VANESSA CRISTINA DA SILVA

**Obtenção anaeróbia de etanol em reator em batelada a partir de
glicose, xilose e celulose em condição termófila**

Versão corrigida

São Carlos

2015

VANESSA CRISTINA DA SILVA

**Obtenção anaeróbia de etanol em reator em batelada a partir de
glicose, xilose e celulose em condição termófila**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche

Versão corrigida

São Carlos

2015

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

S581o Silva, Vanessa Cristina da
Obtenção anaeróbia de etanol em reator em batelada
a partir de glicose, xilose e celulose em condição
termófila / Vanessa Cristina da Silva; orientadora
Maria Bernadete Amâncio Varesche Silva. São Carlos,
2015.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento --
Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de
São Paulo, 2015.

1. bactérias celulolíticas. 2. biomassa
lignocelulósica. 3. digestão anaeróbia. 4. ácidos
orgânicos . 5. metano. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharela **VANESSA CRISTINA DA SILVA**.

Título da dissertação: "Obtenção anaeróbia de etanol em reator em batelada a partir de glicose, xilose e celulose em condição termófila".

Data da defesa: 24/04/2015

Comissão Julgadora:

Resultado:

Profa. Associada **Maria Bernadete Amâncio Varesche**
(Orientadora)
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovada

Profa. Dra. **Sandra Imaculada Maintinguer**
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP- Araraquara)

Aprovado

Dra. **Paula Rúbia Ferreira Rosa**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovado

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Profa. Associada **Maria Bernadete A. Varesche Silva**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Paulo César Lima Segantine**

Dedico a Deus e aos meus pais, com amor e eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, saúde e capacidade por todos esses anos.

A meus pais, por todo amor, empenho, dedicação, companheirismo, por fundamentar minha existência.

A minha família de São Carlos, Marcus Andrade, Thais Correia, Monaisa Andrade e Mayra Bassini, por fazerem da nossa república Maria Groselha, um lar.

A minha orientadora e professora Maria Bernadete pela oportunidade, atenção, orientação e trabalho exercidos neste tempo de aprendizado.

A pesquisadora Regiane Ratti, pela amizade, por todo empenho, auxílio, ensinamentos, companheirismo, por seu papel fundamental nestes meus anos de pesquisa.

Ao pesquisador Marcus Vinícius Andrade, por todo apoio, dedicação, paciência e por nossas longas conversas que muito me ajudaram na elaboração desse trabalho.

As pesquisadoras Bruna Carrer e Regiane Ratti pela avaliação e sugestões em meu exame de qualificação.

Aos profissionais Maria Angela Talarico Adorno, Isabel Kimiko Sakamoto, Eloisa Pozzi Gianotti, Carolina Sabatini e Juliana Custódio por toda ajuda, instrução, empenho e auxílio na execução de minhas atividades no laboratório.

Aos meus amigos Marcus Vinícius Andrade, Kiemi Murata, Clara Faria e Rodrigo Carneiro, por serem meus amigos, amo vocês.

As companheiras Inês Tomita, Livia Botta, Bruna Carrer aos companheiros Dagoberto Okada e Lucas Fuess por toda amizade, ajuda, opiniões, sugestões, artigos, conversas, que muito contribuíram no decorrer deste trabalho.

Aos amigos de laboratório Adriana, Bruna, Camila, Carol, Clara, Dagoberto, Fabrício, Fiaz, Guilherme Oliveira, Guilherme Vuitik, Inaê, Juliana, Karl, Kiemi, Laís, Lucas, Mara Rúbia, Marcus, Paulo, Priscila, Rachel, Rodrigo Carneiro, Rodrigo Longo, Rogério, Samuel, Sarah, Simone, Thaís, Théo, Tiago Martins, Tiago Palladino, Valéria e Vivian.

Aos professores Eugênio Foresti, Juliano Corbi, Maria Bernadete, Simone Damasceno, Marcelo Zaiat e Márcia Damianovick pela convivência e pelo exemplo de profissional a ser seguido.

À USP, EESC, SHS e LPB.

À Capes pelo apoio financeiro.

RESUMO

SILVA, V. **Obtenção anaeróbia de etanol em reator em batelada a partir de glicose, xilose e celulose em condição termófila.** 2015. São Carlos – SP, 77 F. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos – Departamento de Hidráulica e Saneamento.

A biomassa lignocelulósica é uma alternativa atrativa para o aumento na oferta de biocombustíveis, uma vez que é constituída de celulose e hemicelulose. Esses polímeros são constituídos principalmente de unidades menores de glicose e xilose, os quais por meio de bactérias anaeróbias termófilas, podem ser metabolizados em etanol. Portanto, estabeleceu-se o objetivo desse trabalho, em utilizar as principais fontes de carbono da biomassa lignocelulósica (celulose, glicose e xilose), e produzir etanol por meio da ação de consórcio microbiano selecionado a partir de inóculo termófilo e anaeróbio. O inóculo foi submetido a condição de crescimento com variação de pH (2,3,4,5,6,e 7) e variação de dois meios de cultivo em reatores em batelada, visando favorecer bactérias celulolíticas e fermentativas produtoras de etanol. Para a produção de etanol, o pH e meio de cultivo mais adequados foram 7,0 e Meio *Thermoanaerobacter ethanolicus*, respectivamente. A partir do inóculo enriquecido nas condições nutricionais de pH e meio de cultivo, prosseguiu-se a realização dos ensaios de produção de etanol a partir de celulose, glicose e xilose (1g/L de cada substrato), em pH 7 e meio *T. ethanolicus*. Os ensaios foram realizados em reator em batelada, em triplicata, a 55°C, ambos seguidos de um reator controle, sem adição desses substratos orgânicos. Os rendimentos de etanol foram de 1,73 mol etanol/mol glicose e 1,33 mol de etanol /mol de xilose. Para o substrato celulose obteve-se 1,88 mmol de etanol/g de celulose. Para os reatores controle de glicose, celulose e xilose, no qual o extrato de levedura foi a única fonte orgânica adicionada, a produção de etanol foi 1,27 mmol/L, 0,39 mmol/L e 1,65 mmol/L, respectivamente. Em todos os reatores foi detectado produção de ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico. A produção de ácido acético foi de 5,73 mmol/L, 9,73 mmol/L e 14,45 mmol/L, para os reatores de glicose, celulose e xilose, respectivamente. No reator com glicose, observou-se baixo rendimento de hidrogênio (0,31 mol hidrogênio/mol glicose), e nos demais reatores não foi constatado produção desse gás. Em contrapartida, observou-se rendimentos de 6,6 mmol de metano/g de celulose e 0,68 mol de metano/mol de xilose para os respectivos reatores. Dessa forma, pode-se mencionar que em função das características do consórcio microbiano foi possível obter a degradação da celulose e metabolização da glicose e xilose em etanol.

Palavras-chaves: bactérias celulolíticas, biomassa lignocelulósica, digestão anaeróbia, ácidos orgânicos e metano.

ABSTRACT

SILVA, V. **Ethanol production in anaerobic batch reactors from glucose, xylose and cellulose by thermophilic consortium microbial.** 2015. São Carlos – SP, 77 F. Dissertation (Master) – Escola de Engenharia de São Carlos – Departamento de Hidráulica e Saneamento.

Lignocellulosic biomass is an attractive alternative to increase biofuels' proposal, as it's composed of cellulose and hemicellulose. These polymers are consisted in individual molecules of glucose and xylose, through some thermophilic bacteria, can metabolize these carbohydrates in ethanol. Therefore, this study reports on using the principals carbon sources of lignocellulosic biomass (cellulose, glucose, and xylose), and producing ethanol through microbial consortium from anaerobic and thermophilic inoculum.

The biomass was submitted to variation of pH (2,3,4,5,6, and 7) and two kinds of medium, due to ethanol production in batch reactors. For ethanol production, the optimized pH and medium were 7,0 and *Thermoanaerobacter ethanolicus* medium, respectively. The enriched culture was being cultivated in pH and medium experiments were used to ethanol production experiments that carried out in batch reactors, from cellulose, glucose and xylose were realized in triplicate and were maintained at 55°C, in both batches had a control reactor (without these organics substrates). Positive results in ethanol yields were 1,73 mol ethanol/ mol glucose and 1,33 mol ethanol/ mol xylose. In cellulose's reactors the microbial consortium was efficient in substrate degradation, however, was obtained lower ethanol yields (1,88 mol ethanol/ g cellulose). In control reactors from glucose, cellulose and xylose, that yeast extract was the unique organic source, ethanol production was 1,27 mmol/L, 0,39 mmol/L e 1,65 mmol/L, respectively. In all reactors were detected acetic, butyric and propionic acids. The acetic acid production was 5,73 mmol/L, 9,73 mmol/L e 14,45 mmol/L in glucose, cellulose and xylose reactors, respectively. For glucose's reactors were observed lower hydrogen production (0,31 mol hydrogen/ mol glucose), in the other reactors did not observed gases production. Instead of the following yields were obtained: 6,6 mmol methane/ g cellulose and 0,68 mol methane/ mol xylose. Taking this into account, microbial consortium enriched had characteristics to degrade cellulose and metabolize glucose and xylose to ethanol.

Key-words: anaerobic digestion, cellulolytic bacteria, lignocellulosic biomass, methane.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3-1: Estrutura molecular da celulose (DP = grau de polimerização).....	28
Figura 3-2: Estrutura de Celulossoma.....	30
Figura 3-3: Rota metabólica das bactérias termófilas anaeróbias a partir de biomassa lignocelulósica. a) Via EMP; b) Via pentose-fostato para xilose; c) Fermentação. (Adaptada de Chang e Yao, 2011).....	24
Figura 4-1: Etapa 1: Obtenção de consórcio microbiano.....	34
Figura 4-2: Etapa 2 – Ensaio de Produção de Etanol	35
Figura 5-1: Microscopia óptica da biomassa do inóculo: (a) leveduras, (b) bacilos, (c) e (d) sarcinas.....	43
Figura 5-2: Produção de etanol em diferentes valores de pH e meios de cultivo	45
Figura 5-3: Comparação entre os meios de cultivo avaliando a degradação da produção de etanol e hidrogênio: Meio <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> e Meio Del Nery.....	46
Figura 5-4: Produção de etanol, ácido acético e metano em reatores em batelada com glicose (a), xilose (b) e celulose (c).....	48
Figura 5-5: Produção de CH ₄ , H ₂ e CO ₂ , com biomassa da diluição 10 ⁻⁷ para cada substrato.....	51
Figura 5-6: Ensaio de produção de etanol em função do tempo. a) Produção de H ₂ e CH ₄ em reator em batelada controle. b) Produção de H ₂ e CH ₄ em reator em batelada com glicose. c) Produção de ácidos e etanol e concentração de glicose em reator em batelada controle. d) Produção de ácidos e etanol e concentração de glicose em reator em batelada com glicose. .	53
Figura 5-7: Produção de ácidos orgânicos e alcoóis em reator em batelada com glicose e reator em batelada controle com extrato de levedura	54
Figura 5-8: Fotos dos reatores em batelada com celulose	56
Figura 5-9: Ensaio de produção de etanol em função do tempo. a) Produção de H ₂ e CH ₄ em reator em batelada controle. b) Produção de H ₂ e CH ₄ em reator em batelada com celulose. c) Produção de ácido acético e etanol em reator em batelada controle. d) Produção de ácido acético e etanol em reator em batelada com celulose	57
Figura 5-10: Rota metabólica para degradação de celulose em co-cultura.....	59
Figura 5-11: Produção de ácidos orgânicos e álcoois em reator em batelada com celulose e reator controle	60
Figura 5-12: Ensaio de produção de etanol em função do tempo. a) Produção de H ₂ e CH ₄ em reator em batelada controle. b) Produção de H ₂ e CH ₄ em reator em batelada com xilose. c)	

Produção de ácidos e etanol em reator em batelada controle. d) Produção de ácidos e etanol em reator em batelada com xilose.....	62
Figura 5-13: Produção de ácidos orgânicos e alcoóis em reator em batelada com xilose e em reator em batelada controle.....	63
Figura 5-14: Dendograma Domínio <i>Archaea</i> para os reatores com xilose, glicose e celulose	68
Figura 5-15: Dendograma Domínio Bacteria para os reatores com xilose, glicose e celulose	69
Figura 7-1: Ajuste de Produção de Etanol a partir de glicose.....	77
Figura 7-2: Ajuste de Produção de Etanol a partir de celulose.....	77
Figura 7-3: Ajuste de Produção de Etanol a partir de xilose	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 3-1: Comparação energética de algumas reações comuns na acidogênese	23
Tabela 4-1: Composição do meio Del Nery.....	36
Tabela 4-2: Composição da Solução de vitaminas	36
Tabela 4-3: Composição do meio para <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	36
Tabela 4-4: Solução de vitaminas	37
Tabela 4-5: Solução de minerais modificada por Wolfe.....	37
Tabela 5-1: Análise comparativa da produção de etanol por bactérias anaeróbias termófilas	66
Tabela 5-2: Potencial de produção de EtOH, Taxa máxima de Produção, Fase <i>lag</i> e R ² obtidos da equação de Gompertz modificada	67

LISTAS DE SIGLAS

ATP – Adenosina Tri-fosfato

DGGE – Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante

DNA – Ácido desoxirribonucléico

EIA – *U.S. Energy Information Administration*

EMP – via Embden Meyerhof Parnas

FADH₂ – Flavina-adenina Dinucleotídeo reduzida

FID – Detector de Ionização em Chama

H – Índice de diversidade de Shannon - Wiener

NADH₂ – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzida

NADPH₂ – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzida

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PFL – Piruvato Formiato Liase

PFOR – Piruvato Ferredozina Oxidorredutase

pH – Potencial Hidrogeniônico

RNA – Ácido Ribonucléico

SHF – *Separate hydrolysis and fermentation*

SSF – *Simultaneous saccharification and fermentation*

UASB – Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*)

U/L – Atividade enzimática por litro

YAS – Yellow affinity substance

SUMÁRIO

1	Introdução	19
2	Objetivo Geral	21
2.1	Objetivos específicos.....	21
3	Revisão Bibliográfica	22
3.1	Produção biológica de etanol	22
3.2	Biomassa Lignocelulósica.....	27
3.3	Celulose	28
3.4	Hemicelulose	31
4	Material e métodos	33
4.1	Esquema operacional.....	33
4.2	Obtenção de consórcio microbiano	35
4.2.1	Inóculo	35
4.2.2	Meio Nutricional	35
4.2.3	Definição de pH inicial	38
4.2.4	Definição do Meio de cultura.....	38
4.2.5	Adaptação ao substrato	38
4.2.6	Inibição metanogênica	39
4.3	Ensaio de produção de etanol	39
4.4	Análises cromatográficas	40
4.4.1	Determinação de etanol e ácidos orgânicos voláteis.....	40
4.4.2	Determinação de Hidrogênio, Metano e CO ₂	40
4.4.3	Determinação de carboidratos.....	40
4.5	Análises físico-químicas.....	41
4.6	Caracterização Microbiana.....	41
4.6.1	Exames Microscópicos	41
4.6.2	Biologia molecular	41
4.7	Cinética de Dados.....	42
5	Resultados e Discussões	43
5.1	Obtenção de consórcio microbiano	43
5.1.1	Caracterização do consórcio microbiano	43
5.1.2	Definição de pH e meio de cultivo.....	44

5.1.3	Adaptação da biomassa aos substratos orgânicos	47
5.1.4	Inibição das arqueias metanogênicas	50
5.2	Produção de Etanol.....	52
5.2.1	Produção de etanol a partir de Glicose.....	52
5.2.2	Produção de etanol a partir de celulose.....	56
5.2.3	Produção de etanol a partir de xilose	61
5.3	Considerações Finais	65
5.4	Cinética da produção de etanol	67
5.5	Biologia Molecular.....	68
6	Conclusões.....	70
7	Sugestões	71
8	Referências Bibliográficas.....	72

1 Introdução

O cenário mundial é caracterizado por uma preocupante crise energética definida principalmente pela escassez dos combustíveis fósseis, pelos impactos ambientais perduráveis causados pelo uso destes combustíveis e a demanda excessiva por energia. Esses problemas são protagonizados por fatores como o crescimento populacional, desenvolvimento industrial e melhoramento no padrão de vida dos países desenvolvidos.

Segundo os dados apresentados pela U.S. Energy Information Administration (EIA), o consumo mundial de petróleo e combustíveis líquidos, correspondeu a 94 milhões de barris/dia em 2014, com estimativa de aumento para 97 milhões de barris/dia em 2020 e 115 milhões de barris/dia em 2040 (EIA, 2014).

Portanto, a extração indiscriminada destes combustíveis fósseis afeta diretamente as reservas de carbono subterrâneas, agravando assim, a questão de disponibilidade deste recurso como fonte de energia. Além disso, é inevitável a geração de CO₂ como produto final a partir do uso desses combustíveis, atribuindo-lhes os principais problemas ambientais enfrentados atualmente, tais como, a emissão de gases causadores do efeito estufa, chuva ácida e mudanças climáticas (Agarwal, 2007).

Desta forma, para satisfazer a crescente demanda e minimizar os impactos ambientais, tem-se a necessidade de ampliar investimentos em pesquisa e produção de energia renovável.

Os biocombustíveis, tais como, biogás, alcoóis primários, óleo vegetal e biodiesel são considerados fontes de energia renovável, uma vez que, para sua obtenção utiliza-se biomassa vegetal como recurso alternativo para a sua produção. Entretanto, a aplicação dessas alternativas energéticas envolve questões econômicas consideráveis, como tecnologia disponível, custos e rendimentos de produção (Agarwal, 2007). Entre esses, o etanol é o biocombustível de maior destaque, devido a sua competitividade energética com o combustível produzido a partir do petróleo, a gasolina, cuja produção tecnológica já está adequadamente definida.

O etanol é um álcool primário produzido a partir da fermentação de açúcares da biomassa vegetal, dentre essas, destaca-se milho, beterraba, mandioca, trigo, cana de açúcar e recentemente, a biomassa lignocelulósica (Balat e Balat, 2009). A produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica é possível devido a sua estrutura composta por celulose e hemicelulose (Rubin, 2008). Desta forma, vê-se vantajosa a utilização desse recurso, pois possibilita o uso de resíduos agrícolas e industriais lignocelulósicos, aumentando assim, a

produção de energia sem investir em novas áreas plantadas, além de diminuir a competição por culturas alimentares.

Entretanto, têm-se alguns entraves para o uso da biomassa lignocelulósica como fonte de carbono. A conversão da celulose e hemicelulose em carboidratos disponíveis para a fermentação requer um mecanismo específico de hidrólise. Mecanismos físico-químicos e mecânico podem auxiliar na desestruturação dessas moléculas, mas apenas enzimas hidrolíticas produzidas por certos microrganismos são capazes de intervir nesta biomassa e quebrar as cadeias longas em carboidratos simples, como a glicose e xilose (Sanderson, 2011).

Alguns microrganismos anaeróbios e termófilos semelhantes a *Clostridium* produzem enzimas capazes de desestruturar as moléculas de celulose e hemicelulose, clivando-as em moléculas menores de glicose e xilose (Lynd et al, 2012).

Desta forma, estudar as principais fontes de carbono disponíveis a partir da biomassa lignocelulósica, tais como celulose, xilose e glicose, possibilita a compreensão do metabolismo dos microrganismos capazes de degradar esses carboidratos e a formação de compostos finais, facilitando assim, o direcionamento para a produção de etanol.

Perante a biodiversidade de microrganismos existentes no lodo de reator UASB utilizado para o tratamento de vinhaça em condições anaeróbias e termófilas, o presente estudo propôs selecionar microrganismos celulolíticos e fermentativos e avaliar as rotas metabólicas na degradação de celulose, glicose e xilose, visando favorecer a produção de etanol.

Tendo em vista, poucos relatos na literatura referentes a produção de etanol a partir de consórcio microbiano termófilo e anaeróbio, utilizando xilose e celulose como substratos, o presente trabalho torna-se relevante para contribuir com as pesquisas de produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica.

2 Objetivo Geral

O principal objetivo foi utilizar as principais fontes de carbono da biomassa lignocelulósica, tais como, celulose, glicose e xilose para a produção de etanol, a partir de inóculo termófilo e anaeróbio, favorecendo a predominância de bactérias celulolíticas e fermentativas produtoras de etanol, e obter eficiência na degradação dos substratos.

2.1 Objetivos específicos

- Selecionar meio de cultivo com nutrientes e vitaminas que favoreçam bactérias produtoras de etanol;
- Avaliar a faixa de pH ideal para o crescimento de bactérias anaeróbias produtoras de etanol;
- Avaliar o crescimento de consórcio microbiano em condições termófilas e anaeróbias, com diferentes açúcares;
- Avaliar os rendimentos de produção de etanol e produtos finais pelo consórcio microbiano a partir de diferentes açúcares;
- Avaliar a diversidade do Domínio Bacteria e Archaea do consórcio anaeróbio termófilo

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Produção biológica de etanol

Algumas bactérias e fungos são capazes de fermentar carboidratos e produzir etanol. O fungo *Saccharomyces cerevisiae* é o principal microrganismo utilizado para a produção de etanol em escala industrial, devido à sua capacidade de crescimento em condições facultativas, por metabolizar sacarose, glicose e frutose em temperatura de 26° a 32°C, e sintetizar principalmente etanol, CO₂ e glicerol. Teoricamente, sob tais condições tem-se rendimento de 0,511 g de etanol, 0,489 g de CO₂ e 0,036 g de glicerol, por grama de glicose metabolizada (Bai et al, 2008). Porém, este microrganismo é incapaz de fermentar todas as pentoses e hexoses da biomassa lignocelulósica.

A fermentação de xilose pelos fungos *Pichia stipitis* e *Candida shehatae* leva a rendimentos razoáveis de etanol. No entanto, ao submeter a biomassa lignocelulósica a pré-tratamentos e hidrólise, esses fungos são inibidos pela produção de compostos tóxicos, como hidroximetilfurfural e furfural decorrentes normalmente de pré-tratamentos em altas temperaturas (Delgenes et al, 1996).

Portanto, os fungos não metabolizam ampla gama de substrato para a produção de etanol, e desta forma, diante da ampla diversidade de bactérias com diferentes capacidades fisiológicas em degradar diversos substratos com produção de ácidos e álcoois, vê-se vantajoso o uso desses microrganismos para a produção de etanol. A produção de etanol por bactérias ocorre em condição aeróbia e anaeróbia. Bactérias aeróbias semelhantes a *Zymomonas mobilis* produz eficientemente etanol a partir de hexoses, como glicose e frutose, mas não metabolizam xilose (Hägerdal et al, 2006). Desta forma, é desinteressante o uso dessa bactéria devido a restrição de substrato e a demanda por oxigênio.

As bactérias anaeróbias são as principais candidatas a produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica, devido a sua ampla diversidade fisiológica. Esses microrganismos são capazes de degradar a biomassa e fermentá-la em produtos finais com significativo valor energético.

A digestão anaeróbia é o processo biológico responsável pela conversão de compostos orgânicos em energia e que ocorre sem a presença de oxigênio. Suas etapas são definidas em hidrólise, acidogênese, acetogênese, homoacetogênese e metanogênese. Os grupos de microrganismos envolvidos na digestão são: (1) Bactérias hidrolíticas e fermentativas

(acidogênese) responsáveis por hidrolisar e fermentar substratos orgânicos em ácidos graxos e alcoóis com produção ou consumo de H_2 , (2) Bactérias acetogênicas, estas convertem os ácidos graxos em acetato e H_2 , (3) Arquéias metanogênicas (acetoclásticas e hidrogenotróficas) convertem acetato e H_2 em CO_2 e CH_4 , e por fim, (4) Bactérias homoacetogênicas que convertem H_2 e CO_2 em acetato (Saady, 2013).

A produção de etanol ocorre na acidogênese, juntamente com a produção de ácidos graxos (Saady, 2013). Na acidogênese tem-se a produção de ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico e etanol. Por exemplo, a partir da molécula de glicose é possível obter a produção máxima de 2 mols de ácido acético, 2 mols de ácido propiônico, 1 mol de ácido butírico e 2 mols de etanol. A partir da avaliação da variação da energia livre de Gibbs (ΔG), a produção de etanol é termodinamicamente menos favorável em relação a produção dos ácidos orgânicos (Tabela 3.1).

Tabela 3-1: Comparação energética de algumas reações comuns na acidogênese

			ΔG^0 (kJ)
Glicose – ácido acético	$C_6H_{12}O_6 + H_2O$	$\rightarrow 2CH_3COOH + 4H_2 + 2CO_2$	-206
Glicose – ácido propiônico	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2$	$\rightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2H_2O$	-279,4
Glicose – ácido butírico	$C_6H_{12}O_6$	$\rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2$	-254
Glicose – etanol	$C_6H_{12}O_6$	$\rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$	-164,8

Fonte: Adaptada de Saady, 2013

A inibição da metanogênese favorece o acúmulo dos produtos finais da acidogênese, tais como etanol e ácidos, e pode ser estabelecida por tratamento ácido, altas temperaturas (Kim et al, 2006) e de acordo com o tempo de crescimento dos microrganismos e disponibilidade de substratos (Raskin et al, 1994). Raskin et al (1994) constataram que devido ao crescimento lento das metanogênicas, período longo foi necessário para se estruturar a comunidade microbiana. A partir da análise molecular do RNA ribossômial 16S, os autores caracterizaram a comunidade microbiana em reatores mesófilos e termófilos de tratamento de resíduos sólidos, visando definir o período de arranque do digestor. Os autores verificaram que para se estabelecer a presença de metanogênicas foi preciso elevado tempo de retenção nos digestores (20 dias). As espécies da ordem *Methanobacteriales* foram as principais metanogênicas hidrogenotróficas presentes em ambos os reatores, em contrapartida, *Methanosaeta* sp. e *Methanosarcina* sp. estavam presentes, mas em concentrações relativamente baixas, principalmente no reator termófilo.

Desta forma, evitar longo período de incubação e acúmulo de ácidos favorece a inibição das metanogênicas por falta de substrato disponível. Sendo assim, é possível direcionar e favorecer a presença apenas de bactérias celulolíticas e fermentativas a partir de fatores nutricionais do meio de cultivo, pH e concentração de substrato (Kim et al, 2006).

Chang e Yao (2011) estudaram o mecanismo metabólico das bactérias anaeróbicas termófilas fermentativas, capazes de metabolizar açúcares obtidos da biomassa lignocelulósica. Os autores concluíram que a via Embden Meyerhof Parnas (EMP) é a utilizada para metabolizar a glicose (Figura 3.3a). Para a xilose, estas bactérias termófilas utilizam a via pentose-fosfato (não-oxidativa) que converte este açúcar em Gliceraldeído 3-P (Figura 3.3b) seguindo, a partir da fase intermediária, o processo de glicólise via EMP para a fermentação (Figura 3.3c).

Figura 3-1: Rota metabólica das bactérias termófilas anaeróbicas a partir de biomassa lignocelulósica. a) Via EMP; b) Via pentose-fostato para xilose; c) Fermentação.(Adaptada de Chang e Yao, 2011).

Portanto, as bactérias anaeróbias termófilas são capazes de degradar, tanto a glicose, quanto a xilose, com rendimentos similares na produção de etanol, ácido acético, ácido lático, ácido fórmico e hidrogênio. Teoricamente, o rendimento para a produção de etanol é de 1,67 moles de etanol por mol de xilose (1), e 2 moles de etanol por mol de glicose (2).

Shaw et al (2008) analisaram a rota metabólica da bactéria *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* por meio de ensaios enzimáticos e seqüenciamento genômico. Os autores verificaram a produção de etanol a partir de xilose (4g/L), através da reação de descarboxilação do piruvato, na qual as enzimas piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFOR) e piruvato formiato liase (PFL) catalisam essa reação (Figura 3.3c). Os autores, em seus ensaios em batelada, verificaram a produção em porcentagem molar de, 2-5% de ácido lático, 20-30% de ácido acético, 40-60% de hidrogênio e 65-80% de etanol.

Lin e Hung (2008) estudaram o desempenho de consórcio microbiano obtido a partir de esterco bovino na degradação de celulose, glicose e xilose visando à produção de hidrogênio e etanol. Primeiramente, foram testados o inóculo *in-natura*, o inóculo pré-tratado (100°C por 45 minutos) e o inóculo após enriquecimento da população microbiana por cultivo a 55°C por 4 dias. Os autores obtiveram, tanto para a degradação de celulose e xilose, quanto para a produção de hidrogênio e etanol, melhores rendimentos com inóculo enriquecido. Além disso, obtiveram melhores resultados com o inóculo *in natura* em relação aquele pré-tratado em alta temperatura. Isso foi devido ao fato de que em altas temperaturas ocorreu a inibição das metanogênicas e favoreceu as bactérias formadoras de endósporo. Entretanto, para o consórcio microbiano do esterco bovino, a alta temperatura afetou a produção de hidrogênio a partir da degradação da celulose e xilose, provavelmente devido à dominância de microrganismos produtores de etanol que não formam endósporos.

Lin e Hung (2008) também avaliaram a interferência do pH para a degradação de celulose, em diferentes faixas de pH, os quais resultaram em diferentes tempos de concentração de açúcares na degradação da celulose. Em pH 6,0 e 6,5, o acúmulo de açúcares iniciou após 25 horas de ensaio, em contrapartida para as demais faixas, não verificou-se

acumulo antes de 50 horas. Porém, os maiores picos de produção de hidrogênio e etanol foram observados em pH 7,5. Para a xilose em pH 7,5, verificou-se similar tendência nos rendimentos. Desta forma, os autores obtiveram resultados satisfatórios nas condições: consórcio microbiano enriquecido e pH ajustado 7,6 a 8,0, com rendimentos de 2,8 mmol H₂/g-celulose, 5,8 mmol EtOH/g-celulose, 0,3 mol H₂/g-xilose e 1 mol EtOH/g-xilose.

Zhao et al (2010) analisaram a influência do pH e concentração de xilose para a produção de etanol em condição termófila (70°C). Os autores obtiveram para pH 5,5 e 2g/L de xilose, rendimento de 1,60 mol etanol/mol-xilose. Por meio da análise de sequenciamento, os autores constataram bactérias semelhantes a *Thermoanaerobacter* sp.

Sigurbjornsdottir e Orlysson (2012) em seus estudos com a bactéria *Thermoanaerobacterium* AK₅₄ avaliaram que a concentração de substrato interferiu no metabolismo dessa bactéria. A produção de etanol diminuiu de 939,8 mg/L para 525,2mg/L em relação ao aumento da concentração de glicose de 3,6 g/L para 9,0 g/L, respectivamente. A degradação completa da glicose ocorreu em 24 horas, com produção de 115,2 mg/L EtOH/h. A bactéria também foi cultivada em celulose, xilose, extrato de levedura, galactose, frutose, manose, lactose, sacarose e nos hidrolisados de diferentes tipos de biomassa, como papel de filtro (celulose), cânhamo, folhas, jornal, palha de cevada e grama. Os resultados obtidos com maior rendimento de etanol foram 1,91 g/L em lactose e 1,36 g/L em hidrolisado de celulose tratada com ácido sulfúrico. Para xilose, os rendimentos de etanol observados foram de 0,67 g/L.

Portanto, a produção de etanol a partir de bactérias termófilas é relevante no uso da biomassa lignocelulósica como fonte de carbono, devido a possibilidade dessas bactérias de metabolizar diversos substratos, produzindo diversos metabólitos e também etanol.

Sendo assim, obter um consórcio microbiano termófilo favorecendo bactérias celulolíticas e fermentativas capazes de metabolizar celulose e xilose em etanol, é extremamente atrativo para a viabilidade da produção de etanol de segunda geração. Desta forma, o presente trabalho pretendeu-se buscar esse consórcio microbiano e compreender suas vias metabólicas ao se degradar a celulose e xilose, comparando seu desempenho a partir de glicose, por ser o açúcar de menor complexidade, buscando sempre favorecer a rota de produção de etanol.

3.2 Biomassa Lignocelulósica

O potencial energético da biomassa lignocelulósica é devido a sua atividade fotossintética, que absorve energia solar e armazena-a como energia termoquímica na parede celular das plantas, compondo assim, sua estrutura complexa de celulose e hemicelulose, recobertas por lignina (Rubim, 2008). A celulose é o principal constituinte dessa biomassa, seguida de hemicelulose, lignina, cinzas, proteínas e pectinas, variando a proporção de acordo com o tipo de biomassa (Pandey et al, 2000).

Muitas vezes, esta biomassa é disposta na forma de resíduos agrícolas e industriais, tais como, bagaço de cana de açúcar, palha de milho e trigo, papel, gramíneas, lascas de madeiras, entre outros (Sun e Cheng, 2002). A viabilidade destes resíduos para a produção de energia é decorrente da distribuição de celulose e hemicelulose. O bagaço de cana-de-açúcar é constituído de aproximadamente 50% de celulose, 25% de hemicelulose, e 25% de lignina. A palha do milho é composta por 45% de celulose, 35% de hemicelulose e 15% de lignina; em contrapartida, para o papel tem-se maior porcentagem de celulose; ou seja, de 85 a 99% (Pandey et al, 2000; Sun e Cheng, 2002).

Entretanto, a utilização da biomassa lignocelulósica para a produção de etanol, denominada de Etanol de 2^o Geração, envolve dois processos distintos: a hidrólise da celulose e hemicelulose em açúcares e a fermentação destes açúcares em etanol. Duas tecnologias são usadas para obtenção de etanol: (1) Hidrólise enzimática separada da fermentação (*Separate hydrolysis and fermentation*, SHF), tradicional no processo de obtenção de etanol desde 1980, e (2) Hidrólise enzimática e fermentação simultâneas (*Simultaneous saccharification and fermentation*, SSF), normalmente com adição de enzimas comerciais (Chang, 2011).

A etapa de hidrólise enzimática por adição de enzimas comerciais encarece a produção de etanol de segunda geração, ocasionando entraves para a viabilidade dessa tecnologia. Em relação ao custo das enzimas comerciais, tem-se ampla variação econômica, no decorrer dos anos, sem nenhuma tendência ao decréscimo (Olson et al, 2011). Além disso, para aplicação da SHF, é preciso investir em equipamentos específicos para a etapa de hidrólise, e na etapa de SSF, as condições de temperatura da hidrólise enzimática, entre 45^o a 60^oC, excedem a condição requerida por leveduras e bactérias mesófilas que, normalmente são usadas para a fermentação de etanol (Kumagai et al, 2014).

O pré-tratamento da biomassa é proposto nas duas tecnologias, pois possibilita desestruturar o arranjo das moléculas da biomassa, removendo lignina e hemicelulose, e diminuindo a cristalinidade da celulose por aumento de sua porosidade, facilitando assim, a

ação de enzimas hidrolíticas. Os pré-tratamentos podem ser por mecanismos físicos (trituração e moagem), físico-químicos (explosão a vapor e hidrotérmico) e químicos (alcalino, ácido diluído, agentes oxidantes e solventes orgânicos) (Behera et al, 2014).

Desse modo, busca-se a redução dos custos para a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica, eliminando o uso de enzimas comerciais, favorecendo assim, o processo em única etapa de hidrólise e fermentação a partir de consórcios microbianos capazes de desestruturarem estas moléculas maiores e complexas em moléculas menores e açúcares fermentáveis, e, por conseguinte, produzir etanol.

3.3 Celulose

Considerada como recurso renovável, a celulose é um polímero natural que recentemente está sendo estudada com enfoque na produção de bioenergia, devido ao seu alto valor energético, disponibilidade ambiental, e por sua aplicação no mercado industrial na produção de papel (Habibi et al, 2010).

A fórmula molecular da celulose $(C_6H_{10}O_5)_n$ foi definida pelo químico francês Anselme Payen, em 1838. Anos após, em 1920, por meio dos estudos pioneiros de Hermann Staudinger, elucidou-se a estrutura polimérica da celulose, através da acetilação e desacetilação da molécula. O pesquisador observou que a celulose não é formada apenas por unidades agregadas de D-glicose, mas, por ligações covalentes entre essas unidades, formando cadeias longas de D-glicose (Klemm et al, 2005).

Desta forma, a celulose pode ser caracterizada como um homopolímero de ligações β -1,4 de unidades de D-glicopirranose, sendo que cada cadeia contém duas extremidades: uma redutora (hemiacetal) e uma extremidade não redutora (grupo hidroxil pendente) (Habibi et al, 2010), como observado na Figura 3.1.

Figura 3-2: Estrutura molecular da celulose (DP = grau de polimerização)

Fonte: Habibi et al, (2010).

A estrutura hierárquica da celulose é estabilizada por ligações de hidrogênio, intramoleculares e intermoleculares, aos grupos hidroxilas, formando cadeias longas que também se sobrepõem entre si por ligações fracas de van der Waals. Estas ligações geram alta rigidez na estrutura, proporcionando elevado grau de organização cristalina, dificultando a penetração de enzimas e pequenas moléculas como a água (Lynd et al, 2002; Klemm et al, 2005).

Diante destas características que conferem a celulose rigidez e insolubilidade, a utilização desta como fonte de energia, exige um complexo mecanismo enzimático capaz de desestruturar e hidrolisar a molécula de celulose em glicose.

Alguns fungos e bactérias são capazes de degradar a celulose a partir da produção de enzimas. Dentre os fungos tem-se os seguintes exemplos: *Bulgaria*, *Chaetomium*, e *Helotium* (Ascomicetos); *Coriolus*, *Phanerochaete*, *Poria*, *Schizophyllum* e *Serpula* (Basidiomicetos); e *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, e *Trichoderma* (Deuteromicetos). Entre as bactérias têm-se as anaeróbias pertencentes ao gênero *Clostridium*, *Ruminococcus*, e *Caldicellulosiruptor*, além das aeróbias do gênero *Cellulomonas*, *Thermobifida*, *Cytophagae*, *Sporocytophaga* (Lynd et al, 2002).

Além desses exemplos deve-se ressaltar a importância das bactérias celulolíticas termófilas da classe *Clostridia*, tais como *Clostridium thermocellum*, *Clostridium cellobioparum* e *Clostridium cellulovorans*. Estes microrganismos possuem um sistema multi-enzimático extracelular conhecido como celulosoma (Lynd et al, 2002).

Celulosoma é um complexo enzimático constituído por uma proteína estrutural denominada escafoldina, que possui 9 domínios de ligações a subunidade catalítica. A interação desse complexo multi-enzimático é mediada por 22 resíduos de aminoácidos denominados domínios coezima que se ligam aos domínios da querina, encontrados nas subunidades catalíticas dos celulosomas. Além disso, esta proteína estrutural possui um módulo de ligação à celulose, denominado módulo de ligação a hidratos de carbono (*Carbohydrate-binding modules* - CBM), que facilita a hidrólise da celulose, aproximando o domínio catalítico com o substrato, iniciando a atividade das exoglucanases (Schwarz, 2001).

Figura 3-3: Estrutura de Celulossoma

Fonte: Schwarz, (2001)

Dessa forma, trabalhar em condições anaeróbias e termófilas favorece a presença de bactérias semelhantes a *Clostridium*, suscitando assim, condições ao inóculo de degradar a celulose. Lin e Hung (2008) obtiveram a partir de esterco bovino submetido à condição termófila, consórcio microbiano capaz de hidrolisar a celulose e xilose. Entretanto, os autores observaram interferência na digestão da celulose a partir de inóculo submetido a tratamento térmico (100°C por 45 minutos). A produção de hidrogênio a partir de celulose, com melhores resultados, foram obtidos após inóculo ser enriquecido em biorreator a 55°C por 4 dias. A produção acumulativa de hidrogênio (4,20 ml/g DQO) a partir de celulose (3 g/L) por inóculo enriquecido foi maior em relação ao inóculo *in natura* (0,45 ml/g DQO) e ao inóculo submetido ao tratamento térmico (0,22 ml/g DQO). Os autores não obtiveram produção significativa de compostos metabólitos (etanol, ácido acético e ácido butírico) para inóculo submetido a tratamento térmico. Sendo assim, os autores concluíram que o tratamento térmico além de inibir a atividade metanogênica implicou na digestão da celulose e xilose, pois selecionou apenas os microrganismos formadores de endósporo.

Yang et al (2009) verificaram que *Anaerocellum thermophilum*, termófila e anaeróbia cresceu a 75°C e pH 7,2, sendo capaz de metabolizar celulose, xilana, xilose, celobiose e pectina, e também biomassa lignocelulósica sem a aplicação de pré-tratamento. Os ensaios foram realizados em reatores em batelada alimentados com 5g/L de cada substrato descrito anteriormente. Os autores verificaram que o ácido acético foi o principal produto formado, seguido da produção de hidrogênio, entretanto, sem produção de etanol.

Outra evidência que favorece a condição termófila para degradar celulose é apresentada por Sasaki et al (2012). Os autores isolaram a bactéria celulolítica *Clostridium clariflavum*, a partir de biomassa de reator termófilo metanogênico usado no tratamento de chorume de aterro sanitário. Os autores compararam a degradação da celulose (10g/L) utilizando a cepa isolada de *C. clariflavum*, e também em co-cultura da mesma cepa com *Methanothermobacter thermautotrophicus*, visando avaliar a interferência de arqueias metanogênicas no processo de degradação. Os autores obtiveram degradação da celulose 2,9 vezes maior nos ensaios com co-cultura, quando comparado com a cultura pura, em 60 horas de incubação, com produção de acetato, lactato e etanol, avaliando positivamente a presença das arqueias na degradação da celulose.

Blume et al (2013) constataram que a bactéria *Clostridium thermocellum* isolada em pH 7 a 60°C, foi capaz de utilizar celulose e bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono para o seu desenvolvimento. Além disso, os autores verificaram a produção de uma substância amarela decorrente da degradação da celulose. Esta substância foi denominada YAS (*yellow affinity substance*), é produzida durante a ação de enzimas celulolíticas no substrato, ocasionando um indicativo da degradação da celulose.

Desta forma, o uso da celulose como substrato favorece a presença de bactérias celulolíticas no consórcio microbiano, compreender o metabolismo dessas bactérias para a degradação de celulose e produção de compostos finais e por fim, avaliar sua eficiência na produção de etanol.

3.4 Hemicelulose

O segundo maior polissacarídeo da biomassa lignocelulósica é a hemicelulose (20 a 30%). É um polímero natural contendo uma variedade de pentoses e hexoses, além de xilana (polímero β -1,4-D-xilose), como principal constituinte. Diferentemente da celulose, sua cadeia de carboidratos são menores, proporcionando flexibilidade e melhor acesso a hidrólise enzimática (Chang e Yao, 2011).

Por meio do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica em água quente sob alta temperatura e pressão (tratamento hidrotérmico) é possível solubilizar a hemicelulose, devido a característica ácida dos grupos acetil e lignina que envolve a matriz desse polímero, liberando assim, por hidrólise ácida, moléculas menores de xilose (Alvira et al, 2010). Desta forma, direcionar o foco para o estudo da degradação da molécula de xilose é relevante,

devido a necessidade do pré-tratamento hidrotérmico aplicado a biomassa lignocelulósica, que hidrolisa a hemicelulose em xilose.

Para a degradação da xilose com produção de etanol, novamente destaca-se as bactérias termófilas, pois são capazes de fermentar pentoses e hexoses, e em alguns casos, produzir enzimas que degradam diversos polímeros, entre esses, celulose e hemicelulose (Lynd et al, 2002). Microrganismos da classe *Clostridia*, da ordem *Thermoanaerobacterales* podem facilmente utilizar hemicelulose como fonte de carbono, e os gêneros *Thermoanaerobacter* e *Thermoanaerobacterium* são os mais estudados para a produção de etanol de segunda geração (Chang e Yao, 2011).

Thermoanaerobacter ethanolicus é uma bactéria anaeróbia, termófila, não formadora de endósporo capaz de fermentar hexoses e pentoses, e produzir etanol e CO₂, com produção mínima de acetato e lactato (Wiegel e Ljungdahl, 1981). Similar a essa bactéria, *Thermoanaerobacter saccharolyticum* também é capaz de utilizar os açúcares obtidos da hidrólise da celulose e hemicelulose, com produção de ácidos e álcoois (Shaw et al, 2008).

Sveinsdottir et al (2009) estudaram as características de cepas do gênero *Thermoanaerobacterium*, *Thermoanaerobacter* e *Paenibacillus*, e obtiveram resultados de pH ótimo de 5,0 a 6,0, 6,0 a 7,0 e 8, respectivamente. Todos os microrganismos analisados foram capazes de metabolizar monômeros de glicose e xilose em etanol, com produção baixa de acetato e hidrogênio. Nos ensaios com biomassa lignocelulósica anteriormente submetida a tratamento ácido e hidrolisada por enzimas comerciais, os resultados obtidos apontaram produções variáveis de etanol de 662,4 mg/L e 1,07 mg/L, correspondendo a rendimentos percentuais de 52 – 75% em relação ao rendimento teórico por glicose.

Sigurbjornsdottir e Orlygsson (2012) avaliaram a produção de compostos finais por *Thermoanaerobacterium* AK₅₄ (99% de similaridade com *Thermoanaerobacterium aciditolerans*) a partir de diferentes substratos orgânicos (extrato de extrato de levedura, xilose, glicose, galactose, frutose, manose, lactose e sacarose), cada um com 20 mM. Os autores concluíram a partir de seus ensaios em batelada que ocorreu a degradação de todos os substratos com produção principalmente de ácido acético e etanol. Foi observada também a produção de hidrogênio e dióxido de carbono. Entretanto, o melhor desempenho ocorreu com lactose, com produção de 1,9 g/L de etanol. Todavia, na presença de glicose verificou-se a produção de 1,1 g/L de etanol.

4 Material e métodos

A realização deste trabalho consistiu em obter bactérias celulolíticas e fermentativas a partir de lodo de reator UASB usado no tratamento de vinhaça, a partir de diferentes substratos, tais como celulose, glicose e xilose, em condição termófila, visando à produção de etanol.

4.1 Esquema operacional

O presente trabalho foi dividido em duas etapas consecutivas: (1) obtenção de consórcio microbiano termófilo e adaptação do inóculo ao substrato (Etapa 1) e (2) ensaios de produção de etanol (Etapa 2) (Figuras 4.1 e 4.2).

Na Etapa 1 procedeu-se a obtenção de consórcio microbiano termófilo e adaptação do inóculo ao substrato por meio de reatores em batelada incubados a 55°C, inoculados com 10% do volume reacional em suspensão microbiana proveniente do lodo de reator UASB empregado no tratamento de vinhaça. Inicialmente, pretendeu-se favorecer o crescimento de bactérias celulolíticas e fermentativas produtoras de etanol, variando-se pH (2,3,4,5,6,e7) e meios de cultivo (*Thermoanaerobacter ethanolicus* e Del Nery). O acompanhamento do crescimento foi feito indiretamente por meio da avaliação de produção de etanol e hidrogênio (Figura 4.1).

Após definição dos valores de pH e meio de cultivo favoráveis a produção de etanol, o consórcio microbiano pré-selecionado foi submetido ao crescimento com substratos específicos, em reatores em batelada distintos alimentados 1g/L de celulose, 1 g/L de glicose e 1g/L de xilose, por período de 30 dias, visando fornecer ao consórcio microbiano, uma única fonte de carbono específica, sendo assim, restringindo a população de microrganismos apenas aos que possuem a capacidade de degradar celulose, glicose e xilose, separadamente.

Etapa 1

Figura 4-1: Etapa 1: Obtenção de consórcio microbiano

Os ensaios de produção de etanol foram realizados na etapa 2 . Os ensaios foram realizados mantendo-se a adaptação do inóculo aos diferentes substratos (celulose, glicose e xilose) com meio de cultura *Thermoanaerobacter ethanolicus* ajustado a pH 7, ambos definidos na etapa 1, visando avaliar a eficiência desse consórcio microbiano para a produção de etanol e demais produtos. Para cada reator, foi feito um reator controle nas mesmas condições de pH e meio de cultivo, entretanto, sem a adição do substrato, no caso, glicose, celulose e xilose, e desta forma, o extrato de levedura (2g/L) foi a única fonte orgânica presente. O acompanhamento dos resultados foi feito por análise cromatográfica, análise físico-química e biologia molecular (Figura 4.2).

Etapa 2

Figura 4-2: Etapa 2 – Ensaio de Produção de Etanol

4.2 Obtenção de consórcio microbiano

4.2.1 Inóculo

Para obtenção de bactérias celulolíticas e fermentativas foi utilizado inóculo proveniente de lodo granulado de reator anaeróbio termófilo de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB). Este sistema é utilizado para o tratamento de vinhaça, localizado na Usina São Martinho, Pradópolis, São Paulo.

4.2.2 Meio Nutricional

Os meios de cultura testados foram os seguintes: (1) meio Del Nery (Del Nery, 1987), modificado pela adição de extrato de levedura e das vitaminas biotina e B12 (Tabela 4.1 e 4.2), (2) meio para *Thermoanaerobacter ethanolicus* definido por ATLAS (2005) (Tabela 4.3, 4.4 e 4.5). A concentração dos componentes adicionados aos meios de cultura aplicados nos ensaios para 1L de água ultra-purificada estão delineados nas respectivas tabelas 4.1 e 4.2, respectivamente. Para a preparação do meio de cultivo Del Nery foram adicionados 2 ml de cada uma das soluções A, B C e D (Tabela 4.1) e 1 ml da solução de vitaminas (Tabela 4.2).

Tabela 4-1: Composição do meio Del Nery

Composição	Concentração (mg/L)
Solução A	
NiSO ₄ .6H ₂ O	0,50
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,50
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,25
CoCl ₂ .2H ₂ O	0,04
Solução B	
CaCl ₂ .6H ₂ O	2,06
Solução C	
SeO ₂	0,14
Solução D	
KH ₂ PO ₄	5,36
K ₂ HPO ₄	1,30
Na ₂ HPO ₄ H ₂ O	2,76
Uréia	40
Extrato de levedura	1000
Água ultra-purificada	1L

Fonte: Del Nery (1987) modificado

Tabela 4-2: Composição da Solução de vitaminas

Composto	(mg)
Ácido p-aminobenzóico	40
Vitamina B12	40
Biotina	10
Água ultra-purificada	1L

Fonte: Widdel & Pfenning (1984)

Tabela 4-3: Composição do meio para *Thermoanaerobacter ethanolicus*

Composição	(g)
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	4,2
Extrato de levedura	2
KH ₂ PO ₄	1,5
NH ₄ Cl	0,5
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,18
Solução de minerais modificada por Wolfe	5ml
Solução de vitaminas	0,5ml
Água ultra-purificada	1L

Fonte: Atlas, 2005

Tabela 4-4: Solução de vitaminas

Composição	Concentração (g/L)
Pyridoxina HCl	0,20
Ácido p-Aminobenzóico	0,1
Pantotenato de Cálcio	0,1
Ácido Nicotínico	0,1
Ácido Tióctico	0,1
Biotina	0,04
Ácido fólico	0,04
Riboflavina	0,01
Tiamina HCl	0,01
Vitamina B12	0,02
Água purificada	1L

Fonte: Atlas, 2005

Tabela 4-5: Solução de minerais modificada por Wolfe

Composição	Concentração (g/L)
MgSO ₄ 7H ₂ O	3,00
Ácido Nitrilotriacético	1,5
NaCl	1
MnSO ₄ H ₂ O	1
CaCl ₂ (anidro)	0,1
Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	0,1
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,1
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,1
AlK(SO ₄) ₂ (anidro)	0,01
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,01
H ₃ BO ₃	0,01
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,01
Na ₂ SeO ₃ (anidro)	0,001
Água ultra-purificada	1L

Fonte: Atlas, 2005

Os meios de cultivo, as soluções de vitaminas e a solução de minerais foram filtradas em sistema *Millipore* com membrana de tamanho de poro de 0,22µm, previamente esterilizado em autoclave a 121°C e 1 atm, por 20 minutos. Os meios de cultivo foram preparados anteriormente a cada experimento. As soluções de vitaminas foram armazenadas em frascos de antibióticos (30ml), sob fluxo de N₂, (100%) e condição de assepsia. Os frascos foram fechados com tampas de butila, lacrados e armazenados sob refrigeração a 4°C. A solução de minerais foi preparada nas mesmas condições, entretanto, armazenadas em frasco

de 1L envolvidos com papel alumínio, a fim de proteger da luz e mantidos sob refrigeração a 4°C .

4.2.3 Definição de pH inicial

Visando favorecer a rota metabólica para produção de etanol foram testados diferentes valores de pH, tais como, 2, 3, 4, 5, 6 e 7. O pH do meio de cultivo foi ajustado com ácido clorídrico 1M e hidróxido de sódio 1M em reatores distintos e identificados para cada faixa de pH. Os reatores em batelada foram preparados em frascos de 500 ml, preenchidos com N₂ 100% (*headspace*) por 10 minutos, 200 ml de volume reacional e adicionado 10% (v/v) do inóculo obtido do lodo de reator UASB. Os meios de cultivo utilizados foram os seguintes: meio Del Nery (Del Nery, 1987) e meio *Thermoanaerobacter ethanolicus* (Atlas, 2005), com 5g/L de glicose de acordo com Atlas (2005), e incubados a 55°C por 7 dias.

4.2.4 Definição do Meio de cultura

Foram testados dois meios de cultura, (1) *Thermoanaerobacter ethanolicus* (Atlas, 2005) e (2) Del Nery (Del Nery, 1987) com diferentes condições nutricionais, visando o favorecimento de bactérias termófilas celulolíticas e fermentativas. Os ensaios foram realizados em reatores em batelada mantidos em condições anaeróbias, utilizando frascos de 2L, contendo 1L de volume reacional, 1g/L de glicose e incubados a 55°C, sem agitação e com 10% (v/v) de inóculo obtido do lodo. Os ensaios foram ajustados ao pH com melhor desempenho no ensaio anterior.

4.2.5 Adaptação ao substrato

Para enriquecimento e manutenção do inóculo visando o aumento da biomassa e sua adaptação ao substrato, montou-se reatores distintos em frascos de 2L, com 1L de meio de cultura *Thermoanaerobacter ethanolicus* (Atlas, 2005) e 1g/L de cada substrato (celulose, glicose e xilose), e toda biomassa obtida do ensaio com o meio de cultivo *T. ethanolicus*, com *headspace* preenchido com N₂ (100%). Os reatores em batelada foram incubados a 55°C por 30 dias, obtendo-se assim, um consórcio microbiano para cada tipo de substrato.

4.2.6 Inibição metanogênica

Devido a ocorrência de produção de metano na etapa de adaptação, optou-se por inibir a atividade metanogênica. Para a inibição da atividade metanogênica foi preparado diluições seriadas de 10^{-1} à 10^{-15} , a fim de restringir tais microrganismos. Foram preparados reatores distintos por substratos (celulose, glicose e xilose) em frascos de 500 ml, com 250 ml de meio de cultivo *Thermoanaerobacter ethanolicus* e 0,25 g/L de substrato. O reator inicial (10^0) foi inoculado com 10% de volume reacional a partir de cada reator da etapa de adaptação do inóculo ao substrato, seguiram-se as diluições, e ambas foram incubadas por 120 horas a 55°C. O acompanhamento foi realizado por análise de hidrogênio, metano e gás carbônico.

Após o ensaio de inibição metanogênica, foi realizado um novo ensaio de adaptação da biomassa ao substrato a partir da diluição de melhor resultado (10^{-7}), a fim evitar o acúmulo de ácidos e o crescimento de arqueias metanogênicas, por conseguinte, favorecendo o crescimento de bactérias fermentativas.

Foram preparados reatores em batelada em frascos de 2L, com 1L de meio de cultivo *Thermoanaerobacter ethanolicus*, com cada inóculo anteriormente diluído a 10^{-7} e adaptado ao respectivo substrato, incubados a 55°C. Para os reatores com glicose e xilose, a cada 48 horas, a biomassa era centrifugada e submetida a um novo meio de cultivo contendo 1g/L do substrato. Devido ao tempo indeterminado de degradação da celulose, optou-se por renovar o meio a cada 15 dias. Este novo ensaio foi realizado por 30 dias, até obter-se um volume de biomassa suficiente para iniciar os ensaios de produção de etanol e inibir a produção de metano.

4.3 Ensaios de produção de etanol

Foram preparados em frascos de 5L enriquecidos com 2,5L de meio de cultura *Thermoanaerobacter ethanolicus* (Atlas, 2005), ajustados a pH 7 e preenchido com N₂ 100% (*headspace*). Os reatores foram alimentados separadamente com 1g/L de cada substrato, como anteriormente adaptados a celulose, glicose e xilose e inoculados com a biomassa obtida após os ensaios de adaptação ao substrato. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas, seguido de um controle (sem adição de substrato). Os reatores de controle foram realizados nas mesmas condições que os reatores de glicose, celulose e xilose, todavia, com composição

descrita na tabela 4.3, a qual incluía extrato de levedura (2g/L). As fermentações foram finalizadas a partir da estabilização na produção de etanol e consumo dos substratos. Os ensaios foram realizados seguidos de um reator controle sem adição de substrato, visando comparar o desempenho do consórcio microbiano obtido em relação ao substrato orgânico.

4.4 Análises cromatográficas

4.4.1 Determinação de etanol e ácidos orgânicos voláteis

A produção de etanol foi determinada por meio de cromatografia gasosa. Por meio desse método foram determinados também ácidos orgânicos voláteis, álcoois e acetona. Para tanto, utilizou-se cromatógrafo GC-2010 Shimadzu com detector de ionização de chama (FID), com coluna HP INNOWAX de 30m x 0,25mm (diâmetro interno) x 0,25µm (espessura do filme). O preparo da amostra consistiu em utilizar 2 ml da amostra em fase líquida, anteriormente coletada em condições estéreis e centrifugada. Dispensou-se em frascos apropriados com 1g de NaCl, acrescidos de 70µL de isobutanol, 100µL de ácido cratiônico e 200µL de ácido sulfúrico 2M, de acordo com metodologia elaborada por Adorno et al, 2014.

4.4.2 Determinação de Hidrogênio, Metano e CO₂

Para a determinação de hidrogênio, metano e CO₂, em reatores pressurizados, retirou-se 0,5ml de amostra da fase gasosa (*headspace*), utilizando seringa *gaslight* com trava. Utilizou-se cromatógrafo gasoso, Shimadzu GC-2010, equipado com detector de condutividade térmica (TDC) e gás argônio como carreador. As temperaturas de operação do injetor, detector, e coluna foram 30°C, 200°C e 230°C, respectivamente (Adorno e Tomita, 2014).

4.4.3 Determinação de carboidratos

Para a determinação de carboidratos de cada ensaio foi realizada análise cromatográfica em Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com detecção por índice de refração e coluna Biorad Aminex HPX-87P. A temperatura de coluna

foi de 55°C. Os padrões foram compostos de glicose, celobiose, xilose, galactose, arabinose, manose.

4.5 Análises físico-químicas

A análise de pH e sólidos suspensos totais foram feitas segundo Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater (2005).

4.6 Caracterização Microbiana

4.6.1 Exames Microscópicos

Foram realizados exames microscópios das amostras dos reatores, através da luz comum, contraste de fase e fluorescência em microscópio Olympus BX60-FLA, para a visualização das morfologias de bactérias.

4.6.2 Biologia molecular

Foram coletadas amostras dos reatores de celulose, glicose e xilose após o final dos ensaios de produção de etanol. As amostras foram submetidas a técnica de PCR/DGGE para o Domínio *Bacteria* e *Archaea*. A extração do DNA das amostras foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Griffiths et al (2000) modificado. A amplificação por reação em cadeia de polimerase nas condições descritas nas tabelas 4.7 e 4.8, seguida da separação do fragmento alvo pela desnaturação parcial da dupla hélice, pela técnica de DGGE (Muyzer et al, 1993). O gradiente desnaturante foi de 45% e 65% para o domínio *Bacteria* e domínio *Archaea*. As condições da corrida foram de 75V por 16 horas a temperatura constante de 60° C. Os *primers* utilizados foram 1100FGC – 1400R para o Domínio *Archaea* (Kudo et al, 1997) e 968FGC – 1401R para o Domínio *Bacteria* (Nubel et al, 1996).

Foi avaliada a população microbiana do Domínio *Bacteria* e *Archaea*, por comparação de padrões de bandas do DGGE através do coeficiente de similaridade por meio do programa *Bionumerics* versão 3.5. Calculou-se também o grau de diversidade microbiana através da equação de Shannon-Wiener:

Índice de diversidade Shannon – Wiener

$$H = - \sum (P_i \ln(P_i))$$

Sendo,

$P_i = n_i/N$ (probabilidade das bandas na linha)

n_i = peso do pico individual na curva densiométrica

N = soma de todos os pesos dos picos da curva densiométrica

4.7 Cinética de Dados

Os dados foram aplicados ao Modelo Matemático definido por Gompertz, modificado por Zwietering et al (1990), aplicado a produção de etanol por Olaoye e Kolawole (2013).

A equação foi definida por:

$$y = a \exp \{ - \exp [\mu_m \exp (1) / a (\lambda - t) + 1] \}$$

Sendo:

y = Concentração de Massa de Etanol (mg/L)

a = Potencial Máxima de Produção de Etanol (mg/L)

μ_m = Taxa Máxima de Produção de Etanol ($\text{mg.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)

λ = Fase *lag* (h)

5 Resultados e Discussões

5.1 Obtenção de consórcio microbiano

5.1.1 Caracterização do consórcio microbiano

O inóculo foi obtido de lodo granulado de reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) termófilo utilizado no tratamento de vinhaça. Por meio de microscopia óptica deste inóculo observou-se ampla diversidade de morfologias, tais como leveduras, bacilos e sarcinas (Figura 5.1). Nessa análise não foi observado endósporos.

Figura 5-1: Microscopia óptica da biomassa do inóculo: (a) leveduras, (b) bacilos, (c) e (d) sarcinas

No exame microscópico, não se observou endósporos. Bactérias semelhantes a *Clostridium* sp. e *Bacillus* sp. formam endósporos quando submetidos a condições de estresse como altas temperaturas, radiação UV, substâncias tóxicas, escassez de alimento e falta de nutrientes (Kim et al 2006). Entretanto, bactérias termófilas semelhantes a *Thermoanaerobacter* sp. e *Thermoanaerobacterium* sp. podem ou não formar endósporos (Chang e Yao, 2011). Desta forma, é seletivo o tratamento do inóculo em altas temperaturas (Kim et al, 2006), restringindo apenas a microrganismos formadores de endósporo, caso não desejado neste trabalho.

Neste estudo, optou-se por selecionar e favorecer bactérias celulolíticas e fermentativas capazes de usar a celulose, glicose e xilose. Sendo assim, o inóculo foi submetido às etapas de seleção, por meio da variação de pH e meio de cultivo, e por fim, adaptação aos substratos proposto.

Ao final dos ensaios de produção de etanol a partir de celulose, glicose e xilose, analisou-se novamente por microscopia óptica a população de microrganismos e verificou-se predominância de bacilos filamentosos e cocos nos ensaios de produção de etanol a partir de glicose, celulose e xilose. Não se observou endósporo.

Wiegel e Ljungdahl (1981) observaram a morfologia de *Thermoanaerobacter ethanolicus*, bactéria termófila produtora de etanol, e constataram a formação de bacilos filamentosos e não formadores de endósporo. Outra bactéria que produz etanol a partir de xilana, glicose, xilose e outros carboidratos simples, *Thermoanaerobacter mathranii*, tem morfologia respectiva a células esporuladas organizadas em cadeias longas (Larsen et al, 1997). Especificamente, nesse trabalho foram observadas morfologias de bacilos na biomassa proveniente do reator UASB.

5.1.2 Definição de pH e meio de cultivo

Neste trabalho foi testado o crescimento celular em diferentes valores de pH (2, 3, 4, 5, 6 e 7), tanto para o meio de cultivo *Thermoanaerobacter ethanolicus* (Atlas, 2005), quanto para o Meio Del Nery (Del Nery, 1987). Nesses ensaios foi utilizado 5g/L de glicose, de acordo com Atlas (2005), como substrato orgânico. Verificou-se inibição do crescimento celular em pH 2 e 3, uma vez que, não foi detectado nenhum metabólito e nem turvação do meio para as duas condições nutricionais. Todavia, em pH 4 e 5 verificou-se que a produção de etanol foi maior em meio Del Nery; ou seja de 7,34 mmol/L e 12,04 mmol/L,

respectivamente, em relação as condições nutricionais do meio descrito para *Thermoanaerobacter ethanolicus*. Neste último caso obteve-se 4,02 mmol/L e 9,78 mmol/L, respectivamente. Entretanto, para valores de pH 6 e 7 obteve-se maior produção de etanol para a condição do meio *T. ethanolicus*, de 11,32 mmol/L e 13,22 mmol/L, respectivamente. Para a condição do meio Del Nery obteve-se 4,17 mmol/L e 5,35 mmol/L, respectivamente, para pH 6 e 7 (Figura 5.2).

Figura 5-2: Produção de etanol em diferentes valores de pH e meios de cultivo

Blume et al (2013) verificaram que a eficiência máxima de hidrólise ocorreu em pH 7 a 60°C em ensaios com *Clostridium thermocellum* cultivada em 2% (p/v) de celulose e 0,5% (p/v) de bagaço de cana de açúcar. Todavia, para *Thermoanaerobacterium* sp. e *Thermoanaerobacter* sp. o pH ótimo de crescimento e produção de etanol é entre 5,0 e 7,0 (Xia et al, 2013). Sveindsdottir et al (2009) obtiveram para *Thermoanaerobacterium* sp., *Thermoanaerobacter* sp. e *Paenibacillus* sp., pH ótimo de crescimento, entre 6 e 7, para os substratos glicose (3,6 g/L), xilose (3,0 g/L), xilana (3 g/L) e celulose (3g/L).

Ling e Hung (2008) constataram 5,8 mmol-EtOH/g de celulose e 1 mol-EtOH/mol a partir de xilose, com consórcio microbiano obtido a partir de esterco bovino, em pH 7,5.

Nesse trabalho verificou-se melhor eficiência de produção de etanol em pH 6 e 7, para as condições nutricionais do meio *Thermoanaerobacter ethanolicus*. Em relação aos dados da literatura citadas anteriormente, recomenda-se usar tais condições para favorecer a presença

de *Clostridium* sp., *Thermoanaerobacter* sp. e *Thermoanaerobacterium* sp.. Sendo assim, optou-se por trabalhar em pH 7 visando favorecer tais microrganismos produtores de etanol.

Desta forma, foram realizados ensaios para reavaliar os meios de cultivo *Thermoanaerobacter ethanolicus* (Atlas, 2005) e Meio Del Nery (Del Nery, 1987), ajustados em pH 7. Verificou-se para ambos os ensaios com diferentes meios de cultivo similaridade na eficiência na degradação de 1g/L de glicose, sendo 97,5% observado para as condições do meio *T. ethanolicus* e 97,2% para aquelas do meio Del Nery, cujo consumo ocorreu em 24 horas (Figura 5.3). Como mencionado anteriormente, obteve-se para as condições nutricionais do meio Del Nery menores concentração de etanol (0,57 mmol/L). Porém, neste ensaio, observou-se também hidrogênio (7,23 mmol), diferentemente daquilo observado para o meio *T. ethanolicus*. Portanto, optou-se em usar o meio *T. ethanolicus*, uma vez que, sob tais condições obteve-se 10,10 mmol/L de etanol, com mínima produção de hidrogênio (0,18mmol).

Figura 5-3: Comparação entre os meios de cultivo avaliando a degradação da produção de etanol e hidrogênio: Meio *Thermoanaerobacter ethanolicus* e Meio Del Nery.

Desta forma, após ensaios de variação de pH e meio de cultivo, optou-se por realizar os demais ensaios nas condições de pH 7 e meio de cultivo *Thermoanaerobacter ethanolicus*, visando assim, a maior eficiência na produção de etanol a partir de celulose, glicose e xilose.

5.1.3 Adaptação da biomassa aos substratos orgânicos

Após definição do pH e meio de cultivo, a biomassa foi submetida aos substratos orgânicos (celulose, glicose e xilose) separadamente, em reatores em batelada com meio de cultivo *T. ethanolicus* em pH 7. A fermentação iniciou-se em 24 horas nos ensaios de celulose, glicose e xilose. Isto foi relacionado a adaptação realizada nas mesmas condições nos ensaios anteriores e, também, ao tempo recorrente à hidrólise da celulose.

A partir da produção de metabólitos foi possível avaliar a degradação dos substratos em todos os reatores. A produção de etanol foi observada em todos os reatores até 24 horas de operação. Após este período verificou-se consumo de etanol e ácido acético em até 240 horas. A máxima produção de etanol obtida nos reatores foi de $6,0 \pm 0,37$ mmol/L e $9,8 \pm 0,45$ mmol/L para glicose e xilose, respectivamente. Em relação ao reator com celulose verificou-se $2,16 \pm 0,39$ mmol/L de etanol.

Juntamente, com a produção de etanol, verificou-se outros metabólitos, tais como, ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, ácido valérico, acetona e n-butanol. A produção de ácido acético no reator com glicose foi de $6,96 \pm 0,02$ mmol/L em 24 horas de operação. Nos reatores com xilose e celulose verificou-se de $9,28 \pm 0,28$ mmol/L e $6,7 \pm 0,12$ mmol/L de ácido acético, em 24 horas de operação, respectivamente. Após, 72 horas de operação verificou-se produção de metano, não sendo observado produção de hidrogênio, para os 3 substratos testados.

Para os três ensaios verificou-se decréscimo da concentração de etanol e ácido acético e aumento significativo de metano, após 72 horas de operação (Figura 5.4). A produção final de metano obtida foi de $14,87 \pm 0,33$ mmol e $11,08 \pm 0,64$ mmol, para os reatores com glicose e celulose, respectivamente. No reator com xilose verificou-se maior produção de metano, ou seja, $16,74 \pm 0,5$ mmol.

Para todos os ensaios verificou-se valores de pH final de 7,1 para o reator de glicose, 7,0 para o reator de xilose e 7,0 para o reator de celulose.

Figura 5-4: Produção de etanol, ácido acético e metano em reatores em batelada com glicose (a), xilose (b) e celulose (c)

Destaca-se que, provavelmente, a formação de metano para as três condições de substratos orgânicos ocorreu pela via acetoclástica, sendo que, observou-se o consumo de ácido acético proporcionalmente ao aumento da concentração de metano. Portanto, sob tais condições ocorreu favorecimento de arqueias metanogênicas acetoclásticas. Estes microrganismos são os responsáveis pela conversão de acetato em metano, sendo que, o acetato é clivado em grupos metil e carboxil, na qual o grupo metil é convertido diretamente em CH₄, enquanto o grupo carboxila é convertido em CO₂ (Saady, 2013).

Analisando a produção de metabólitos nos ensaios de celulose, glicose e xilose, observou-se a não ocorrência de hidrogênio, indicando assim, a presença de microrganismos consumidores de hidrogênio, uma vez que, o hidrogênio é onipresente no ambiente anaeróbico, mesmo em baixas concentrações (Conrad, 1999).

O consumo de etanol provavelmente é resultante da presença de bactérias acetogênicas que são capazes de crescer e utilizar como substrato o etanol. Küsel et al (2000) caracterizaram *Clostridium scatogenes* e constataram que esta bactéria acetogênica produziu ácido acético a partir de etanol. Em ambientes fermentativo-metanogênicos pode ocorrer também a degradação de etanol por oxidação e formação de metano (Schink, 1997).

Portanto, a produção de metano por via acetoclástica interferiu significativamente na produção de etanol a partir dos substratos celulose, glicose e xilose. Entretanto, Sasaki et al. (2012) em seus estudos, avaliaram a interferência da arqueia metanogênica hidrogenotrófica na degradação de celulose a partir de *Clostridium clariflavum*.

Os autores verificaram maior produção de ácidos orgânicos em co-cultura (*Clostridium clariflavum* e *Methanothermobacter thermautotrophicus*) em relação à cultura simples (*Clostridium clariflavum*) após 60h de incubação. Em co-cultura, a produção de ácido acético foi de 29,7 mmol, 5,7 mmol de etanol e 36,7mg/L de CH₄, diferentemente dos resultados obtidos em cultura simples, onde não ocorreu a produção de CH₄, a produção de ácido acético foi de 8,6 mmol e de etanol foi de 13,8 mmol.

Desta forma, visando a produção de etanol a partir dos substratos propostos, vê-se interessante a inibição da atividade metanogênica, uma vez que a produção de metano ocorreu por via acetoclástica, consumindo ácido acético e etanol por via acetogênica, nos ensaios realizados.

5.1.4 Inibição das arqueias metanogênicas

Devido à ocorrência de metano nos ensaios de obtenção e adaptação do inóculo foi necessário desfavorecer a ocorrência da etapa de metanogênese, por conseguinte, inibindo a atividade das arqueias metanogênicas. Esta inibição normalmente é feita por tratamentos ácidos e altas temperaturas (Kim et al, 2006). Porém, estes tratamentos iriam modificar toda a comunidade microbiana obtida na fase de definição de pH, meio de cultivo e adaptação do substrato, devido a acidificação do meio. Além disso, submeter a biomassa a altas temperaturas selecionaria apenas microrganismos resistentes a estes parâmetros.

Desta forma, foi proposto neste trabalho, a inibição das arqueias metanogênicas por diluições seriadas, a partir do conceito de tempo de crescimento destes organismos. Como o crescimento das arqueias metanogênicas é mais lenta em relação às demais bactérias fermentativas, cujo crescimento, provavelmente, ocorre em menor tempo. Ou seja, a partir de diluições seriadas pode-se restringir o número desses microrganismos ao ponto de não estarem mais presente no inóculo.

Portanto, realizou-se ensaio com diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-15} , avaliando-se a produção de metano em 120 horas de incubação para cada substrato (celulose, glicose e xilose). Para todos os substratos orgânicos observou-se para diluição 10^{-7} baixa produção de metano e hidrogênio, e apenas produção significativa de dióxido de carbono, indicando o consumo do substrato (Figura 5.5). Para esta diluição, verificou-se para o reator com glicose 0,568mmol e 0,016mmol de hidrogênio e metano. Para o reator com celulose e xilose, não detectou-se produção de hidrogênio. Todavia, a produção de metano foi de 0,348 e 0,233mmol, respectivamente. Destaca-se que para as diluições posteriores a 10^{-10} não constatou-se produção de nenhum gás, sugerindo a inatividade do inóculo.

Figura 5-5: Produção de CH₄, H₂ e CO₂, com biomassa da diluição 10⁻⁷ para cada substrato.

Desse modo, outra hipótese para a inibição das metanogênicas foi avaliada a partir do conceito de taxa de crescimento e formação de produtos nas etapas da digestão anaeróbia. Na digestão anaeróbia, o crescimento das arqueias metanogênicas só é possível na presença dos substratos acetato e H₂ ocorridos nas etapas de acidogênese, acetogênese e homoacetogênese (Saady, 2013). Como visto no ensaio anterior de adaptação da biomassa ao substrato (Figura 5.5), a produção de etanol e ácido acético ocorreu em até 72 horas de incubação, sendo que após este período, iniciou-se a atividade metanogênica. Sendo assim, realizou-se um novo ensaio de adaptação da biomassa, diminuindo-se o tempo de incubação em 48 horas, desfavorecendo o acúmulo de ácidos e, conseqüentemente, não permitindo a disponibilidade de substrato para as arqueias metanogênicas acetoclásticas.

Após esse ensaio de adaptação, foram realizados os ensaios de produção de etanol descritos posteriormente, e observou-se produção estável de ácidos e etanol, com baixa produção de metano.

5.2 Produção de Etanol

5.2.1 Produção de etanol a partir de Glicose

Obteve-se produção de etanol no intervalo entre 4 a 6 horas iniciais de incubação, mantendo-se estável durante todo o experimento (10,86 mmol/L). Entretanto, para o ácido acético verificou-se aumento gradativo até 24 horas de operação, de 5,36 mmol/L até 7,80 mmol/L. (Figura 5.6d). Em contrapartida, no reator controle (sem adição de glicose) verificou-se similaridade na produção de metabólitos ao longo do experimento, estabilizando também após 24 horas de operação, entretanto, com valores menores do que os obtidos no reator com glicose. Para o reator controle a produção final foi de 1,27 mmol/L de etanol e 5,74 mmol/L de ácido acético (Figura 5.6c).

O consumo total da glicose (5,51 mmol/L) ocorreu em 20 horas de ensaio (Figura 5.6d) com remoção de 100%. O mesmo foi observado por Sygurbjornsdottir e Orlygsson (2012), ao analisarem a dinâmica da degradação de glicose (20 mmol/L) por *Thermoanaerobacterium* AK₅₄, a 65 °C, em reatores em batelada. Os autores observaram que a glicose foi totalmente consumida em 24 horas. Além disso, verificaram que a maior produção de etanol (23 mmol/L) e ácidos orgânicos voláteis (ácido acético e ácido láctico) ocorreu entre 10 a 20 horas de incubação.

Portanto, verificou-se no ensaio de produção de etanol a partir de glicose rápida fase *lag*, com consumo total do substrato em 20 horas e produção de etanol simultaneamente. Sygurbjornsdottir e Orlygsson obtiveram produção de etanol em 24 horas, tempo maior ao observado neste trabalho, entretanto os ensaios foram realizados com concentração maior de glicose (20 mmol/L) em comparação ao utilizado neste trabalho (5,55 mmol/L).

A baixa concentração de hidrogênio (2,81mmol) obtida para as condições desse ensaio (Figura 5.6b), entretanto, não foi o principal produto obtido. Sob tais condições, com ausência de metano e acúmulo de ácido acético pode-se inferir na inibição de arqueias metanogênicas acetoclásticas e a eficiência da etapa de inibição metanogênica anteriormente aplicada ao inóculo adaptado ao substrato glicose.

No reator alimentado com glicose, o valor de pH inicial foi de 6,9 e, após 4 a 6 horas de 5,9; ou seja, no mesmo período em que ocorreu a produção de etanol. No reator controle verificou-se pH de 6,9 a 6,8 durante todo o experimento.

Figura 5-6: Ensaios de produção de etanol em função do tempo. a) Produção de H_2 e CH_4 em reator em batelada controle. b) Produção de H_2 e CH_4 em reator em batelada com glicose. c) Produção de ácidos e etanol e concentração de glicose em reator em batelada controle. d) Produção de ácidos e etanol e concentração de glicose em reator em batelada com glicose.

Em relação a produção final dos demais metabólitos verificou-se, após 78 horas de incubação $3,62 \pm 0,29$ mmol/L de ácido propiônico e $1,40 \pm 0,09$ mmol/L de ácido butírico. No reator controle verificou-se 2,17 mmol/L de ácido propiônico, 1,21 mmol/L de ácido butírico e 1,10 mmol de hidrogênio (Figura 5.7).

Figura 5-7: Produção de ácidos orgânicos e alcoóis em reator em batelada com glicose e reator em batelada controle com extrato de levedura

Constatou-se que a produção de etanol foi proveniente da degradação de glicose devido à ocorrência no mesmo intervalo de tempo (4 a 6 horas de incubação) (Figura 5.6). Por conseguinte, a produção de ácido acético e demais ácidos orgânicos foram parcialmente decorrentes da degradação da glicose, entretanto, foi possível observar a produção dos mesmos a partir de extrato de levedura, uma vez que essa produção manteve-se constante durante todo experimento no reator controle na ausência de glicose (Figura 5.6 e 5.7).

De acordo com Wiegel e Ljungdahl (1981) o extrato de levedura favorece o crescimento de bactérias termófilas por responder como fonte de nitrogênio e carbono, devido a presença de peptona e aminoácidos hidrolisados, atribuindo assim, a sua importância no meio de cultivo. Os autores ao isolarem a bactéria *Thermoanaerobacter ethanolicus*, verificaram a influência do extrato de levedura no crescimento deste microrganismo, tal que, em meio de cultivo com 7,5 g/L de extrato de levedura e 8 g/L de glicose, a fração de massa seca de células foi de 0,14 g/g de glicose. Em contrapartida, em meio de cultivo com menor

concentração de extrato de levedura (5g/L) e maior concentração de glicose (10g/L), a fração de massa seca de células foi relativamente menor, ou seja, 0,08 g/g de glicose.

Entretanto, Sigurbjornsdottir e Orlysson (2012) observaram que *Thermoanaerobacterium* AK₅₄ foi capaz de utilizar o extrato de levedura como fonte de carbono para a formação de compostos, tais como etanol, acetato, lactato e hidrogênio. O mesmo ocorreu no reator controle, tal que a produção de metabólitos foi decorrente da presença de extrato de levedura no meio de cultivo (2g/L).

Desta forma, calculou-se o rendimento de etanol a partir da glicose, subtraindo o rendimento obtido para o reator controle, com extrato de levedura como única fonte de nitrogênio e carbono. Portanto, o rendimento final obtido foi de 1,73 mol etanol/mol glicose, 0,65 mol ácido acético/mol glicose e 0,31 mol hidrogênio/mol glicose, rendimento de 86,5% na produção de etanol em relação ao rendimento teórico obtido na estequiometria da glicose em etanol (2 mol /mol de glicose metabolizada) a partir de consórcio microbiano.

Os melhores rendimentos obtidos na literatura são reportados utilizando-se *Thermoanaerobacter ethanolicus*. Wiegel e Ljungdahl (1981) obtiveram rendimento de 1,8 mol de etanol/ mol de glicose. Kannan e Mutharasan (1984) em ensaios com *Thermoanaerobacter ethanolicus* observaram baixa produção de ácidos orgânicos em relação à produção de etanol, 0,16 mol ácido acético/mol glicose, enquanto, o rendimento de etanol foi de 1,72 mol/mol glicose. Os autores também constataram a interferência da concentração de glicose na produção de etanol, sendo que o melhor rendimento foi obtido em 20g/L de glicose. Para concentrações maiores; ou seja, de 35 e 90 g/L de glicose, os autores observaram rendimento de etanol significativamente menor.

A produção de etanol por consórcio microbiano foi estudada por Lin e Hung (2008), que obtiveram 1,44 mol de etanol / mol de glicose e 0,54 mol de ácido acético / mol de glicose, resultados estes inferiores aos encontrados nesta pesquisa.

Sigurbjornsdottir e Orlygsson (2012) utilizaram *Thermoanaerobacterium* AK₅₄, e obtiveram rendimento de 1,03 mol etanol / mol glicose. Entretanto, observaram rendimentos satisfatórios na produção de hidrogênio (1,02 mol H₂ / mol glicose). No presente estudo, foi verificada baixa produção de H₂ (0,31mol/mol de glicose), provavelmente, devido a predominância de bactérias produtoras de etanol, que metabolizaram todo o substrato em etanol. Desta forma, verificou-se para o consórcio microbiano obtido nos ensaios de glicose eficiência na produção de etanol, em comparação as culturas puras estudadas pelos autores supracitados.

5.2.2 Produção de etanol a partir de celulose

A degradação da celulose (1g/L) foi observada durante o experimento e acompanhada até a estabilização na produção de metabólitos. Na fase inicial do experimento observou-se celulose insolúvel e decantada no fundo do reator. Após 5 dias de incubação observou-se início na decomposição da celulose e formação de um composto de coloração amarelada (Figura 5.8). Esta característica de degradação da celulose é observada devido a presença de bactérias semelhantes a *Clostridium thermocellum*, que ao degradarem a celulose, liberam uma substância de coloração amarela (YAS) (Blume et al, 2013). Observou-se que após o 10º dia de operação a celulose estava totalmente amarelada e solúvel (Figura 5.8), juntamente com a estabilização dos compostos da degradação (Figura 5.9).

Figura 5-8: Fotos dos reatores em batelada com celulose

Figura 5-9: Ensaio de produção de etanol em função do tempo. a) Produção de H₂ e CH₄ em reator em batelada controle. b) Produção de H₂ e CH₄ em reator em batelada com celulose. c) Produção de ácido acético e etanol em reator em batelada controle. d) Produção de ácido acético e etanol em reator em batelada com celulose

Verificou-se que a produção de etanol não foi significativa, mantendo-se estável após 48 horas de operação, tanto para o reator em batelada controle (0,39 mmol/L), quanto para o reator em batelada com celulose (2,27 mmol/L). No reator controle verificou-se que a concentração de ácido acético estabilizou em 72 horas (9,73 mmol/L), diferentemente do que ocorreu com o reator em batelada com celulose. Neste caso, verificou-se aumento gradativo durante todo o experimento, com produção final de 16,14 mmol/L (Figura 5.9c e 5.9d).

Diferentemente destes resultados, Sasaki et al (2012) verificaram o acúmulo de ácidos orgânicos e etanol a partir da degradação de celulose (10 g/L) por cultura pura de *Clostridium clariflavum* e co-cultura (*Clostridium clariflavum* e *Methanothermobacter thermautotrophicus*) em 60 horas de incubação.

No caso específico deste trabalho verificou-se baixa produção de hidrogênio em 24 horas de operação, posteriormente, diminuição completa até a não detecção nas análises cromatográficas, em ambos os reatores controle e com celulose. Porém, ocorreu produção de metano durante todo o experimento, com estabilização após 120 horas de operação (Figura 5.9a e 5.9b).

Nesses ensaios pode-se afirmar que ocorreu direcionamento da rota metabólica para a metanogênese, completando assim a digestão anaeróbia. Devido ao acúmulo de ácidos, principalmente ácido acético (16,14 mmol/L) e, posteriormente, a não ocorrência de hidrogênio, constatou-se a eficiência da etapa de inibição anteriormente aplicada, apenas para as metanogênicas acetoclásticas.

Sasaki et al (2012) ao avaliarem a interferência da arqueia metanogênica hidrogenotrófica *Methanothermoanaerobacter thermautotrophicus* na degradação de celulose por *Clostridium clariflavum*, puderam esclarecer a partir de seus dados, a rota metabólica dessa co-cultura. Inicialmente, a celulose foi quebrada em celobiose por enzimas extracelulares produzidas por *C. clariflavum*. A molécula de celobiose foi importada para o interior das células e decomposta em glicose, seguida de diversas etapas de fermentação ativadas por *C. clariflavum*. A produção de etanol, lactato e propionato seguiram a via de re-oxidação pelos nucleotídeos de piridina (NADH e NADPH) e flavina-adenina (FADH₂) (Figura 5.10). Entretanto, a eliminação de H₂ pelas metanogênicas hidrogenotróficas reduziu a atividade de produção de lactato, propionato e etanol, resultando no aumento na produção de ácido acético e aumento na geração de moléculas de ATP, contribuindo assim, para o aumento na densidade celular e, conseqüentemente, o aumento na aceleração da degradação da celulose em co-cultura.

Figura 5-10: Rota metabólica para degradação de celulose em co-cultura

Fonte: Sasaki et al (2012)

Nos reatores com celulose verificou-se que a produção de metabólitos ocorreu durante todo o experimento, resultando em $2,27 \pm 0,01$ mmol/L de etanol, $16,14 \pm 0,45$ mmol/L de ácido acético, $5,87 \pm 0,28$ mmol/L de ácido propiônico e $1,66 \pm 0,19$ mmol/L de ácido butírico em 216 horas de operação, com pH final de 6,2. Não foi constatada a produção de hidrogênio, porém obteve-se produção de metano ($14,78 \text{ mmol} \pm 1,04$) e gás carbônico ($18,22 \pm 0,28$ mmol). Observou-se no reator controle a produção dos mesmos metabólitos em concentrações menores; ou seja, $0,39$ mmol/L de etanol, $9,73$ mmol/L de ácido acético, $3,37$ mmol/L de ácido propiônico, $0,71$ mmol/L de ácido butírico e $8,19$ mmol de metano (Figura 5.11).

Figura 5-11: Produção de ácidos orgânicos e álcoois em reator em batelada com celulose e reator controle

Portanto, subtraindo os rendimentos do reator controle em relação aquele com celulose obteve-se 1,88 mmol de etanol/g de celulose, 6,2 mmol de ácido acético/g de celulose, 2,4 mmol de propionato/g de celulose, 0,95 mmol de ácido butírico/g de celulose e 6,6 mmol de metano/g de celulose.

Sasaki et al (2002), em seus ensaios em co-cultura obtiveram 29,67 mmol/L de ácido acético, 9,44 mmol/L de ácido láctico, 1,4 mmol/L de ácido propiônico e 5,7 mmol/L de etanol. Em cultura pura, os autores verificaram 8,6 mmol/L de ácido acético, 5,93 mmol/L de ácido láctico, 3,8 mmol/L de ácido propiônico, e 13,8 mmol/L de etanol. Os dois ensaios foram realizados com 10g/L de papel filtro, sendo obtido melhores resultados de produção de etanol com cultura pura. Entretanto, em relação a remoção de sólidos suspensos, os autores verificaram que a taxa de degradação da celulose foi melhor em co-cultura (73 %), quando comparou-se com o ensaio em cultura pura (28,1%).

Em contrapartida, Lin e Hung (2008) obtiveram resultados satisfatórios para a produção de etanol e hidrogênio a partir da degradação de celulose por consórcio microbiano obtido do esterco bovino. Os autores verificaram 2,8 mmol H_2 /g celulose e 5,8 mmol de EtOH/g de celulose, sem produção de metano.

Verificou-se a degradação da celulose em 120 horas pelo consórcio microbiano, entretanto, sem produção significativa de etanol. Desta forma, seria necessário inibir completamente a atividade metanogênica, além de avaliar também a sua interferência, tanto para a degradação da celulose, como para a produção de etanol, neste consórcio.

5.2.3 Produção de etanol a partir de xilose

Verificou-se nos ensaios com xilose que a produção de etanol (12,38 mmol/L) ocorreu principalmente em 8 horas de incubação, mantendo-se estável no decorrer dos ensaios. Diferentemente verificou-se aumento gradativo de ácido acético (16,1 mmol/L), durante todo o experimento (Figura 5.12c e 5.12d). A partir de 20 horas de incubação verificou-se produção metano (5,55 mmol), porém em concentrações reduzidas (Figura 5.12a e 5.12b). Em relação ao reator controle também verificou-se produção de metabólitos, 1,66 mmol/L de etanol, 6,47 mmol/L de ácido acético e 2,13 mmol de metano, evidenciando assim, a capacidade do consórcio microbiano em utilizar o extrato de levedura como fonte de carbono.

Por meio da análise destes resultados pode-se inferir que ocorreu inibição das arqueias metanogênicas acetoclásticas nos reatores com xilose e controle. Esta afirmação é possível, devido ao acúmulo de ácidos e a produção de metano.

Verificou-se consumo de xilose em 12 horas, diferentemente dos resultados obtidos por Maintinguer et al (2011) em seus ensaios em condição mesófila (37°C), no qual o consumo de xilose por consórcio microbiano não foi inferior a 127 horas.

Desta forma, de acordo com os resultados obtidos nos reatores com xilose, e tendo-se a condição termófila, provavelmente ocorreu degradação desse substrato via pentose-fosfato, por meio da qual o açúcar é convertido em gliceraldeído 3-P, seguindo assim, a glicólise (Chang e Yao, 2011).

Shaw et al (2008) observaram em seus estudos, a utilização da xilose por *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* via pentose-fosfato e por descarboxilação do piruvato, a mesma via exemplificada por Chang e Yao (2011) (Figura 3.3). Os autores relacionaram a produção de metabólitos por porcentagem molar, obtendo 2-5% de ácido láctico, 20-30% de ácido acético, 40-60% de hidrogênio e 65-80% de etanol.

Visto também que, Zhao et al (2010) em seus estudos de digestão de xilose a partir de consórcio microbiano, verificaram que os principais produtos metabolizados a partir de xilose foram etanol e ácido acético, correspondendo a 92% dos produtos finais em fase líquida, porém com produção significativa de hidrogênio, fato não constatado neste presente trabalho.

No presente estudo, observou-se similaridade aos resultados dos autores citados, sendo que a produção de etanol e ácido acético correspondeu a 86% dos produtos finais em fase líquida.

Figura 5-12: Ensaio de produção de etanol em função do tempo. a) Produção de H₂ e CH₄ em reator em batelada controle. b) Produção de H₂ e CH₄ em reator em batelada com xilose. c) Produção de ácidos e etanol em reator em batelada controle. d) Produção de ácidos e etanol em reator em batelada com xilose

Verificou-se que a produção final a partir de xilose foi de $12,36 \pm 0,14$ mmol/L de etanol, $14,96 \pm 0,08$ mmol/L de ácido acético, $2,13 \pm 0,14$ mmol/L de ácido propiônico, $0,76 \pm 0,06$ mmol/L de ácido butírico e 5,55 mmol de metano. Entretanto, no reator controle verificou-se produção de 1,66 mmol/L de etanol, 6,17 mmol/L de ácido acético, de 1,96 mmol/L de ácido propiônico, 0,55 mmol/L de ácido butírico e 2,13 mmol de metano. O pH final foi de 6,2 e 6,8, para os reatores em batelada com xilose e controle, respectivamente (Figura 5.13).

Figura 5-13: Produção de ácidos orgânicos e alcoóis em reator em batelada com xilose e em reator em batelada controle

Portanto, após subtrair os rendimentos do reator controle verificou-se que o rendimento na presença de xilose foi de 1,33 mol de etanol /mol de xilose, 1,17 mol de ácido acético/mol de xilose e 0,68 mol de metano/mol de xilose. O rendimento em etanol obtido correspondeu a 79,64% em relação ao rendimento teórico de etanol.

Zhao et al (2010), obtiveram rendimentos melhores comparados a este trabalho; ou seja, rendimento de 1,60 mol EtOH/mol de xilose, utilizando consórcio microbiano, com predomínio de *Thermoanaerobacter*.

Tsai et al (2011), obtiveram rendimento de 98,8% na conversão de xilose à etanol em relação ao rendimento teórico. Os autores ao isolarem a bactéria NTOU1 pertencente ao

gênero *Thermoanaerobacterium*, constataram produção de 1,65 mol de etanol/mol de xilose, em meio contendo 0,5% de xilose e 0,5% de extrato de levedura.

Entretanto, no presente trabalho verificou-se rendimento melhor na produção de etanol a partir de xilose por consórcio microbiano do que aqueles obtidos por Sigurbjornsdottir e Orlygsson (2012). Nesse último caso, os autores usaram cultura pura. Os autores usaram *Thermoanaerobacterium* AK₅₄, e obtiveram rendimento de 0,73 mol de etanol/mol de xilose.

Lin e Hung (2008) obtiveram para consórcio microbiano em condição termófila a degradação de xilose com produção significativa de etanol correlacionada com a produção de hidrogênio. Os autores verificaram rendimentos de 0,3 mol H₂/mol de xilose e 1 mol EtOH/mol de xilose. Este rendimento foi obtido em pH de 7,6 a 8,0. Por meio de caracterização molecular, os autores, verificaram consórcio constituído de bactérias não formadoras de endósporo e bactérias produtoras de etanol, capazes de degradar celulose, tais como, *Anaerocellum thermophilum*, *Caldicellulosiruptor saccharolyticum* e *Spirochaeta thermophila*.

5.3 Considerações Finais

Por meio de análise comparativa verificou-se que a partir do consórcio microbiano termófilo obteve-se maior rendimento de produção de etanol (1,73 mol/mol) a partir de glicose, ou seja, 86,5% de eficiência comparada ao rendimento teórico. Para os demais substratos, verificou-se 1,88 mmol de etanol/g de celulose e 1,33 mol/mol de xilose metabolizada, esta última, correspondendo a 79,6% do rendimento teórico de etanol a partir de xilose (Tabela 5.1).

Em relação aos rendimentos de ácido acético, observou-se maior produção no reator em batelada com xilose (1,17mol/mol) em relação ao reator com glicose (0,65mol/mol). Sendo assim, a razão aproximada de produção de etanol/acetato foi de 1/1 no reator de xilose e 2/1 no reator de glicose. Portanto, o substrato glicose favoreceu a produção de etanol com melhor eficiência que o substrato xilose. A produção de ácido acético no reator com celulose representou 54% dos produtos finais em fase líquida, correspondendo a produção de 6,2mmol de ácido acético/g de celulose.

A produção de hidrogênio foi apenas observada no reator com glicose, com rendimento de 0,31mol/mol. Entretanto, nos reatores com celulose e xilose verificou-se a produção de metano, com rendimentos de 0,68mol/mol de xilose e 6,6mmol/g-celulose.

Desta forma, verificou-se que o substrato glicose foi mais favorável à produção de etanol aplicando-se o consórcio microbiano termófilo. Em relação ao substrato xilose verificou-se produção de etanol eficientemente, em comparação ao substrato glicose, entretanto, a produção de metano pode ter interferido no rendimento final de etanol. Todavia, para o substrato celulose verificou-se degradação desse substrato com produção, principalmente de ácidos orgânicos e metano.

Vale salientar que os rendimentos obtidos para produção de etanol e ácido acético no presente estudo, foram na maioria das vezes, mais significativos e mais próximos aos rendimentos teóricos máximos, inferindo o êxito na produção de etanol nas condições estudadas para glicose e xilose.

Tabela 5-1: Análise comparativa da produção de etanol por bactérias anaeróbias termófilas

Cultura	Substrato	Temperatura	pH	mol EtOH / mol	mol ác.acético / mol	Referencia
Consórcio microbiano de reator termófilo de tratamento de vinhaça	Glicose	55°C	7,0	1,73	0,65	Presente estudo
	Xilose	55°C	7,0	1,33	1,17	Presente estudo
	Celulose*	55°C	7,0	1,88 . 10⁻³	6,2 . 10⁻³	Presente estudo
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	Glicose	69°C	7,5	1,8	0,1	Wiegel e Ljungdahl (1981)
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	Glicose	69°C	7,5	1,72	0,16	Kannan e Mutharasan (1984)
<i>Thermoanaerobacterium AK₅₄</i>	Glicose	65°C	5,0 - 6,0	1,03	0,53	Sigurbjornsdottir e Orlygsson (2012)
<i>Thermoanaerobacterium AK₅₄</i>	Xilose	65°C	5,0 - 6,0	0,73	0,34	Sigurbjornsdottir e Orlygsson (2012)
<i>Clostridium clariflavum</i>	Celulose*	55°C	7,8	1,38 . 10 ⁻³	0,86 . 10 ⁻³	Sasaki et al (2012)
Co-cultura: <i>Clostridium clariflavum</i> e <i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i>	Celulose*	55°C	7,8	0,57 . 10 ⁻³	2,97 . 10 ⁻³	Sasaki et al (2012)
	Celulose*	55°C	7,6-8,0	5,8 . 10 ⁻³	5,5 . 10 ⁻³	Lin e Hung (2008)
Consórcio microbiano de esterco de vaca	Xilose	55°C	7,6-8,0	1,00	0,53	Lin e Hung (2008)
	Glicose	55°C	7,6-8,0	1,44	0,54	Lin e Hung (2008)
Cultura pura: <i>Thermoanaerobacter</i> sp	Xilose	70°C	5,5-7,0	1,59	0,14	Zhao et al (2010)
Cultura mista <i>Clostridium</i> sp e <i>Klebsiella</i> sp	Xilose	37°C	5,5	0,47	1,32	Maintinguer et al (2011)

* Unidade em grama

5.4 Cinética da produção de etanol

Os dados obtidos nos ensaios de produção de etanol foram ajustados por meio do Modelo de Gompertz modificado aplicado a cinética de produção de etanol (Tabela 5.2).

Tabela 5-2: Potencial de produção de EtOH, Taxa máxima de Produção, Fase *lag* e R² obtidos da equação de Gompertz modificada

Reator	a	μm	λ	R ²
Glicose	443,19	391,96	4,09	0,99186
Celulose	100,00	2,26	11,66	0,97031
Xilose	589,52	132,92	5,36	0,98973

a = Potencial Máximo de Produção de Etanol (mg/L)

μm = Taxa Máxima de Produção de Etanol (mg/L/ h)

λ = Fase *lag*

Obteve-se 443,19 mg/L, 100 mg/L e 589,52 mg/L de Potencial Máximo de Produção de Etanol para os reatores em batelada com glicose, celulose e xilose, respectivamente (Tabela 5.2). A taxa máxima de produção foi significativamente menor no reator com celulose, 2,26 mg/L/h, em relação aos outros ensaios. Entretanto, obteve-se maior taxa máxima de produção de etanol de 391,96 mg/L/h no reator com glicose em relação aos demais, evidenciando assim, a preferência e facilidade do consórcio microbiano em metabolizar este substrato em etanol. Verificou-se que a taxa máxima de produção com xilose foi de 132,92 mg/L/h, ou seja, 3 vezes menor do que a obtida no reator com glicose.

Em contrapartida, obteve-se para a fase *lag* dos reatores com glicose e xilose valores semelhantes, 4,09 e 5,36 horas, evidenciando o reduzido tempo de adaptação e o rápido consumo do substrato, com produção de etanol. Para o reator com celulose obteve-se fase *lag* maior; ou seja, 11,66 horas, provavelmente decorrente da adaptação e início da degradação do substrato.

Sigurbjornsdottir e Orlygsson (2012) em ensaios com *Thermoanaerobacterium* AK₅₄, obtiveram taxa máxima de produção de etanol de 115mg/L/h, resultado inferior ao obtido no presente estudo.

5.5 Biologia Molecular

A análise de PCR/DGGE foi realizada a fim de comparar as comunidades microbianas obtidas nos ensaios de produção de etanol a partir de glicose, celulose e xilose, em termos do Domínio *Bacteria* e *Archaea*. Os dendogramas apresentados nas Figuras 5.14 e 5.15 foram construídos por agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) e calculou-se o coeficiente de similaridade.

Por meio da análise do coeficiente de similaridade foi possível constatar que a estrutura da comunidade microbiana referente ao Domínio *Archaea* foi semelhante nos três ensaios. Porém, observou-se maior similaridade (98%) das populações para os reatores com xilose e celulose, sendo estas que obtiveram resultados na produção de metano, como visto anteriormente.

É preciso ressaltar que no ensaio de produção de etanol a partir de glicose ocorreu a inibição das arqueias metanogênicas, e por meio da análise de DGGE foi possível verificar menor similaridade (96,1%) em relação às comunidades microbianas que produziram metano (reatores com xilose e celulose).

Figura 5-14: Dendrograma Domínio *Archaea* para os reatores com xilose, glicose e celulose

Ao se calcular o Índice de Diversidade de Shannon-Wiener (H) verificou-se semelhança das populações em cada ensaio, cujos valores obtidos foram os seguintes: 2,20, 2,23 e 2,25, respectivamente, para glicose, celulose e xilose, indicando semelhança entre as populações de arqueias metanogênicas nos reatores.

Para o domínio *Bacteria*, o dendrograma construído a partir do perfil de bandas do DGGE está apresentado na Figura 5.15.

Figura 5-15: Dendrograma Domínio Bacteria para os reatores com xilose, glicose e celulose

A partir da análise do coeficiente de similaridade do Domínio *Bacteria* verificou-se 90% de similaridade entre as populações do reator com glicose e aquelas do reator com xilose.

Em contrapartida, verificou-se 60% de similaridade entre as populações do reator com celulose quando comparado com os demais reatores. Esta característica sugere que a seleção e adaptação do inóculo visando o uso apenas da celulose como fonte de carbono, restringiu a população de microrganismos apenas aos que possuíam a capacidade de degradar a celulose, sendo assim, diferindo das populações dos reatores com glicose e xilose.

Outro dado que elucida essa afirmação refere-se ao Índice de Diversidade de Shannon-Wiener (H), por meio do qual verificou-se as diferenças entre as populações dos ensaios com glicose, celulose e xilose, ocasionadas pela seleção e adaptação do inóculo. Desse modo, verificou-se para as populações dos reatores com glicose e xilose, similaridade maior que 90%, e índice de diversidade semelhante; ou seja, de 3,12 e 3,11 para glicose e xilose, respectivamente. Diferentemente, verificou-se 1,76 para o índice de diversidade do reator com celulose, constatando assim, a restrição dos microrganismos a esse substrato orgânico.

6 Conclusões

As condições impostas ao inóculo obtido do tratamento de vinhaça favoreceram a seleção de bactérias capazes de degradar a celulose e metabolizar glicose e xilose em etanol.

Ao se avaliar os parâmetros de pH e meio de cultivo verificou-se que estes interferiram significativamente na população microbiana do inóculo, e consequentemente, na formação de compostos finais.

O período de adaptação do inóculo ao substrato foi de extrema importância, pois se verificou que este restringiu a população de microrganismos ao substrato proposto.

As condições nutricionais do meio de cultivo *Thermoanaerobacter ethanolicus* com pH inicial de 7,0 foram favoráveis para a produção de etanol utilizando-se glicose e xilose, e para degradação da celulose..

A presença de arqueias metanogênicas acetoclásticas e bactérias acetogênicas desfavoreceram a produção de etanol nos reatores com celulose, glicose e xilose.

A inibição de arqueias metanogênicas por diluição seriada reduziu a concentração de microrganismos no meio, sendo que, o acúmulo de ácidos e hidrogênio favoreceu o crescimento desses microrganismos.

Glicose e xilose foram metabolizadas pelo consórcio microbiano termófilo com rendimentos favoráveis de produção de etanol em apenas 8 horas de incubação.

O consórcio microbiano selecionado degradou celulose, entretanto, devido a não inibição das metanogênicas, os principais produtos formados foram ácido acético e metano.

7 Sugestões

- Aplicar o inóculo selecionado em biomassa lignocelulósica *in natura* e pré-tratada.
- Promover a inibição completa da atividade metanogênica nos ensaios de produção de produção de etanol.
- Avaliar diferentes concentrações de substrato para a produção de etanol, visando eficiência na produção e possível inibição do consórcio microbiano.
- Avaliar comunidade microbiana através de sequenciamento em larga escala.

8 Referências Bibliográficas

- Adorno M A T, Tomita, I (2014). 37º Reunião anual da sociedade brasileira de química – Natal – RN
26 a 29/05/2014.
- Adorno M A T, Hirasawa J S, Varesche M B A (2014) Development and Validation of Two Methods to Quantify Volatile Acids (C2-C6) by GC-FID: Headspace (Automatic and Manual) and Liquid – Liquid Extraction (LLE). American Journal of Analytical Chemistry 5: 406-414.
- Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro M J (2010) Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. Bioresource Technology 101: 4851 – 4861.
- Agarwal A K (2007) Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. Progress in Energy and Combustion Science 33: 233-271.
- Apha, AWWA and WEF (2005) Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th edition, American Public Health Association, Washington, D.C.
- Atlas R M (2005) Handbook of Media for Environmental Microbiology. 2ª edição. Taylor and Francis Group.
- Balat, M, Balat, H (2009) Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. Applied Energy 86: 2273 – 2282.
- Bai F W, Anderson W A, Moo-Young M (2008) Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. Biotechnology Advances 26: 89 – 105.
- Behera S, Arora R, Nandhalgopal N, Kumar S (2014) Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. Renewable and Sustainable Energy Reviews 36: 91-106.
- Blume L R, Noronha E F, Leite J, Queiroz R M L, Ricart C A O, Sousa M V, Felix C R (2013) Characterization of *Clostridium thermocellum* Isolates Grown on Cellulose and Sugarcane Bagasse. Bioenergy Resource 6: 763-775.
- Chang T, Yao S (2011) Thermophilic, lignocellulolytic bacteria for ethanol production: current state and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol 92: 13 – 27.
- Chung D, Cha M, Guss A M, Westpheling J (2014) Direct conversion of plant biomass to ethanol by engineered *Caldicellulosiruptor bescii*. PNAS. Vol 111. No 24: 8931-8936.
- Conrad R (1999) Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. FEMS Microbiology Ecology 28: 193-202.
- Del Nery V (1987) Utilização do lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo da partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo. São Carlos. Dissertação (mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos., Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo.

Delgenes J P, Moletta R, Navarro J M (1996) Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. *Enzyme and Microbial Technology* 19: 220-225.

EIA (2013) International Energy Outlook 2013. Disponível em www.eia.gov/ieo. Acessado em Novembro, 2014.

Griffiths, R I, Whiteley, A S, O'Donnell, A G (2000) Rapid Method for coextraction of DNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 66, n.1, 5488-5491.

Habibi Y, Lucia L Metje e A, Rojas O J (2010) Nanocrystals: Chemistry, Self-Assembly, and Applications. *Chemical Reviews*, Vol. 110, No. 6, 3479-3500.

Hägerdal B H, Galbe M, Gorwa-Grauslund M F, Liden G, Zacchi G (2006) Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology* . Vol 24. No 12, 549-556.

Hattori S (2008) Syntrophic Acetate – Oxidizing Microbes in Methanogenic Environments. *Microbes and Environments*. Vol 23. No 2: 118-127.

Juhász, T, Egyházi, A, Réczey, K. (2005) β - Glucosidase production by *Trichoderma reesei*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, March 2005, vol. 121, no. 1-3, p. 243-254.

Kannan V, Mutharasan R (1985) Ethanol fermentation characteristics of *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *Enzyme Microb. Technol.*, vol.7, p. 87 - 89.

Kim S, Han S, Shin H (2006) Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA- based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. *Process Biochemistry* 41, 199-207.

Klemm D, Heublein B, Fink H P, Bohn A (2005) Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angewandte Chemie*, Vol 44, 3358-3393.

Kumagai A, Kawamura S, Lee S, Endo T, Rodrigues Jr M, Mielenz J (2014) Simultaneous saccharification and fermentation and a consolidated bioprocessing for Hinoki cypress and *Eucalyptus* after fibrillation by steam and subsequent wet-disk milling. *Bioresource Technology* 162: 89-95.

Küsel K, Dorsch T, Acker G, Stackebrandt E, Drake H L (2000) *Clostridium scatologenes* strain SL1 isolated as an acetogenic bacterium from acidic sediments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 537-546.

Larsen L, Nielsen P, Ahring B K (1997) *Thermoanaerobacter mathranii* sp. nov., an ethanol-producing, extremely thermophilic anaerobic bacterium from a hot spring in Iceland. *Arch Microbiol* 168: 114-119.

Lazaro, C Z (2012) Influencia da concentração de substrato e da temperatura na produção de hidrogênio a partir da vinhaça de cana-de-açúcar. Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo. 157 folhas.

Lazaro C Z, Perna V, Etchebehere C, Varesche M B A (2014) Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: The effects of temperature and substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy* 39: 6407-6418.

Lee J M, Venditti R A, Jameel H, Kenealy W R (2011) Detoxification of woody hydrolyzates with activated carbon for bioconversion to ethanol by the thermophilic anaerobic bacterium *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. *Biomass and Bioenergy* 35: 626 - 636.

Lin C Y, Hung W C (2008) Enhancement of fermentative hydrogen/ethanol production from cellulose using mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy* 33: 3660-3667.

Lynd R L, Weimer P, ZylW, Pretorius L (2002) Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol 66.no 3.p 506 – 577.

Maintinguer, S I, Fernandes B S, Duarte, I C S, Saavedra N K, Adorno M A T, Varesche M B A (2011) Fermentative hydrogen production with xylose by *Clostridium* and *Klebsiella* species in anaerobic batch reactors. *International Journal of Hydrogen Energy* 36: 13508 – 13517.

Muyzer, G E C, De Waal, Uitterlinden A G (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol*, 59, 695-700.

Nubel, U, Engelen, B, Felske, A, Snaidr, J, Wjeshuber, A, Amann, R I, Ludwig, W, Backhaus H (1996) Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, Washington, 178, 5636-5643.

Olaoye O S, Kolawole O S (2013) Modeling of the Kinetics of Ethanol Formation from Glucose Biomass in Batch Culture with a Non Structured Model. *International Journal of Engineering Research and Applications*. Vol 3. No 4: 562-565.

Olson D G, McBride J E, Shaw A J, Lynd L R (2011) Recent progress in consolidated bioprocessing. *Current Opinion in Biotechnology* 23: 1-10.

O-Thong S, Prasertsan P, Karakashev D, Angelidaki I (2008) Thermophilic hydrogen production by the newly isolated *Thermobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2. *International Journal of Hydrogen Energy* 33: 1204 – 1214.

Pandey A, Soccol C R, Nigam P, Soccol V T (2000) Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology* 74: 69-80.

Raskin L, Poulsen L K, Noguera D R, Rittmann B E, Stahl D A (1994) Quantification of Methanogenic Groups in Anaerobic Biological Reactors by Oligonucleotide Probe Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 60. No 4: 1241-1248.

Rubin E M (2008) Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* 454: 841 – 845.

Saady N M C (2013) Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *International Journal of Hydrogen Energy* 38: 13172-13191.

Sasaki, D, Morita, M, Sasaki, K, Watanabe, A, Ohmura, N (2012) Acceleration of cellulose degradation and shift of product via methanogenic co-culture of a cellulolytic bacterium with a hydrogenotrophic methanogen. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol 114, p.435-439.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2005) 19th ed. American Public Health Association / American Water Works Association / Water Environment Federation, Washington, DC, USA.

Sanderson K (2011) A chewy problem. *Nature* 474: S12 – S14.

Schwarz W H (2001) The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 56: 364-649.

Schink B (1997) Energetics of Syntrophic Cooperation in Methanogenic Degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol 61. No 20: 262:280.

Shaw A J, Jenney Jr F E, Adams M W W, Lynd L R (2008) End-product pathways in the xylose fermenting bacterium, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. *Enzyme and Microbial Technology* 42: 453 – 458.

Shaw A J, Hogsett D A, Lynd L R (2010) Natural competence in *Thermoanaerobacter* and *Thermoanaerobacterium* species. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol.46. No 14 p. 4713 – 4719.

Sigurbjornsdottir M A, Orlygsson J (2012) Combined hydrogen and ethanol production from sugars and lignocellulosic biomass by *Thermoanaerobacterium* AK₅₄, isolated from hot spring. *Applied Energy* 97: 785-791.

Sun Y, Cheng J (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83: 1-11.

Sveinsdottir M, Baldursson S R B, Orlygsson J (2009) Ethanol production from monosugars and lignocellulosic biomass by thermophilic bacteria isolated from Icelandic hot springs. *Icelandic Agricultural Sciences* 22: 45-58.

Tsai T L, Liu S M, Lee S C, Chen W J, Chou S H, Hsu T C, Guo G L, Hwang W S, Wiegel J (2011) Ethanol Production Efficiency of an Anaerobic Hemicellulolytic Thermophilic Bacterium, Strain NTOU1, Isolated from a Marine Shallow Hydrothermal Vent in Taiwan. *Microbes and Environments*. Vol 26. No 4, 317-324.

Yang S J, Kataeva I, Hamilton-Brehm S D, Engle N L, Tschaplinski T J, Doepcke C, Davis M, Westpheling J, Adams M W W (2009) Efficient Degradation of Lignocellulosic Plant Biomass, without Pretreatment, by the Thermophilic Anaerobe “Anaerocellum

thermophilum” DSM 6725. Applied and Environmental Microbiology, vol. 75. No 14: 4762-4769.

Wiegel J, Ljungdahl L G (1981) *Thermoanaerobacter ethanolicus* gen. nov., spec. nov., a New, Extreme Thermophilic, Anaerobic Bacterium. Arch Microbiol 128: 343 – 348.

Widdle F, Pfenning N (1984) Genus Desulfobacter. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, v.2, p.1599.

Zambare V P, Bhalla A, Muthukumarappan K, Sani R K, Christopher L P (2011) Bioprocessing of agricultural residues to ethanol utilizing a cellulolytic extremophile. Extremophiles 15: 611 – 618.

Zhao C, Karakashev D, Lu W, Wang H, Angelidaki I (2010) Xylose fermentation to biofuels (hydrogen and ethanol) by extreme thermophilic (70°C) mixed culture. International Journal of Hydrogen Energy 35: 3415-3422.

Zwietering, M H, Jongenburger, I, Rombouts F M, van't Riet, K (1990) Modeling of the bacterial growth curve. Applied and Environmental Microbiology. Vol 56. No 6: 1875 – 1881.

ANEXO I – Ajuste da Produção acumulada de Etanol em equação de Gompertz modificada.

Figura 8-1: Ajuste de Produção de Etanol a partir de glicose

Figura 8-2: Ajuste de Produção de Etanol a partir de celulose

Figura 8-3: Ajuste de Produção de Etanol a partir de xilose

ANEXO II – Limites para detecção do GC-2010 Shimadzu com detector de ionização de chama (FID) e com coluna HP INNOWAX

	LD (mg/L)
Acetona	11,12
Metanol	38,19
Etanol	12,48
n-Butanol	14,48
Ácido acético	9,14
Ácido propiônico	10,19
Ácido isobutírico	18,13
Ácido butírico	15,43
Ácido isovalérico	15,06
Ácido valérico	15,64
Ácido capróico	7,84