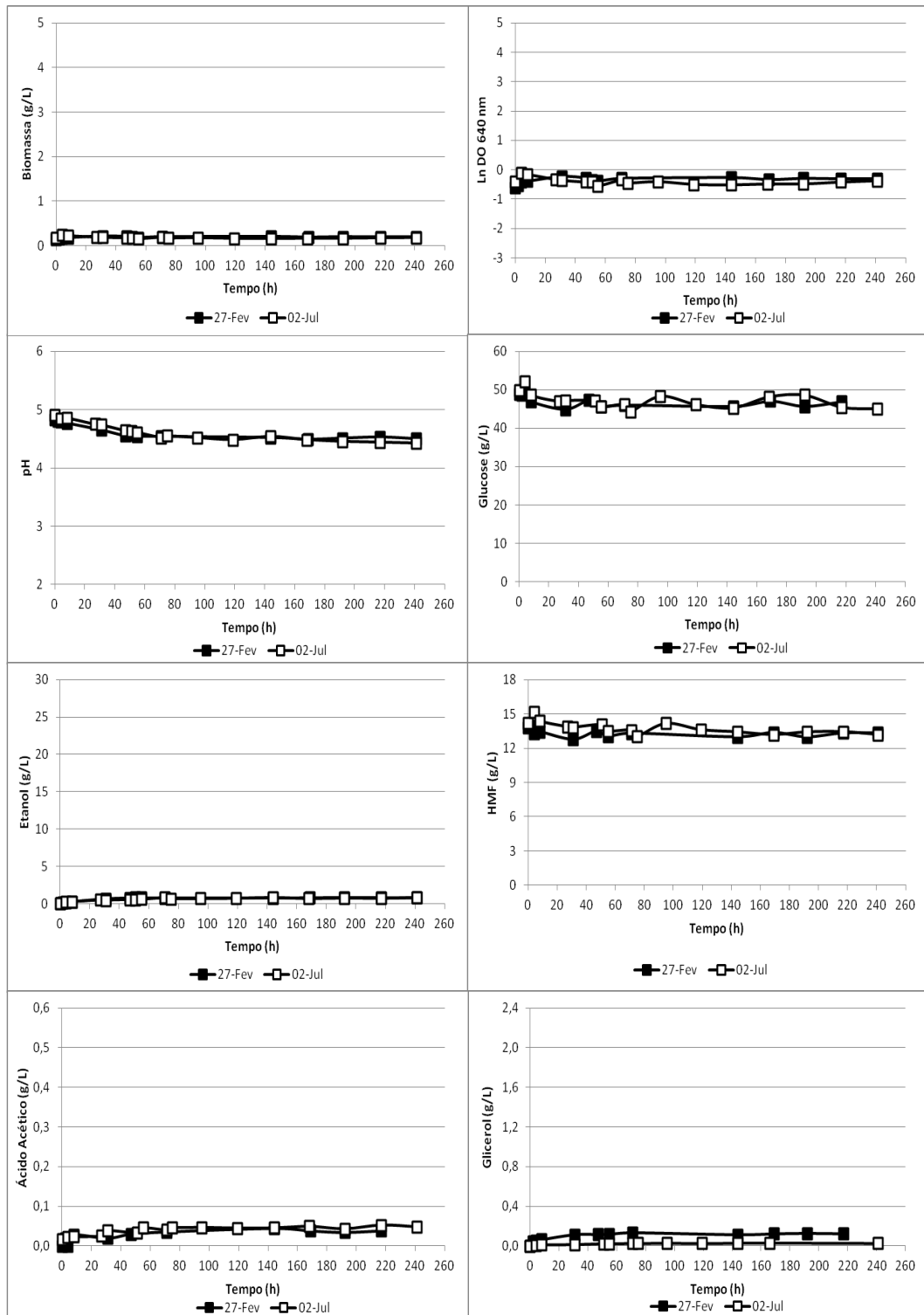


Figura III.8 - Evolução da concentração de biomassa, da DO, do pH e das concentrações de glucose, de etanol, de HMF, de ácido acético e de glicerol ao longo da fermentação por *S. carlsbergensis* na presença de 15 g/L de HMF (T=30°C; 150rpm).