ALEJANDRA CAROLINA VILLA MONTOYA

**Avaliação das características físico-químicas e
microbiológicas da produção de hidrogênio e
homoacetogênese a partir de resíduos do processamento de
café**

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2019

ALEJANDRA CAROLINA VILLA MONTOYA

**Avaliação das características físico-químicas e
microbiológicas da produção de hidrogênio e
homoacetogênese a partir de resíduos do processamento de
café**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da
Universidade de São Paulo, como requisito parcial à obtenção
do título de Doutora em Ciências. Engenharia Hidráulica e
Saneamento.

Discente: Alejandra Carolina Villa Montoya

Orientadora: Prof^ª. Assoc. Maria Bernadete Amâncio Varesche

São Carlos
2019

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.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

V798a Villa-Montoya, Alejandra Carolina
Avaliação das características físico-químicas e
microbiológicas da produção de hidrogênio e
homoacetogênese a partir de resíduos do processamento
de café / Alejandra Carolina Villa-Montoya; orientadora
Maria Bernadete Amâncio Varesche. São Carlos, 2019.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de
Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
2019.

1. Metagenômica. 2. Leveduras. 3. Resíduo agrícola.
4. Bioenergia. 5. Ácido acético. 6. Enzimas. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Microbióloga **ALEJANDRA CAROLINA VILLA MONTOYA**.

Título da tese: "Avaliação das características físico-químicas e microbiológicas da produção de hidrogênio e homoacetogênese a partir de resíduos do processamento de café".

Data da defesa: 17/05/2019.

Comissão Julgadora:

Resultado:

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

Aprovada

Prof. Dr. **Irineu Bianchini Junior**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovada

Profa. Associada **Giovana Tommaso**
(Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/FZEA-USP)

aprovada

Dr. **Tiago Palladino Delforno**
(Pós Doutorado UNICAMP)

APROVADA

Prof. Dr. **Michel Brienzo**
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP – Rio Claro)

Aprovada

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:
Prof. Dr. **Eduardo Mario Mendiolo**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

Dedicatória

***Para Mercedes, Hugo y Victor, mi familia y mi
fuerza.***

*“Podre haber dicho adiós a mi familia y amigos y alejarme kilómetros y
kilómetros, pero al mismo tiempo llevarlos en mi corazón, en mi mente, en mi
estómago, pues yo no solamente vivo en el mundo, el mundo vive en mi”.*
Frederick Buechner

Agradecimentos

A Deus, por permitir-me encontrar a força e sabedoria nos momentos difíceis, e ter aberto o caminho que me permitiu cumprir este sonho.

A mi mami Mercedes y mi papi Hugo por todo el amor, cuidado, dedicación, oraciones, fuerza, sacrificios y paciencia. El deseo de enorgullecerlos y asegurar una linda vejez para ustedes me motivo a continuar en los días más difíciles. Nunca me sentí sola porque sabía que contaba con ustedes a pesar de la distancia. Los años de trabajo que ustedes realizaron para pagar mi educación, sacrificando sus necesidades e ideales, me permitieron abrir el camino para convertirme en la profesional que soy hoy. Los amo!

A mi hermano Victorino por toda la confianza, apoyo y amor. Siempre fuiste mi orgullo y modelo a seguir. Gracias por empujarme hacia caminos nuevos y creer en mi potencial. Fue por ti que salí de mi país y conocí nuevas formas de vivir, aprender e investigar. Nunca voy a poder pagar los múltiples esfuerzos que has hecho por mí.

A professora Bernadete, por dar-me a confiança e abrir todas as portas para correr atrás de novas ideias. Cresci muito como profissional e pessoa ao seu lado. A oportunidade de melhorar minha educação é um presente que não tem preço, que abriu minha mente a novos conhecimentos e vai me permitir ir longe.

Ao professor Tininho pela co-orientação. Aos professores Zaiat, Foresti, Márcia e Valeria, pelas assessorias. As técnicas Isabel, Eloisa, Carol e Janja pela ajuda no laboratório. Ao Tiago e Vitor pelo suporte nas análises de Biologia molecular. Foi um orgulho trabalhar com vocês.

Ao professor Antonio Aprigio da Silva Curvelo e o Instituto de Química de São Carlos pelas assessorias, disponibilização de suporte técnico e recursos para a realização de algumas análises cromatográficas.

À fazenda “Três irmãos” (Pedregulho-SP) por permitir aprender mais sobre café e fornecer os resíduos utilizados neste estudo.

Aos meus amigos do laboratório Naty, Jean, Lili, Elias, Lucas, Marie, Rafa e Jessica Lopes pelo apoio, conselhos, companhia, risadas e paciência. Principalmente aos “Bernadetes” Vanessa, Fiaz, Fran, Alana, Marina, Henrique, Ju, Fabricio, Camila, Jeny e Thais por revessar noites de cinéticos por mim, me ajudar com análises atrasadas, corrigir figuras e português errados, fazer papel de terapeutas e revisores. Foi a melhor equipe, vocês são co-autores deste projeto.

Aos meus amigos do “Sancabadalada” por ser minha família... Raissa, Mo, Tainá, Gui, Ina, Carol, Uli, May, Say, Ju Albuquerque, Ju Argente, Ju Bauru, Ju Pessin, Wesley, Carol Ferreira, Mirian, Ro, Cebolinha, Giz e Leo... Muito obrigada por cuidar de mim em momentos difíceis, me fazer sentir como em casa e amar este lugar, por ser meu apoio psicológico e até econômico. Mas principalmente por todos os anos de amizade e lindos momentos. Principalmente a minha amiga e irmãzinha de coração Raissa (e agora ao Grabrielzinho), por 6 anos de amizade, companheirismo e parceria em casa e no laboratório. Foi um caminho difícil que levamos juntas desde o Mestrado, sua ajuda foi vital para conseguir finalizar esta etapa. Vou sentir muito a falta de vocês, e agradeço muito a Deus por ter colocado vocês na minha vida!

A Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento, Laboratório de Processos Biológicos, Divisão de Recursos Microbianos, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA, Universidade de Campinas), Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos e Instituto de Química da Universidade de São Paulo. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES - Código de Financiamento 001) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Processos 2016/20047-0 e 2015/06246-7).

A todos meus sinceros agradecimentos!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

Madre Teresa de Calcuta

*“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens,
mas em ter novos olhos”*

Marcel Proust

RESUMO

Montoya, Alejandra Carolina Villa. **Avaliação das características físico-químicas e microbiológicas da produção de hidrogênio e homoacetogênese a partir de resíduos do processamento de café.** 2019. 337 p. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

O processamento do café via úmida inclui as etapas de despulpamento, fermentação, lavagem e separação dos grãos, no qual gera-se grande quantidade de resíduos sólidos (casca e polpa) e água residuária. O estudo dos aspectos microbiológicos na produção de hidrogênio a partir de resíduos do processamento do café é pouco explorado, o que torna esse resíduo atrativo e foco de pesquisas. Neste cenário, buscou-se avaliar o potencial uso destes resíduos como substrato e fonte de bactérias e fungos fermentativos para produção de H_2 . Adicionalmente, estudou-se a homoacetogênese, processo que afeta a produção de H_2 , uma vez que o H_2/CO_2 pode ser consumido para a síntese de ácido acético. Para isso, ensaios em reatores em batelada foram conduzidos para seleção da melhor condição de pré-tratamento hidrotérmico (severidade), dos fatores da fermentação (pH, temperatura, agitação, volume do *headspace*, concentração de bioaugmentação do consórcio microbiano, resíduo de polpa e casca, água residuária e extrato de levedura) que afetam a produção de H_2 (Planejamento Plackett-Burman) e homoacetogênese (planejamento fracionado 2^{4-1}), seguido do delineamento composto central rotacional (DCCR) para otimização da produção de hidrogênio. Verificou-se que a severidade de pré-tratamento hidrotérmico de 3,53 (180 °C, 15 minutos), resultaram no aumento da concentração de açúcares fermentáveis, com baixa concentração de lignina, fenol, furfural e 5-hidroximentil furfural, obtendo valores de potencial máximo de produção de H_2 (P) de 1,8 mL H_2 . Em relação ao efeito dos fatores da fermentação sobre a produção de H_2 , obteve-se o maior P de 82 mL H_2 em pH 7,0, 30 g DQO L^{-1} de água residuária, 6 g L^{-1} de polpa e casca, 30 °C, 50% de *headspace*, 180 rpm, sem bioaugmentação do consórcio microbiano e 2 g L^{-1} de extrato de levedura. Por outro lado, as condições que conduziram a consumo significativo de H_2 por homoacetogênese foram em pH inicial entre 5,5 e 7,5, *headspace* entre 40 e 60%, concentração de água residuária entre 10 e 30 g DQO L^{-1} e concentração de casca e polpa entre 3 e 9 g L^{-1} . Em relação às variáveis estatisticamente significativas (pH, concentração de polpa e casca e volume do *headspace*), as condições operacionais ótimas para obtenção de P de 240 mL H_2 , estimadas via planejamento DCCR, foram em pH 7,0, concentração de polpa e casca 7 g L^{-1} e volume de *headspace* 30%. No consórcio microbiano, houve predominância de bactérias semelhantes a *Lactobacillus* sp. e *Clostridium* sp. e de fungos semelhantes a *Saccharomyces* sp. e *Kazachstania* sp. Tais microrganismos foram associados a produção de ácido lático, H_2 , etanol e ácido acético nos reatores, identificando genes relacionados a enzimas para a degradação de lignina, fenol, celulose, hemicelulose e pectina. Observou-se alta abundância relativa de *Clostridium* sp. tanto nos ensaios de produção de H_2 quanto nos ensaios com consumo de hidrogênio, sendo seus genes associados a homoacetogênese, produção de ácido propiônico e butanol.

Palavras-chave: Metagenômica, Leveduras, Resíduo agrícola, Bioenergia, Ácido acético, Enzimas.

ABSTRACT

Montoya, Alejandra Carolina Villa. **Evaluation of physical-chemical and microbiological characteristics in hydrogen production and homoacetogenesis from coffee processing wastes**. 2019. 337 p. Doctor of Science Thesis. São Carlos School of Engineering, University of São Paulo, São Carlos, 2019.

Wet coffee processing includes pulping, fermentation, washing and grain separation, in which large amounts of solid waste (husk and pulp) and wastewater are generated. The study of microbiological aspects in the hydrogen production from coffee waste was little explored, which makes this residue attractive and the focus of research. In this scenario, we evaluate the potential use of coffee waste as substrate and source of fermentative bacteria and fungi for H₂ production. In addition, homoacetogenesis, a process, that negatively affects H₂ production, was studied since H₂/CO₂ can be consumed for acetic acid production. Assays in batch reactors were conducted to select the best hydrothermal pretreatment condition (severity), fermentation factors affecting the H₂ production (pH, temperature, agitation, headspace, bioaugmentation of microbial consortium, concentration of pulp and husk, wastewater and yeast extract) (Plackett and Burman design) and homoacetogenesis (fractional factorial design 2⁴⁻¹), followed by the Rotational Central Composite Design (RCCD) to optimize the H₂ production. It was verified that the hydrothermal pretreatment severity of 3,53 (180 °C, 15 minutes), resulted in the increase of fermentable sugars, with low concentration of lignin, phenol, furfural and 5-hydroxymethyl furfural, obtaining values of the maximum H₂ production potential (*P*) of 1,8 mL H₂. The fermentation factors conducting to highest *P* of 82 mL H₂ were pH 7,0, wastewater 30 g COD L⁻¹, 6 g L⁻¹ pulp and husk, 30 °C, 50% headspace, 180 rpm, without bioaugmentation of the microbial consortium and 2 g L⁻¹ yeast extract. On the other hand, the conditions leading to significant H₂ consumption by homoacetogenesis were initial pH between 5,5 and 7,5, headspace between 40 and 60%, wastewater concentration between 10 and 30 g COD L⁻¹ and concentration of husk and pulp between 3 and 9 g L⁻¹. In relation to the fermentation factors statistically significant in the H₂ production (pH, pulp and husk concentration and headspace), the optimal operational conditions to obtain *P* of 240 mL H₂, estimated through RCCD design, were at pH 7,0, 7 g L⁻¹ pulp and husk concentration and 30% headspace volume. In the microbial consortium, there was a predominance of bacteria similar to *Lactobacillus* sp. and *Clostridium* sp. and fungi similar to *Saccharomyces* sp. and *Kazachstania* sp. These microorganisms were associated with the production of H₂, lactic acid, ethanol and acetic acid in the reactors, identifying genes related to enzymes for the degradation of lignin, phenol, cellulose, hemicellulose and pectin. There was a high relative abundance of *Clostridium* sp. both in the H₂ production assays and in the H₂ consumption assays, with genes associated to homoacetogenesis, production of propionic acid and butanol.

Key words: Metagenomic, Yeasts, Agricultural wastes, Bioenergy, Acetic acid, Enzymes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Vias de processamento pós-colheita de café.....	39
Figura 3.2. Corte transversal do fruto de café.	40
Figura 3.3. Etapas para a produção de hidrogênio a partir de resíduos lignocelulosicos (polpa e casca de café).	41
Figura 3.4. Hidrólise de resíduos lignocelulósicos (polpa e casca de café).	45
Figura 3.5. Rota metabólica de fermentação ácido-butírica (Clostridial).	47
Figura 3.6. Rota metabólica de fermentação entérica	48
Figura 3.7. Rota metabólica de fermentação por leveduras	49
Figura 4.1. Fluxograma experimental	75
Figura 4.2. Locais de colheita dos resíduos de café.	76
Figura 4.3. Fluxograma de obtenção do consórcio microbiano.	78
Figura 4.4. Reator para o pré-tratamento hidrotérmico da polpa e casca de café	79
Figura 4.5. Fluxograma de avaliação do efeito da co-digestão de resíduos de café brutos ou pré-tratados.	82
Figura 4.6. Fluxograma de avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H ₂ , ácidos orgânicos e álcoois...	84
Figura 4.7. Fluxograma de avaliação dos fatores da fermentação que conduzem ao consumo de H ₂ por homoacetogênese.....	87
Figura 4.8. Fluxograma para a seleção das condições de fermentação de otimização da produção de H ₂	
Figura 5.1. a) Microscopia de contraste e (b) Microscopia de Luz comum e coloração de Gram do consórcio microbiano obtido a partir dos resíduos do processamento de café	99
Figura 5.2. Caracterização das (a) Frações líquidas e (b) Resíduo de polpa e casca pré-tratado obtidas do reator hidrotérmico.....	105
Figura 5.3. Resíduo de polpa e casca <i>in natura</i> ou pré-tratado no reator hidrotérmico a diferentes severidades	106
Figura 5.4. Cinéticas de produção de H ₂ e ajuste ao modelo de Gompertz modificado dos reatores em batelada da fermentação de resíduos de café brutos ou pré-tratados	110
Figura 5.5. Fenol, furfural, lignina e <i>P</i> dos reatores em batelada com resíduos de café brutos	115
Figura 5.6. Fenol, furfural, lignina e <i>P</i> dos reatores em batelada com polpa e casca pré-tratada	119
Figura 5.7. Fenol, furfural, lignina e <i>P</i> dos reatores em batelada com frações líquidas do reator hidrotérmico	123
Figura 5.8. Fenol, furfural, lignina e <i>P</i> dos reatores em batelada com polpa e casca pré-tratada e frações líquidas do reator hidrotérmico	126
Figura 5.9. Fenol, furfural, lignina e <i>P</i> dos reatores em batelada com polpa e casca pré-tratada e água residuária	128
Figura 5.10. Fenol, furfural, lignina e <i>P</i> dos reatores em batelada com água residuária, polpa e casca pré-tratada e frações líquidas do reator hidrotérmico.	131
Figura 5.11. Produção de H ₂ dos reatores em batelada da fermentação de resíduos de café brutos ou pré-tratados	135
Figura 5.12. Metabólitos súluveis e pH dos reatores em batelada da fermentação de resíduos de café brutos ou pré-tratados.....	139

Figura 5.13. Cinéticas de produção de H ₂ acumulado e ajuste ao modelo de Gompertz modificado dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H ₂ , ácidos orgânicos e álcoois	146
Figura 5.14. Efeito dos fatores da fermentação ($\alpha = 0,1$) sobre (a) Potencial máximo de produção de H ₂ (<i>P</i>) (b) Velocidade máxima de produção de H ₂ (<i>Rm</i>) e (c) Tempo de início da fermentação (λ)	148
Figura 5.15. Redução de carboidratos, sólidos suspensos totais (SST) e potencial máximo de produção de H ₂ (<i>P</i>) dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H ₂ , ácidos orgânicos e álcoois	153
Figura 5.16. Efeito dos fatores da fermentação ($\alpha = 0,1$) sobre (a) Redução de carboidratos e (b) Aumento dos sólidos suspensos totais (SST)	154
Figura 5.17. Balanço de massa e pH dos reatores em batelada dos fatores da fermentação sobre a produção de H ₂ , ácidos orgânicos e álcoois	160
Figura 5.18. Efeito dos fatores da fermentação ($\alpha = 0,1$) sobre (a) Produção de ácido acético (b) Produção de ácido láctico e (c) Produção de etanol.....	163
Figura 5.19. Perfil de bandas do DGGE para (a) Bactérias e (b) Fungos dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H ₂ , ácidos orgânicos e álcoois	169
Figura 5.20. Índices ecológicos para Bactérias e Fungos dos reatores em batelada dos fatores da fermentação sobre a produção de H ₂ , ácidos orgânicos e álcoois	174
Figura 5.21. Curvas de rarefação do consórcio microbiano para descrever a riqueza de famílias e gêneros dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H ₂ , ácidos orgânicos e álcoois	177
Figura 5.22. Curvas de rarefação do ensaio 9 (azul) e ensaios 13-14-15 (vermelho) para descrever a riqueza de famílias e gêneros dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H ₂ , ácidos orgânicos e álcoois.....	177
Figura 5.23. Grupos taxonômicos para (a) Famílias e (b) Gêneros de Bactérias no consórcio microbiano, ensaios 9 e 13-14-15 dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H ₂ , ácidos orgânicos e álcoois.....	179
Figura 5.24. Grupos taxonômicos para (a) Filos e (b) Gêneros de fungos no consórcio microbiano, ensaios 9 e 13-14-15 dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H ₂ , ácidos orgânicos e álcoois.....	182
Figura 5.25. Curvas de rarefação para riqueza de KOs no (a) Consórcio microbiano (b) Ensaio 9 (c) Ensaios 13-14-15 dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H ₂ , ácidos orgânicos e álcoois	185
Figura 5.26. Composição do nível 2 do KEGG para o consórcio microbiano, ensaios 9 e 13-14-15 dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H ₂ , ácidos orgânicos e álcoois.....	186
Figura 5.27 Abundância relativa* de enzimas e números KO relacionados com a degradação de resíduos de café (Degradação de lignina e fenol, degradação de celulose e hemicelulose, degradação de pectina, acidogênese, acetogênese, produção de hidrogênio e enzimas de fungos) no (a) Consórcio microbiano, (b) Ensaio 9 e (c) Ensaios 13-14-15.	187
Figura 5.28 Proposta de rota metabólica para produção de H ₂ , etanol, ácido acético e láctico da co-digestão de resíduos de café sob diferentes condições operacionais.	195
Figura 5.29. Cinéticas de produção de H ₂ acumulado e ajuste ao modelo de Gompertz modificado dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação que conduzem ao consumo de H ₂ por homoacetogênese	197

Figura 5.30. Produção de H ₂ dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação que conduzem ao consumo de H ₂ por homoacetogênese.	199
Figura 5.31. Redução de carboidratos, aumento dos sólidos suspensos totais (SST), aumento do fenol e Potencial máximo de produção de H ₂ (P) dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação que conduzem ao consumo de H ₂ por homoacetogênese.....	205
Figura 5.32. Demanda química de oxigênio (DQO) e potencial máximo de produção de H ₂ (P) dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação que conduzem ao consumo de H ₂ por homoacetogênese.....	210
Figura 5.33. Balanço de massa dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação que conduzem ao consumo de H ₂ por homoacetogênese	213
Figura 5.34. (a) Produção de ácido acético por homoacetogênese e (b) Diminuição do H ₂ acumulado dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação que conduzem ao consumo de H ₂ por homoacetogênese	221
Figura 5.35. Cinéticas de produção de H ₂ acumulado e ajuste ao modelo de Gompertz modificado dos reatores em batelada da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H ₂	228
Figura 5.36. Variação temporal de H ₂ e ácido acético dos reatores em batelada da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H ₂ e II de avaliação da homoacetogênese	230
Figura 5.37. Superfície de resposta e curva de contorno para a produção de H ₂ com os fatores <i>headspace</i> , pH e concentração de polpa e casca dos reatores em batelada da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H ₂	236
Figura 5.38. Produção de H ₂ , redução de carboidratos dissolvidos, aumento da demanda química de oxigênio (DQO) e redução do fenol dos reatores em batelada da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H ₂	241
Figura 5.39. Produção de ácidos orgânicos e álcoois dos reatores em batelada da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H ₂ e II de avaliação da homoacetogênese	247
Figura 5.40. Intervalos de confiança do (a) Aumento de ácido acético por homoacetogênese (Ac _{Homo}) e (b) Diminuição de H ₂ dos reatores em batelada durante a etapa II de avaliação da homoacetogênese.....	254
Figura 5.41. (a) Variação do H ₂ acumulado, carboidratos dissolvidos e sólidos suspensos totais (SST) (b) Variação do H ₂ acumulado, demanda química de oxigênio (DQO) e fenol dos reatores em batelada da etapa II de avaliação da homoacetogênese	257
Figura 5.42. Dendograma (Correlação de Pearson) do perfil de bandas de DGGE para Bactérias dos reatores em batelada da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H ₂ e II de avaliação da homoacetogênese.....	266
Figura 5.43. Dendograma (Correlação de Pearson) do perfil de bandas de DGGE para Fungos dos reatores em batelada da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H ₂	269
Figura 5.44. Índices ecológicos para bactérias e fungos dos reatores em batelada da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H ₂ e II de avaliação da homoacetogênese	272
Figura 5.45. Curvas de rarefação da riqueza de Famílias no ensaio 5 da (a) Etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H ₂ e (b) Etapa II de avaliação da homoacetogênese.....	274

Figura 5.46. Curvas de rarefação para descrever a riqueza de Gêneros no ensaio 5 da (a) Etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H ₂ e (b) Etapa II de avaliação da homoacetogênese	275
Figura 5.47. Grupos taxonômicos para (a) Famílias e (b) Gêneros de Bactérias no ensaio 5 da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H ₂ e II de avaliação da homoacetogênese	276
Figura 5.48. Grupos taxonômicos para (a) Filos e (b) Gêneros de Fungos no ensaio 5 durante a etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H ₂ e II de avaliação da homoacetogênese.	280
Figura 5.49. Diagrama de Venn dos gêneros de microorganismos do ensaio 5 da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H ₂ e II de avaliação da homoacetogênese.	281
Figura 5.50. Curvas de rarefação para descrever a riqueza de KOs da (a) Etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H ₂ e (b) Etapa II de avaliação da homoacetogênese	282
Figura 5.51. Composição da categoria Kegg de nível 2 para o ensaio 5 da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H ₂ e II de avaliação da homoacetogênese.....	283
Figura 5.52. Abundância relativa* de KOs relacionados com as etapas de Hidrólise, Acidogênese e Acetogênese para o ensaio 5 da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H ₂ e II de avaliação da homoacetogênese	284
Figura 5.53. Abundância relativa* de enzimas e KOs do ensaio 5 da (a) Etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H ₂ e (b) Etapa II de avaliação da homoacetogênese	286
Figura 5.54. Proposta de rota metabólica para produção de H ₂ e consumo via homoacetogênese, produção de butanol, ácido propiônico e lático	287
Figura 5.55. Diagrama de venn relacionado (a) KOs (b) Enzimas de produção e consumo de hidrogênio* para o ensaio 5 da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H ₂ e II de avaliação da homoacetogênese	293
Figura 5.56. Abundância relativa* de genes de enzimas relacionados com o metabolismo de fungos para o ensaio 5 da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H ₂ e II de avaliação da homoacetogênese.	294
Figura 5.57. Cinética de produção de H ₂ e ajuste ao modelo de Gompertz modificado do ensaio de validação do modelo otimizado de produção de H ₂ a partir de resíduos de café... ..	296
Figura 5.58. Curvas de rarefação para descrever a riqueza de (a) Famílias e (b) Gêneros do ensaio de validação do modelo otimizado de produção de H ₂ a partir de resíduos de café.. ..	300
Figura 5.59. Grupos taxonômicos para (a) Famílias e (b) Gêneros de Bactérias do ensaio de validação do modelo otimizado de produção de H ₂ a partir de resíduos de café.....	302
Figura 5.60. Grupos taxonômicos para (a) Filos e (b) Gêneros de Fungos do ensaio de validação do modelo otimizado de produção de H ₂ a partir de resíduos de café.....	304
Figura 5.61. Curvas de rarefação para descrever a riqueza de KOs do ensaio de validação do modelo otimizado de produção de H ₂ a partir de resíduos de café	306
Figura 5.62. Composição da categoria Kegg de nível 2 do ensaio de validação do modelo otimizado de produção de H ₂ a partir de resíduos de café	307
Figura 5.63. Composição da categoria Kegg de nível 2 do ensaio de validação do modelo otimizado de produção de H ₂ a partir de resíduos de café	307

Figura 5.64. Abundância relativa* de enzimas e KOs relacionados com a produção de hidrogênio do ensaio de validação do modelo otimizado de produção de H ₂ a partir de resíduos de café	309
Figura 5.65. Proposta de rota metabólica para produção de H ₂ a partir de resíduos de café sob condições otimizadas	310
Figura 5.66. Abundância relativa* de genes de enzimas relacionados com o metabolismo de fungos do ensaio de validação do modelo otimizado de produção de H ₂ a partir de resíduos de café.....	313

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Pré-tratamentos físicos e químicos de resíduos lignocelulósicos de café e outros resíduos.....	44
Tabela 3.2: Produção de H ₂ a partir de resíduos do processamento de café.	50
Tabela 3.3: Co-digestão de resíduos de café e outras indústrias	53
Tabela 3.4: Fatores que afetam a produção de hidrogênio com resíduos de café..	54
Tabela 3.5: Causas e estratégias de controle da homoacetogênese durante a produção de H ₂	62
Tabela 3.6: Estudo da diversidade microbiana associada a resíduos de café.....	68
Tabela 3.7: Estudo de processos aplicando desenhos experimentais fatoriais.....	71
Tabela 4.1: Condições do pré-tratamento hidrotérmico da polpa e casca de café.	80
Tabela 4.2: Avaliação do efeito da co-digestão de resíduos de café brutos ou pré-tratados..	81
Tabela 4.3: Matrix experimental para avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H ₂ , ácidos orgânicos e álcoois.....	83
Tabela 4.4: Matrix experimental para a avaliação dos fatores da fermentação no consumo de H ₂ por homoacetogênese..	86
Tabela 4.5: Matrix experimental para a seleção das condições de fermentação de otimização da produção de H ₂	89
Tabela 4.6: Análises físico-químicas e cromatográficas realizadas nas diferentes etapas experimentais.....	92
Tabela 4.7: Análises da comunidade microbiana nas diferentes etapas experimentais	96
Tabela 5.1: Caracterização da água residuária do processamento de café.	101
Tabela 5.2: Caracterização do resíduo de polpa e casca de café.	102
Tabela 5.3: Parâmetros cinéticos e carboidratos dos reatores em batelada da fermentação de resíduos de café brutos ou pré-tratados	111
Tabela 5.4: Carboidratos da fase líquida dos reatores em batelada da fermentação de resíduos de café brutos ou pré-tratados.....	112
Tabela 5.5: Carboidratos da fase sólida dos reatores em batelada da fermentação de resíduos de café brutos ou pré-tratados.....	113
Tabela 5.6: Parâmetros físico-químicos dos reatores em batelada da fermentação de resíduos de café brutos ou pré-tratados.....	114
Tabela 5.7: Produção de metabólitos solúveis e balanço de massa dos reatores em batelada da fermentação de resíduos de café brutos ou pré-tratados.....	137
Tabela 5.8: Parâmetros cinéticos e físico-químicos dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H ₂ , ácidos orgânicos e álcoois.	139
Tabela 5.9: Ácidos orgânicos, álcoois e pH dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H ₂ , ácidos orgânicos e álcoois	147
Tabela 5.10: Parâmetros cinéticos da produção de H ₂ dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H ₂ , ácidos orgânicos e álcoois.....	161
Tabela 5.11: Análise estatística dos parâmetros cinéticos dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação no consumo de H ₂ por homoacetogênese.....	198
Tabela 5.12: Parâmetros físico-químicos dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação no consumo de H ₂ por homoacetogênese	204
Tabela 5.13: Análise estatística dos parâmetros físico-químicos dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação no consumo de H ₂ por homoacetogênese.....	206

Tabela 5.14: Ácidos orgânicos e álcoois e pH dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação no consumo de H ₂ por homoacetogênese.	211
Tabela 5.15: Análise estatística dos ácidos orgânicos e álcoois dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação no consumo de H ₂ por homoacetogênese	216
Tabela 5.16: Análise estatística da produção de Ac _{Homo} dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação no consumo de H ₂ por homoacetogênese.....	224
Tabela 5.17: Parâmetros cinéticos dos reatores em batelada da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H ₂	229
Tabela 5.18: Modelos dos reatores em batelada da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H ₂	234
Tabela 5.19: ANOVA dos reatores em batelada da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H ₂	235
Tabela 5.20: Parâmetros físico-químicos dos reatores em batelada da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H ₂	240
Tabela 5.21: Ácidos orgânicos, álcoois e pH dos reatores em batelada da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H ₂	245
Tabela 5.22: Ácido acético e H ₂ dos reatores em batelada da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H ₂ e II de avaliação da homoacetogênese	251
Tabela 5.23: Parâmetros físico-químicos dos reatores em batelada da etapa II de avaliação da homoacetogênese	256
Tabela 5.24: Ácidos orgânicos, álcoois e pH dos reatores em batelada da etapa II de avaliação da homoacetogênese.	261
Tabela 5.25: Metabolismos relacionados com a produção e consumo de H ₂ do ensaio 5 da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H ₂ e II de avaliação da homoacetogênese.	285
Tabela 5.26: Validação do modelo de produção de hidrogênio e resultados da operação do reator otimizado a partir de resíduos de café	297
Tabela 6.1: Seleção das condições experimentais de maior produção de hidrogênio a partir da co-digestão de resíduos de café.....	317
Tabela 6.2: Seleção das condições que permitem menor consumo de H ₂ por homoacetogênese a partir da co-digestão de resíduos de café	320

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta G^{0'}$	Energia livre de Gibbs.
16S rRNA	RNA ribossomal subunidade 16S
5-HMF	5-hidroximetilfurfural
Ac _{Homo}	Ácido acético por homoacetogênese
ATCC	American Type Culture Collection
atm	Atmosfera
C/N	Relação carbono / nitrogênio
CH ₄	Metano
CNTP	Condições Normais de Temperatura e Pressão (1 atm, 0 °C)
CO ₂	Dióxido de carbono
COT	Carbono orgânico total
COV	Carga orgânica volumétrica
DCCR	Desenho de composto central rotacional
DQO	Demanda química de oxigênio
DQO:N:P	Relação demanda química de oxigênio : nitrogênio : fosforo
EC	<i>Enzyme Commission Numbers</i>
Eq.	Equação
EtOH	Etanol
<i>H</i>	Produção acumulada de H ₂
H ₂	Hidrogenio
HAc	Ácido acético
HBu	Ácido butírico
HFor	Ácido fórmico
HIsobu	Ácido isobutírico
HIsova	Ácido isovalérico
HLa	Ácido lático
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPr	Ácido propiônico
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i> (Espaçador interno transcrito)
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KO	Ortologia KEGG
<L D	Inferior ao limite de detecção
N ₂	Nitrogênio
<i>P</i>	Potencial máximo de produção de H ₂
PB12	Planejamento Plackett-Burman para 8 fatores com 12 ensaios
PC	Ponto central
PCR-DGGE	Reação em cadeia da polimerase - Eletroforese em gel de gradiente desnaturante
pH ₂	Pressão parcial hidrogênio
<i>Rm</i>	Velocidade máxima de produção de H ₂
Ro	Fator de severidade

sp.	Espécie
SST	sólidos suspensos totais
ST	Sólidos totais
SV	Sólidos voláteis
SV	Sólidos voláteis
t	Tempo
T	Temperatura
TCD	Detector de condutividade térmica
TDH	Tempo de detenção hidráulica
T_{ref}	Temperatura de referência
UASB	Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente com Manta de Lodo
UV	Ultravioleta
α	Significância
λ	Tempo de início da fermentação

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	graus Celsius
μl	microlitro
d	dia
g Carboidratos	grama de carboidratos
DQO L ⁻¹	DQO por litro
g DQO L ⁻¹	grama de demanda química de oxigênio por litro
g etanol g glicose ⁻¹	grama de etanol por grama de glicose
g L ⁻¹	grama por litro
g SV _{substrato} g SV _{inóculo} ⁻¹	grama de SV no substrato por grama de SV no inóculo
h	hora
kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	quilograma de DQO por metro cúbico por dia
kg SV m ⁻³ d ⁻¹	quilograma de SV por metro cúbico por dia
kJ g ⁻¹	kilojoule por grama
L	litro
L H ₂ L _{reator} ⁻¹ d ⁻¹	litro de H ₂ por litro de reator por dia
mg DQO L ⁻¹	miligrama de DQO por litro
mg L ⁻¹	miligrama por litro
mg SST L ⁻¹	miligrama de SST por litro
min	minuto
mL	mililitro
mL CH ₄ g ⁻¹ SV	mililitro de CH ₄ por grama de SV
mL H ₂	mililitro de H ₂
mL H ₂ h ⁻¹	mililitro de H ₂ por hora
mM	milimolar
Mm	milímetro
mmol H ₂ g DQO ⁻¹	milimol de H ₂ por grama de DQO
mmol L ⁻¹	milimol por litro
mol H ₂ mol glicose ⁻¹	mol de H ₂ por mol de glicose
mol H ₂ mol hexose ⁻¹	mol de H ₂ por mol de hexose
mol H ₂ mol sacarose ⁻¹	mol de H ₂ por mol de sacarose
N	normal
N L CH ₄ L ⁻¹ d ⁻¹	litro de CH ₄ por litro por dia nas CNTP
N L H ₂ L ⁻¹ h ⁻¹	litro de H ₂ por litro de reator por dia nas CNTP
N mL CH ₄ g DQO ⁻¹	mililitro de CH ₄ por grama de DQO nas CNTP

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	32
2. OBJETIVOS E HIPÓTESES	36
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	38
3.1. Resíduos do processamento pós-colheita do café	38
3.2. Etapas para a produção biológica de hidrogênio com material lignocelulósico	41
3.2.1. Pré-tratamento	41
3.2.2. Hidrólise	44
3.2.3. Fermentação	46
3.3. Fermentação a partir de resíduos de café	49
3.4. Co-digestão	52
3.5. Fatores que afetam a produção biológica de hidrogênio	53
3.6. Homoacetogênese	60
3.7. Ferramentas de estudo da diversidade microbiana	66
3.8. Desenhos experimentais fatoriais para o estudo de processos biológicos	70
4. MATERIAL E MÉTODOS	74
4.1. Resíduos do processamento do café	76
4.2. Consórcio microbiano	77
4.3. Pré-tratamento	78
4.4. Procedimento experimental	79
4.4.1. Avaliação do efeito do pré-tratamento hidrotérmico nas características físico-químicas do resíduo de polpa e casca de café	79
4.4.2. Avaliação do efeito da co-digestão de resíduos de café brutos ou pré-tratados	80
4.4.3. Avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H ₂ , ácidos orgânicos e álcoois	82
4.4.4. Avaliação dos fatores da fermentação no consumo de H ₂ por homoacetogênese	85
4.4.5. Otimização da produção de hidrogênio	88
4.5. Análises físico-químicas e cromatográficas	91
4.6. Análises cinéticas	95
4.7. Análise da comunidade microbiana	95
4.7.1. Extração de DNA	95
4.7.2. PCR-DGGE	97
4.7.3. Sequenciamento e Análises de Bioinformática	98
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
5.1. Avaliação da obtenção de consórcio microbiano fermentativo a partir dos resíduos do processamento de café (Hipótese 1)	99

5.1.1. Considerações parciais	100
5.2. Caracterização dos resíduos do processamento do café	100
5.3. Avaliação do efeito do pré-tratamento hidrotérmico nas características físico-químicas do resíduo de polpa e casca de café (Hipóteses 2)	104
5.3.1. Caracterização das frações obtidas do pré-tratamento hidrotérmico do resíduo de polpa e casca	104
5.3.2. Considerações parciais	109
5.4. Avaliação do efeito da co-digestão de resíduos de café brutos ou pré-tratados na produção de H ₂ (Hipóteses 3).....	109
5.4.1. Operação dos reatores em batelada com resíduos de café brutos	109
5.4.2. Operação dos reatores em batelada com polpa e casca pré-tratada	119
5.4.3. Operação dos reatores em batelada com frações líquidas do reator hidrotérmico.....	122
5.4.4. Operação dos reatores em batelada com polpa e casca pré-tratada e frações líquidas do reator hidrotérmico	125
5.4.5. Operação dos reatores em batelada com polpa e casca pré-tratada e água residuária	127
5.4.6. Operação dos reatores em batelada com água residuária, polpa e casca pré-tratada e frações líquidas do reator hidrotérmico.....	130
5.4.7. Comparação de resultados	134
5.4.8. Ácidos orgânicos, álcoois e pH	136
5.4.9. Considerações parciais	144
5.5. Avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H ₂ , ácidos orgânicos e álcoois e caracterizar a comunidade microbiana (Hipóteses 4).....	145
5.5.1. Parâmetros cinéticos	145
5.5.2. Parâmetros físico-químicos	152
5.5.3. Ácidos orgânicos, álcoois e pH	159
5.5.4. Caracterização taxonômica e funcional da comunidade microbiana.....	168
5.5.3. Considerações parciais	196
5.6. Avaliação dos fatores da fermentação que conduzem ao consumo de H ₂ por homoacetogênese (Hipóteses 5).....	196
5.6.1. Parâmetros cinéticos da produção de H ₂	196
5.6.2. Parâmetros físico-químicos	203
5.6.3. Ácidos orgânicos, álcoois e pH	211
5.6.4. Homoacetogênese.....	220
5.6.2. Considerações parciais	226
5.7. Seleção das condições de fermentação de otimização da produção de H ₂ e avaliação da homoacetogênese (Hipóteses 6)	227
5.7.1. Parâmetros cinéticos da Etapa I (Produção de H ₂)	227
5.7.2. Parâmetros físico-químicos da Etapa I (Produção de H ₂).....	239

5.7.3. Ácidos orgânicos, álcoois e pH da Etapa I (Produção de H ₂)	244
5.7.4. Ácido acético, H ₂ e parâmetros físico-químicos da Etapa II (Homoacetogênese)	250
5.7.5. Ácidos orgânicos, álcoois e pH da Etapa II (Homoacetogênese).....	260
5.7.6. Caraterização taxonômica e funcional da comunidade microbiana (Etapa I e II)	265
5.7.7. Validação do modelo para a produção de hidrogênio	295
5.7.8. Caraterização taxonômica e funcional da comunidade microbiana do reator otimizado	299
5.7.3. Considerações parciais	313
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	316
7. CONCLUSÕES	322
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	324

1. INTRODUÇÃO

Resíduos agrícolas renováveis e abundantes, como os procedentes do processamento pós-colheita do café, são matérias primas interessantes para a fermentação e obtenção de produtos biotecnológicos. Isto porque os resíduos sólidos do processamento de café (casca e polpa) são aproximadamente 45% do grão (Murthy and Madhava Naidu, 2012), e entre 5.000 e 15.000 L de água residuária são geradas por cada tonelada de café processado (Woldesenbet et al., 2014). Por exemplo, no Brasil para a safra de 2018 foram beneficiadas aproximadamente 60 milhões de sacas de café (CONAB, 2017), sendo produzido 27 milhões de resíduos de polpa e casca e entre $1,8 \times 10^{10}$ e $5,4 \times 10^{10}$ L de água residuária.

A polpa e casca de café podem ser reutilizados como fertilizantes, incorporados na alimentação animal ou usados na compostagem. No entanto, devido à expressiva quantidade produzida destes resíduos é possível sua aplicação em novas alternativas de reuso, uma vez que ao ser rico em lignocelulose, torna-se substrato ideal, por exemplo, para os processos fermentativos (dos Santos et al., 2018; Nguyen et al., 2013).

Em relação especificamente a água residuária do processamento de café tem sido usada na obtenção de etanol, metano ou aplicada na irrigação (após pré-tratamento). Todavia, tradicionalmente esta água residuária é despejada nos rios ou armazenada em tanques para novos processos de beneficiamento úmido (Rattan et al., 2015). Destaca-se que o reuso dessa água residuária é limitado, devido a presença de cafeína, fenóis e polifenóis na sua composição, os quais podem causar reconhecido efeito inibitório sobre diversos organismos (Rattan et al., 2015).

Por outro lado, estes resíduos podem ser usados em processos fermentativos, para obtenção de bio-produtos, microrganismos ou enzimas com aplicação biotecnológica. Por exemplo, a polpa e casca contém alto teor de carboidratos (70%), dos quais 16 - 43% estão na forma de celulose e 7 - 29% de hemicelulose. A água residuária do processamento de café contém elevada concentração de matéria orgânica ($17.244 \text{ mg DQO L}^{-1}$), além de macro e micronutrientes (nitrogênio, fosforo e potássio entre 23 e 625 mg L^{-1}) (Bondesson, 2015; Gouvea et al., 2009; Rossmann et al., 2013, 2012). Adicionalmente, durante a fermentação de café no processamento pós-colheita, verificou-se complexa comunidade microbiana, com bactérias semelhantes a *Fructobacillus* sp., *Pseudonocardia* sp., *Pedobacter* sp., *Sphingomonas* sp. e *Hymenobacter* sp., (de Carvalho et al., 2018) e fungos como *Saccharomyces* sp., *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia kluyveri*, *Hanseniaspora uvarum*, *H.*

vineae e *Meyerozyma caribbica* (de Carvalho Neto et al., 2017), e enzimas para a degradação da carboidratos e produção de ácidos orgânicos, etanol e biogás.

A abundante população microbiana torna os resíduos de café matriz interessante para a bio-prospecção de enzimas e microrganismos com capacidade de metabolizar diferentes substratos, se adaptar a condições ambientais adversas, resistir a inibidores, sintetizar novos produtos com aplicação comercial e aumentar a eficiência dos processos fermentativos.

Todavia, devido à baixa degradabilidade dos resíduos lignocelulósicos (como a polpa e casca de café) e presença de compostos inibitórios como polifenóis (maior que 9% no resíduo sólido e até 1528 mg L⁻¹ na água residuária) (Shemekite et al., 2014; Villa-Montoya et al., 2016), podem limitar a utilização microbiana dos resíduos de café.

Para reduzir estas barreiras pode-se aplicar o pré-tratamento hidrotérmico sobre a polpa e casca de café, com a finalidade de diminuir a cristalinidade e rigidez da estrutura lignocelulósica, liberando açúcares fermentáveis (principalmente celulose) e aumentando o acesso enzimático (Waldron, 2010; Abu Tayeh et al., 2016).

A co-digestão de resíduos de café também pode resultar no incremento da atividade microbiana, uma vez que permite a melhoria nas características dos substratos, equilibrando a relação C/N, concentração de macro e micronutrientes, pH, alcalinidade e compostos inibitórios (Mata-Alvarez et al., 2011).

A aplicação de microrganismos tolerantes as concentrações altas de polifenóis pode permitir superar os efeitos deletérios dos resíduos de café, através da bio-aumentação de consórcio microbiano autóctone, que adicionalmente possuam metabolismos hidrolíticos e fermentativos que favoreçam a degradabilidade. O uso de bactérias e fungos com estas atividades metabólicas tem sido referenciado como benéfico por outros pesquisadores. Por exemplo, Henske et al. (2018) avaliaram a conversão de substratos lignocelulósicos (5 - 10 g L⁻¹ de palha de milho, gramíneas e hastes de alfafa) por fungos anaeróbios como *N. californiae* e *A. robustusisolados*, e observaram que 49% da celulose foi transformada em glicose, principalmente agindo sobre a galactose, arabinose e manose. Por outro lado, Zhang et al. (2015), avaliaram a fermentação de talo de milho (15 g L⁻¹), sem pré-tratamento, com *Clostridium* sp. FZ11, sendo obtido até 45% de transformação da celulose e 53% da hemicelulose em H₂, utilizando reator em batelada a 35-39 °C e pH 6,0-7,0.

Um bio-produto interessante da fermentação é o H₂, que pode ser utilizado para a obtenção de eletricidade devido ao seu potencial energético alto (142 kJ g⁻¹), possibilitando a

geração de energia limpa a partir da biomassa renovável, sendo a água o único subproduto (Luo et al., 2011; Penteado et al., 2013). Esta energia poderia ser utilizada para a secagem e torrefação dos grãos nas fazendas de café, significando redução de gastos no setor.

O potencial de fermentação com microrganismos autóctones é uma característica interessante do uso de resíduos de café para a produção de H_2 . Em pesquisas sobre os microrganismos associados ao processamento via úmida de café, verificou-se a presença de *Enterobacter* sp., *Pantoea* sp., *Bacillus* sp. e *Rahnella* sp., bactérias produtoras de H_2 (Feng et al., 2016; Hamdouche et al., 2016; Marone et al., 2012; Zhu et al., 2008). No entanto, *Clostridium* sp. também foi identificado, o qual tem a capacidade de consumir o H_2 e CO_2 para a produção de ácido acético via homoacetogênese (Saady, 2013).

O controle da homoacetogênese representa grande desafio, devido a sua ocorrência em ampla variedade de processos fermentativos, independente da configuração do reator, origem do inóculo e condições operacionais, consumindo entre 11 e 43% do H_2 presente nos reatores, para a síntese de ácido acético a partir de CO_2 e H_2 (Saady, 2013).

Uma das medidas de controle mais aplicadas aos microrganismos consumidores de H_2 são os pré-tratamentos físicos ou químicos, entretanto, estes são eficientes somente em curto prazo, já que muitas bactérias são produtoras de endósporos e podem se adaptar as novas condições ambientais, ou as próprias bactérias produtoras de hidrogênio podem realizar também homoacetogênese. Desse modo, o controle da fermentação é necessário para a inibição da atividade homoacetogênica (Luo et al., 2011; Saady, 2013).

Diante da ausência de informação sobre a co-digestão de resíduos de café, se faz necessário a realização de estudos aprofundados para mapear as condições biológicas e físico-químicas mais importantes para a produção de H_2 e homoacetogênese. Para isto, a aplicação de desenhos fatoriais (como a metodologia Plankket e Burman e desenho de composto central rotacional) amplia o conhecimento do processo biológico. Adicionalmente, a aplicação de ferramentas moleculares, como a análise metagenômica, pode acessar a dados sobre diversidade funcional e taxonômica da fermentação (Hung et al., 2011; Bakonyi et al., 2014; Vasconcelos et al., 2016). A partir desta informação podem ser identificados microrganismos procarióticos e eucarióticos, enzimas e inferir sobre possíveis rotas bioquímicas do processo fermentativo para a obtenção de bio-produtos de interesse, e inclusive detectar as condições de mudança de rota bioquímica produtora de H_2 para homoacetogênese

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

Neste cenário, a motivação deste trabalho foi avaliar o uso dos resíduos do processamento de café como substrato para co-digestão e fonte de consórcio microbiano, por meio da análise das condições de produção de ácidos orgânicos, álcoois e homoacetogênese, além de otimizar a produção de H_2 . Adicionalmente, foi possível analisar o perfil taxonômico e funcional associado as diferentes condições de fermentação.

2. OBJETIVOS E HIPÓTESES

Hipótese geral: Os resíduos do processamento de café são substratos para a produção de H_2 , ácidos orgânicos, álcoois e homoacetogênese, além de fonte de bactérias anaeróbias e fungos.

Objetivo geral: Identificar as condições da fermentação para obtenção de H_2 , ácidos orgânicos, álcoois e homoacetogênese, por meio da co-digestão de resíduos do processamento de café e consórcio de microrganismos autóctones.

Hipóteses 1: Nos resíduos do processamento de café tem-se bactérias e fungos anaeróbios autóctones que podem ser usados como consórcio microbiano para a fermentação.

Objetivo 1: Avaliar a obtenção de consórcio microbiano fermentativo a partir dos resíduos do processamento de café.

Hipóteses 2: Por meio da aplicação de pré-tratamento hidrotérmico tem-se modificação das características físico-químicas do resíduo de polpa e casca de café, por conseguinte é possível obter substratos com maior potencial para a produção de H_2 .

Objetivo 2: Avaliar o efeito do pré-tratamento hidrotérmico nas características físico-químicas do resíduo de polpa e casca de café.

Hipóteses 3: Por meio da co-digestão de resíduos de café tem-se maior produção de H_2 .

Objetivo 3: Avaliar o efeito da co-digestão de resíduos de café brutos ou pré-tratados na produção de H_2 .

Hipóteses 4: Alterações nos fatores da fermentação permitem aumentar a produção de H_2 , ácidos orgânicos e álcoois e modificar a comunidade microbiana.

Objetivo 4: Avaliar o efeito dos fatores da fermentação sobre a produção de H_2 , ácidos orgânicos e álcoois e caracterizar a comunidade microbiana.

Hipótese 5: Alterações nos fatores da fermentação modifica a rota metabólica para consumo de H_2 por homoacetogênese.

Objetivo 5: Avaliar os fatores da fermentação que conduzem ao consumo de H_2 por homoacetogênese.

Hipótese 6: Em função da seleção das condições de fermentação pode-se otimizar a produção de H_2 e diminuir o consumo de H_2 por homoacetogênese.

Objetivo 6: Avaliar as condições de fermentação para otimizar a produção de H_2 .

Hipótese 7: Em função das condições operacionais dos reatores em batelada com resíduos de caé tem-se alteração da comunidade microbiana e dos genes funcionais.

Objetivo 7: Comparar o perfil taxonômico e funcional da comunidade microbiana sob diferentes condições de fermentação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A biomassa lignocelulósica, bem como água residuária do processamento de alimentos e indústrias químicas, pode ser usada como substratos para a obtenção de produtos de interesse biotecnológico. Dentre essas possibilidades tem-se os resíduos líquidos e sólidos do despulpamento de café, bagaço de cana de açúcar, palha de trigo, palmeira de óleo, palha de milho, resíduos de alimentos, palha de arroz, melaço, efluente de cervejaria, água residuária da indústria de leite (Chun-Min and Shu-Yii., 2016) entre outros que são ricos em compostos orgânicos, principalmente carboidratos.

Destaca-se na água residuária do processamento de café o alto teor de carboidratos (Gómez et al., 2011), principal substrato para as bactérias fermentativas, e o material lignocelulósico a presença de celulose (polímero de glicose), hemicelulose (heteropolímero de pentoses e hexoses) e lignina (polímero aromático), que podem ser degradados por microrganismos anaeróbios (Quéméneur et al., 2012; Nissilä et al., 2014).

Para a digestão anaeróbia de resíduos sólidos como cascas, bagaços, talhos e folhas podem ser observada algumas limitações durante a fase hidrolítica. Isto porque a lignocelulose é um substrato complexo composto por lignina, carboidratos (como celulose e hemicelulose), pectina, proteínas, cinzas, sais e minerais que requer a atividade de uma ampla variedade de enzimas agindo sinergicamente para sua hidrólise (Van Dyk and Pletschke, 2012). Nesse caso, se faz importante o uso de inóculos com abundante atividade celulolítica ou a aplicação de pré-tratamentos físicos e químicos para facilitar acesso aos polissacarídeos fermentáveis, uma vez que contribuem a redução da cristalinidade, desestruturação da lignina e hemicelulose e redução do tamanho da partícula (Van Dyk and Pletschke, 2012).

3.1. Resíduos do processamento pós-colheita do café

Para o processamento do café são utilizados dois métodos, a saber: a via seca e via úmida (Figura 3.1). Esta última é preferida no setor, pois melhora a qualidade dos grãos mediante a remoção da polpa e mucilagem (Kulandaivelu and Bhat, 2012).

O *processamento por via úmida* inclui as etapas de despulpamento, fermentação, lavagem e secagem dos grãos. No despulpamento, a polpa e casca (exocarpo, Figura 3.2) do fruto do café vermelho (cereja) e verde são removidas rapidamente após a colheita.

Posteriormente, a mucilagem (mesocarpo) é retirada através da fermentação dos grãos em tanques ou por meios mecânicos. Portanto, a mucilagem é completamente eliminada com a lavagem do grão. Por fim, os grãos de café são secos ao sol ou em secadores mecânicos (*Processamento seco*). Dois resíduos principais são gerados como subprodutos durante o processamento úmido: água residuária e material sólido lignocelulósico (casca e polpa). Estes resíduos, contém em sua composição heterogênea, compostos inorgânicos e nutrientes (Ntaikou et al., 2010).

Figura 3.1. Vias de processamento pós-colheita de café.

Fonte: Modificado de Rattan et al. (2015).

Figura 3.2. Corte transversal do fruto de café.

Fonte: Modificado de Esau (1960).

Para a água residuária do processamento de café tem-se carga orgânica alta entre 9.270 e 14.800 mg DQO L⁻¹ (até 52.000 mg DQO L⁻¹ para o café da região de Pedregulho – São Paulo), com aproximadamente 60% de DQO na forma dissolvida; açúcares que são rapidamente fermentados provenientes de polpa e mucilagem, pectinas e polissacarídeos e outras substâncias inibitórias encontradas em pequenas quantidades, como taninos, cafeína e polifenóis (Rattan et al., 2015; Sanabria et al., 2012).

Por outro lado, o resíduo sólido (casca + polpa) é rico em nutrientes, e constituído por 35 – 85% de carboidratos, 16 - 43% de celulose, 7 - 29% de hemicelulose e 9 - 28,3% de lignina (Bondesson, 2015; Gouvea et al., 2009). Devido ao alto teor de carboidratos deste substrato, sua aplicação para a fermentação é alternativa interessante. A lignina, macromolécula tridimensional amorfa, esta associada à celulose na parede celular, cuja função é conferir rigidez, impermeabilidade e resistência a ataques microbiológicos e mecânicos aos tecidos vegetais. A hidrólise deste resíduo é passo limitante para a produção de H₂ (Barca et al., 2015). Taninos, potássio e compostos fenólicos também fazem parte da constituição da polpa e casca, local de retenção de até 9% dos polifenóis totais (Hernández et al., 2014; Shemekite et al., 2014).

3.2. Etapas para a produção biológica de hidrogênio com material lignocelulósico

Para a produção biológica de H_2 com material lignocelulósico devem ser consideradas as etapas de i) Pré-tratamento, ii) Hidrólise e iii) Fermentação (Kumar et al., 2015).

Figura 3.3. Etapas para a produção de hidrogênio a partir de resíduos lignocelulosicos (polpa e casca de café).

Fonte: Modificada de Dashtban et al. (2009) e Ahmand et al. (2018a).

3.2.1. Pré-tratamento

Na etapa de pré-tratamento é realizada a ruptura da lignina e da estrutura cristalina da celulose, facilitando o acesso das enzimas durante a hidrólise (Behera et al., 2014). Os pré-tratamentos podem ser classificados como físicos (moagem e irradiação), químicos (ácido, básico, agentes oxidantes e solventes orgânicos) físico-químicos (explosão a vapor, hidrotérmico e oxidação úmida) e biológicos (utilizando consórcios microbianos ou fungos degradadores da lignina) (Ahmad et al., 2018a; Behera et al., 2014).

No pré-tratamento hidrotérmico a biomassa é misturada com água e exposta a temperaturas entre 140 e 220°C e alta pressão a intervalos de tempo definidos. Isto permite manter a água em fase líquida, evita-se a adição de compostos químicos e diminui a formação

de compostos inibitórios (Cheng et al., 2011a). Devido à alta temperatura, geram-se ácidos fortes (como ácido acético) desde a hemicelulose, que estimulam a hidrólise (Ko et al., 2015). O pré-tratamento hidrotérmico tem sido referenciado como o mais efetivo para ampla variedade de substratos, com vantagens como a ausência de adição de compostos químicos, e ser ambientalmente amigável e seguro (Laser, 2002).

A explosão a vapor pode ser realizada em temperatura e período de tempo similar ao pré-tratamento hidrotérmico (150 a 280 °C), injetando vapor a alta pressão ao reator que contém a biomassa lignocelulósica. Uma vez passado o tempo de reação o sistema é despressurizado, resultando no rompimento mecânico da biomassa (Waldron, 2010).

Por meio da aplicação destas tecnologias no resíduo lignocelulósico tem-se a obtenção de duas frações, a saber: sólida (resíduo lignocelulósico pré-tratado) e líquida (hidrolisado), sendo respectivamente compostas principalmente por celulose e açúcares dissolvidos (Datar et al., 2007). A concentração destes compostos está relacionada com a severidade do pré-tratamento, uma vez que a alta severidade observasse alta liberação de hemicelulose na fração líquida e maior mudança estrutural da celulose e lignina, o que conduz a inferior recuperação da fração sólida (Ahmad et al., 2018a).

Para determinar a severidade do pré-tratamento, variáveis do processo como tempo de residência e temperatura são relacionadas com o fator de severidade (Ro) descrito por Overend e Chornet (1987):

$$\log (Ro) = \log(t \cdot \exp^{\frac{T-T_{ref}}{14,75}}) \quad (Eq. 3.1)$$

Sendo:

Ro : Fator de severidade

t : Tempo de residência

T : temperatura

T_{ref} : temperatura de referência (usualmente 100°C).

Durante o pré-tratamento pode ocorrer liberação de compostos inibitórios, como furfural, 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), compostos fenólicos e ácidos fortes, que podem afetar a atividade enzimática de fungos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis*,

Candida shehatae e bactérias como *Thermoanaerobacterium thermosacchararolyticum*, ou *Clostridium butyricum* (Ko et al., 2015; Monlau et al., 2014).

Quéméneur et al. (2012) avaliaram a produção de H_2 em reatores em batelada alimentados com xilose, adicionando furfural (1 g L^{-1}), ou 5-HMF (1 g L^{-1}) ou fenol (1 g L^{-1}) a 37°C , pH 5,5 e lodo anaeróbio pre-tratado termicamente (90°C por 10 min) como inóculo. Os autores constataram diminuição da produção de H_2 com todos os compostos adicionados, obtendo $1.367,7 \text{ mL } H_2 \text{ L}^{-1}$ diante da ausência de inibidores, $244,4 \text{ mL } H_2 \text{ L}^{-1}$ na presença de furfural, $244 \text{ mL } H_2 \text{ L}^{-1}$ com 5-HMF e $480,5 \text{ mL } H_2 \text{ L}^{-1}$ com fenol. A diminuição da produção de H_2 foi associada a presença desses compostos e redução da abundância relativa de bactérias produtoras de H_2 como *Clostridium* sp. Delgenes et al. (1996) também verificaram inibição do metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida shehatae* e *Pichia stipitis* na presença de furfural, HMF e compostos fenólicos como vanilina e siringaldeído, entre 2,0 a $5,0 \text{ g L}^{-1}$ na fermentação em pH 5,6, 30°C , e substratos como glicose e xilose (20 g L^{-1}).

Na Tabela 3.1 analisou-se a aplicação de pré-tratamentos físicos e químicos em resíduos lignocelulósicos (como polpa e casca de café), os quais modificaram a estrutura lignocelulósica mediante a solubilização do carbono orgânico total (COT), deslignificação ou disponibilização de celulose e hemicelulose. Como resultado obteve-se maior degradabilidade dos resíduos, potencializando a produção de biogás, etanol, sacarificação e degradação enzimática (Abu Tayeh et al., 2016b; Ahmad et al., 2018a; Baêta et al., 2017a; Chiyanzy et al., 2014; Menezes et al., 2014; Passos et al., 2018; Soares et al., 2017).

Tabela 3.1: Pré-tratamentos físicos e químicos de resíduos lignocelulósicos de café e outros resíduos.

Pré-tratamento	Material	Modificação:	Efeito sobre o processo biológico:	Referência
Resíduos de café:				
Hidrólise térmica (120 °C por 60 min)	Casca de café	Solubilização de 7,6% do COT	Aumento de 100 para 137 mL CH ₄ g ⁻¹ SV	(Passos et al., 2018)
Explosão a vapor (120 °C por 60 min, Ro:2,37)	Casca de café	Remoção de 29% da celulose, 21% da hemicelulose e 39% da lignina	Aumento de ~63 para 144 mL CH ₄ g DQO ⁻¹	(Baêta et al., 2017b)
Explosão a vapor (210 °C por 15 min, Ro:4,4)	Grãos de café usados	Solubilização de glicana (24 para 25%), hemicelulose (28 para 19%) e lignina (45 para 51%)	Aumento da hidrólise enzimática de 22 para 28%	(Chiyanzy et al., 2014)
Alcalino (4% NaOH por 25 min)	Polpa de café	Aumento de 21 para 69% na celulose, 17 para 44% na hemicelulose e 15 para 21% na lignina	Rendimento na produção de etanol de 0,4 g etanol g glicose ⁻¹	(Menezes et al., 2014)
Outros resíduos:				
Hidrotérmico (180 °C, 12 min, 7,36% H ₂ O ₂)	Bagaço de cana	Deslignificação 73%, remoção de xilana 76%, e aumento da glicana 139,5%.	Aumento de 148 para 323 mL de CH ₄ g ⁻¹	(Ahmad et al., 2018b)
Hidrotérmico (210 °C por 15 min)	Bagaço de cana	-	Máxima produção de H ₂ de 18 mmol L ⁻¹	(Soares et al., 2017)
Hidrotérmico (140 °C, 1 h, ácido formico 0,6M)	Resíduo sólido de oliva moído	Aumento de até 6% na hemicelulose e 4% na celulose	Aumento de duas vezes no rendimento as sacarificação	(Abu Tayeh et al., 2016b)

COT Carbono orgânico total, SV Sólidos voláteis, DQO Demanda química de oxigênio, Ro Fator de severidade.

3.2.2. Hidrólise

Os componentes da biomassa lignocelulósica (celulose, hemicelulose e lignina) podem ser hidrolisados em monossacarídeos, acetil-CoA e CO₂ (Figura 3.4). A celulose é altamente insolúvel, portanto, alguns microrganismos como os fungos *Hypocrea jecorina*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus* sp. e *Penicillium purpurogenum*, e bactérias como *Clostridium thermocellum*, *Cellulomonas flavigena* e *Pseudomonas fluorescens* podem ser aplicados na degradação desta molécula. A hidrólise acontece mediante a liberação de enzimas celulolíticas por bactérias anaeróbias e fungos, ou mediante um complexo chamado *celulosoma*, em bactérias anaeróbias como *Clostridium* sp. (Lynd et al., 2002).

Figura 3.4. Hidrólise de resíduos lignocelulósicos (polpa e casca de café).

Fonte: Modificada de Li et al. (2009), Lynd et al. (2002), Van Dyk e Pletschke (2012).

Enzimas como as endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases agem na superfície do material celulósico, mediante uma série de reações para tornar a celulose acessível até a sua transformação em açúcares simples (Ruggeri et al., 2015). A endo- β -1,4-D-glucanase atua sobre a celulose amorfa e a reduz em pequenos fragmentos. Posteriormente, a exo- β -1,4-D-glucanase transforma a celulose cristalina em açúcares simples, como celobiose e celodextrina, os quais são finalmente convertidos em glicose através da β -glicosidase (Soni et al., 2010).

A hemicelulose livre obtida durante o pré-tratamento (físico, químico ou biológico) é transformada pela ação de hemicelulases, sendo as principais as xilanases (especificamente a endo-1,4- β -xilanase), as quais hidrolisam as ligações entre as xiloses permitindo sua degradação (Cheng et al., 2011a). Alguns açúcares monoméricos e oligoméricos como xilose, manose, arabinose, galactose e glicose são liberados durante esta reação (Ren et al., 2009).

Em ambientes anaeróbios, somente bactérias tem a capacidade de degradar lignina e compostos fenólicos, devido a presença de enzimas ligninases, destacando-se fenilfosfato sintetase, fenilfosfato carboxilase, 4-hidroxibenzoato CoA ligase, 4-hidroxibenzoil redutase e

benzoilCoA redutase (Li et al., 2009). Por meio destas enzimas associadas a β -oxidação tem-se a transformação da lignina em acetil-CoA e CO₂ (Li et al., 2009).

A hidrólise afeta diretamente a eficiência de produção de H₂, embora, para permitir a redução de custos e aplicação em larga escala é possível realização simultânea da hidrólise e fermentação, mediante a aplicação de consórcio microbiano com alta diversidade metabólica.

3.2.3. Fermentação

As rotas da fermentação em bactérias são determinadas pelos produtos formados, sendo de duas formas principais: i) fermentação ácido-butírica (Clostridial) e ii) fermentação ácido-mista (Entérica). Para ambos os casos, o primeiro passo é a conversão da glicose em ácido pirúvico com formação de NADH via glicólise (Equação 3.2):

Na **fermentação ácido-butírica (Clostridial)**, os substratos são convertidos em gliceraldeído-3-fosfato e, posteriormente, em ácido pirúvico via glicólise (Figura 3.5). A glicose é transformada em gliceraldeído-3-fosfato mediante as enzimas hexoquinase, fosfoglicose isomerase, fosfofrutoquinase e aldolase (de Sá et al., 2014). Posteriormente, o ácido pirúvico é oxidado a acetil-CoA mediante a Piruvato-ferrodoxina oxidorreductase na presença de ferrodoxina. Hidrogênio é sintetizado mediante Hidrogenases que reduzem prótons utilizando elétrons da ferrodoxina. O acetil-CoA pode ser fosforilado pela Fosfotranscetilase ou Fosfotransbutilase, sintetizando ácido acético e butírico, respectivamente (de Sá et al., 2014; Sikora et al., 2013).

Dependendo do ácido predominante, muda a composição do biogás, sendo de aproximadamente 67% de H₂ com síntese de ácido acético ou 50% de H₂ com síntese de ácido butírico (Barca et al., 2015). Bactérias formadoras de endósporos, como *Clostridium* sp., *Bacillus* sp. e *Ruminococcus* sp. são representantes da rota ácido-butírica.

Figura 3.5. Rota metabólica de fermentação ácido-butírica (Clostridial).

(1) Hidrólise de dissacarídeos, (2) Hexoquinase, (3) Fosfoglicose isomerase, (4) Fosfofrutoquinase, (5) Aldolase, (6) Piruvato-ferredoxina oxidorreductase, (7) Hidrogenase, (8) NAD(P)H-ferredoxina reductase, (9) Ferredoxina-NAD(P)⁺reductase; (10) Fosfotranscetilase quinase, (11) Acetato quinase, (12) Fosfotransbutilase quinase, (13) Butirato quinase, (14) Xilose isomerase, (15) Xiluloquinase. Fonte: Modificada de De Sá, Cammarota; Ferreira-Leitão (2014).

Na **fermentação entérica**, a enzima acetato formiato liase transforma o ácido pirúvico em acetil-CoA e ácido fórmico (Figura 3.6). Enzimas formiato hidrogênio liase convertem o ácido fórmico em H₂ e CO₂. Ácidos orgânicos e álcoois também são sintetizados, tendo-se dois padrões de produtos: i) Fermentação ácida mista com formação de etanol e ácidos acético, láctico e succínico, por bactérias como *Escherichia* sp., *Salmonella* sp., *Proteus* sp. entre outros; ii) Fermentação do butanodiol com síntese de 2,3-butanodiol, etanol e ácidos orgânicos em concentrações baixas, como láctico, acético e succínico, por *Enterobacter* sp., *Serratia* sp., *Erwinia* sp. e alguns *Bacillus* sp. Sob tais condições têm-se rendimentos inferiores entre 0,2-3,0 mol H₂ mol⁻¹ hexose (Hallenbeck and Ghosh, 2009; Sikora et al., 2013).

Figura 3.6. Rota metabólica de fermentação entérica.

(1) Acetato/formato liase, (2) Formato hidrogeno liase, (3) Fosfotranscetolase, (4) Acetato quinase, (5) Álcool desidrogenase, (6) Lactato desidrogenase, (7) Malato desidrogenase, (8) Fumarato hidratase (B e C), (9) Fumarato redutase (A, B, C e D) (A rota que conduz a síntese de H_2 está marcada em vermelho). Fonte: Modificada de Hallenbeck; Ghosh (2013) e Sikora et al. (2013).

Em condições de ausência de oxigênio, leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* podem realizar a fermentação alcoólica a partir de alguns dissacarídeos (como maltose e sacarose) e monossacarídeos (como glicose, manose, frutose e galactose, Figura 3.7) (Pronk et al., 1996). O principal produto da fermentação é o etanol, tendo-se 2 mols de etanol por 1 mol de glicose. No entanto, outros bio-produtos podem ser observados, como glicerol, ácidos orgânicos, ésteres e aldeídos (Lea and Piggott, 2003).

Figura 3.7. Rota metabólica de fermentação por leveduras.

(1) Transportador mitocondrial de ácido pirúvico, (2) Piruvato desidrogenase, (3) Piruvato descarboxilase, (4) Acetaldeído desidrogenase, (5) Acetil-CoA sintetase, (6) Transportador, (7) Álcool desidrogenase, (8) Piruvato carboxilase. Fonte: Modificada de Pronk et al. (1996).

3.3. Fermentação a partir de resíduos de café

As diferentes possibilidades de obtenção de H_2 a partir dos resíduos do processamento de café estão delineados na Tabela 3.3. Jung et al. (2010) compararam a produção de H_2 em reatores em batelada e UASB a partir de água residuária do processamento de café. O inóculo utilizado no reator UASB foi provindo da auto-fermentação em reator em batelada. Diante da aparição de bactérias produtoras de ácido láctico, o inóculo foi pré-tratado a 50-90°C por 20 min. A concentração de biomassa de 60 g SSV L^{-1} evitou a proliferação das bactérias produtoras de ácido láctico, obtendo-se máximo rendimento de 1,3 mol H_2 mol $^{-1}$ hexose e máxima produção de 2,59 L H_2 L^{-1} h $^{-1}$.

Tabela 3.2: Produção de H₂ a partir de resíduos do processamento de café.

Reator	Substratos	Inóculo	Concentração de substrato (g DQO L ⁻¹)	Tempo de fermentação (h)	Temp. (°C)	pH	Rendimento (mol H ₂ mol ⁻¹ hexose)	Produção (L H ₂ L ⁻¹ h ⁻¹)	Referência
UASB	Água residuária de café	Grânulos obtidos a partir da água residuária (30%)	20	6	35	5,5	1,3	2,59	(Jung et al., 2010)
Mistura completa		Lodo anaeróbico pré-tratado termicamente (43%)	20	8	35	5,5	0,3	0,31	
UASB	Água residuária de café	Grânulos obtidos a partir da água residuária (43%)	20	6	35	5,5	1,8	2,76	(Jung et al., 2011b)
UASB	Água residuária de café	Grânulos obtidos a partir da água residuária (43%)	31	6	55	5,5	2,6	<i>1,37</i> (39,6 L H ₂ L ⁻¹ d ⁻¹)	(Jung et al., 2012)
Batelada anaeróbia alimentada	Mucilagem em co-digestão com dejetos de suinocultura	Microrganismos selecionados mediante ensaio prévio	9,8	720 (30 d)	55	5,5	- (2,5 mol H ₂ mol ⁻¹ glicose)	<i>0,32</i> (7,6 L H ₂ L ⁻¹ d ⁻¹)	(Hernández et al., 2014)
Mistura completa	Fração líquida do pré-tratamento com ozônio de casca de café	Lodo anaeróbico e esterco bovino	39,5	700	35	7,0	- (19 mL H ₂ g ⁻¹ casca ou 48,5 mL H ₂ g ⁻¹ DQO)	---	(dos Santos et al., 2018)

UASB Reator Anaeróbico de Fluxo Ascendente com Manta de Lodo, DQO Demanda Química de Oxigênio. * Em letra cursiva dados calculados a partir dos dados publicados por cada autor.

Em 2011, os mesmos autores avaliaram o tempo de partida do sistema UASB mediante a adição de inóculo produzido no sistema em batelada, como descrito anteriormente. O sistema UASB continha 30% de volume de lodo do digestor anaeróbio pré-tratado a 90 °C por 20 min. Mediante a aplicação deste inóculo, foram necessários 5,5 d para que os reatores UASB atingissem rendimento de 1,8 mol H₂ mol⁻¹ hexose e produção de 2,45 H₂ L⁻¹ h⁻¹ (Jung et al., 2011b).

Para 2012, Jung et al. (2012) avaliaram aumento na concentração de água residuária do processamento de café (entre 10 e 40 g DQO L⁻¹) e operação termofílica (55 °C) de reatores UASB de dois estágios para a produção de H₂ e CH₄. Os autores obtiveram remoção de 97% de DQO e rendimento máximo de 2,6 mol H₂ mol⁻¹ hexose e produção máxima de 1,37 L H₂ L⁻¹ h⁻¹.

Hernández et al. (2014) avaliaram a produção de H₂ em reatores em batelada com variação da proporção de mucilagem de café (MC) e esterco de suinocultura (ES) de 7:3, 5:5 e 3:7. Os autores relataram aumento da concentração de carboidratos proporcionalmente com a de mucilagem na mistura, decorrente da presença de monossacarídeos na forma dissolvida, proporcionando maior produção de H₂. A relação 5:5 (MC:ES) permitiu maior estabilidade e produção de H₂ (557,7 L H₂ L⁻¹ d⁻¹), sendo selecionada para a aplicação de uma COV superior de 12,1 g DQO L⁻¹ d⁻¹. Durante este último teste, foi observado máxima produção H₂ do sistema de 0,32 L H₂ L⁻¹ d⁻¹ com teor H₂ de 39%, pelo qual o aumento da carga levou a maior produção de ácidos orgânicos e rendimento H₂ (2,5 mol H₂ mol⁻¹ de glicose) como consequência da dominância da rota acética que produz 4 moles de H₂ por cada reação.

Dos Santos et al. (2008) avaliaram o pré-tratamento por ozônio da casca de café a fim de utilizar a fração líquida para produção de H₂ e CH₄ em reator de mistura completa. As melhores condições de pré-tratamento foram pH 11, aplicação de ozônio de 18,5 mg O₃ g⁻¹ de casca e relação líquido/sólido de 10 mL g⁻¹, a partir das quais obteve-se 19 mL H₂ g⁻¹ casca e 48,5 mL H₂ g DQO⁻¹.

Apesar do aumento de pesquisas em relação ao uso de resíduos da cafeicultura para produção de bioenergia, ainda existem lacunas a serem preenchidas a respeito do potencial destes resíduos sólidos na produção de H₂, principalmente mediante a co-digestão de água residuária, polpa e casca de café, evidenciando amplo campo a ser explorado.

3.4. Co-digestão

Denomina-se co-digestão à digestão da mistura de dois ou mais substratos com características complementares em um único reator (Mata-Alvarez et al., 2011). Aspectos melhorados durante a co-digestão são o equilíbrio na relação C/N, macro e micronutrientes, pH, alcalinidade e compostos inibitórios, possibilitando em muitas ocasiões produções de biogás superiores a partir de misturas de substratos, quando comparado com a soma das produções atingidas com resíduos digeridos de forma separada (Hartmann et al., 2003).

Quando o conteúdo de sólidos totais é inferior ao 15% é classificada como digestão anaeróbia líquida, requerendo altas quantidade de água para o tratamento de resíduos com baixa umidade, como os resíduos lignocelulósicos (Li et al., 2011). Alta carga orgânica pode dificultar a difusão, levar à acumulação de inibidores, e reduzir o acesso aos substratos, similarmente, a diminuição da água pode afetar o metabolismo microbiano (Ge et al., 2016). Portanto, a mistura de resíduos de polpa e casca com água residuária pode permitir a co-digestão adequada de resíduos de café.

Alguns autores estudaram a co-digestão de resíduos de café e outras indústrias, como biomassa de microalgas, vinhaça, esterco bovino e dejetos de suinocultura (Tabela 3.3). Foram verificados efeitos positivos sobre o processo biológico, como aumento de 17% no rendimento do processo (Passos et al., 2018), redução do tempo de *start-up* dos reatores (Pinto et al., 2018), melhora composição química dos substratos, otimização da produção de biogás (Selvankumar et al., 2017), maior aproveitamento de resíduos de café (Battista et al., 2016) e adequadas relações C/N (Hernández et al., 2014).

Tabela 3.3: Co-digestão de resíduos de café e outras indústrias.

Substratos	Reator	Inóculo	Condições operacionais	Produção de biogás	Referência
Casca e biomassa de microalgas com pré-tratamento térmico	Reator de mistura completa	Lodo anaeróbio do tratamento de esgoto	0,5 g SV _{substrato} g SV _{inóculo} ⁻¹ e 35 °C	196 mL CH ₄ g SV ⁻¹	(Passos et al., 2018)
Pergaminho e vinhaça	Reator de mistura completa	Lodo anaeróbio do tratamento de vinhaça	0,16 kg SV m ⁻³ d ⁻¹ e 55 °C	0,21 mL CH ₄ g SV ⁻¹	(Pinto et al., 2018)
Polpa de com pré-tratamento alcalino e esterco bovino	Reator em batelada	Esterco bovino	1:3 de polpa: esterco e 40 °C	144 mL CH ₄ kg ⁻¹	(Selvankumar et al., 2017)
Pele de semente, semente rejeitada e produto rejeitado com pré-tratamento alcalino e ácido	Reator de mistura completa	Mistura de dejetos de aves e bovinos	1,9 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹ e 35 °C	1,14 NL CH ₄ L ⁻¹ d ⁻¹	(Battista et al., 2016)

SV Sólidos voláteis, DQO Demanda química de oxigênio, TDH Tempo de detenção hidráulica.

3.5. Fatores que afetam a produção biológica de hidrogênio

A produção de H₂ via fermentação é influenciada por fatores físico-químicos, microbiológicos e operacionais, que afetam tanto a cinética de produção como variáveis relacionadas com rotas bioquímicas e crescimento celular. Os fatores mais importantes para a fermentação são: pH, temperatura, agitação, volume do *headspace*, bio-aumentação do consórcio microbiano, substratos e fontes de nutrientes e vitaminas como extrato de levedura (Tabela 3.5).

O pH é um dos fatores mais importantes para a fermentação uma vez que afeta o crescimento dos microrganismos, sua abundância e atividade, a síntese de enzimas, a rota metabólica predominante e a germinação de endósporos (Shanmugam et al., 2014). O pH modifica as condições redox do sistema e com isto, consequentemente, a síntese de subprodutos e solubilidade do CO₂ (Modestra et al., 2015). Similarmente, interfere no fluxo de nutrientes e carbono, gradiente de membrana, conformação e atividade de enzimas como as hidrogenases (responsáveis pela produção de H₂) (Ruggeri et al., 2015; Vasconcelos et al., 2016).

Tabela 3.4: Fatores que afetam a produção de hidrogênio com resíduos de café.

Fatores	Intervalo Teórico	Melhor condição	Resultado*	Influência	Referência
pH	4,0 a 7,5	5,5	2,59 mol H ₂ mol ⁻¹ hexose	Crescimento de biomassa Produção de metabólitos dissolvidos Redução de carboidratos Homoacetogênese	(Jung et al., 2011b; Saady, 2013; de Sá et al., 2014; Shanmugam et al., 2014; Rorke e Kana, 2016)
Temperatura (°C)	23 a 80	35	2,45 L H ₂ L ⁻¹ h ⁻¹	Crescimento de biomassa Tempo de início da fermentação (λ) Produção de metabólitos dissolvidos	(Wang et al., 2013; Sivagurunathan et al., 2016; Jung et al. 2011b)
Agitação (rpm)	0 a 200	50	6,8 L H ₂ L ⁻¹ h ⁻¹ (163 L H ₂ L ⁻¹ h ⁻¹)	Crescimento de biomassa Tempo de início da fermentação (λ)	(Jung et al., 2012, 2011b; Ri et al., 2017)
Volume do Headspace (%)	23 a 95	68,3	2,59 mol H ₂ mol ⁻¹ hexose	Produção de metabólitos dissolvidos Crescimento de biomassa Redução de carboidratos Homoacetogênese	(Jung et al., 2010; Sigurbjornsdottir e Orlygsson, 2012; Ciranna et al., 2014)
Bio-aumentação e inóculo (%)	Máxima de 50	5	9,9 mmol H ₂ g ⁻¹	Tempo de início da fermentação (λ) Redução de carboidratos	(Kumar et al., 2016; Zhang et al., 2019)
Concentração da casca e polpa (g L ⁻¹)	1 a 50	25	57,28 mmol H ₂ L ⁻¹	Redução de carboidratos Produção de metabólitos dissolvidos	(Lee R. Lynd et al., 2002; Islam et al., 2015)
Concentração de água residuária (g DQO L ⁻¹)	10 a 40	31	2,59 mol H ₂ mol ⁻¹ hexose	Homoacetogênese	(Jung et al., 2011b; Villa-Montoya et al., 2016)
Extrato de levedura (g L ⁻¹)	Máxima de 5	2	57,28 mmol H ₂ L ⁻¹	Crescimento da biomassa	(Lynd et al., 2002; Islam et al., 2015;)

* Em letra cursiva dados calculados a partir dos dados publicados por cada autor.

A fermentação pode ser conduzida em faixa de pH entre 4,0 a 7,5 (Jung et al., 2011a; Saady, 2013; Shanmugam et al., 2014). Em meio com pH ácido ou alcalino predominam bactérias semelhantes a *Clostridium* sp., enquanto em pH próximo à neutralidade é possível estimular grande diversidade de outros microrganismos (de Sá et al., 2014).

O rendimento de H_2 também foi relacionado com o pH do sistema. Arquéias metanogênicas e bactérias homoacetogênicas crescem em pH ótimo entre 6,8 e 7,5, sendo observado até 61,5% do consumo do H_2 produzido neste intervalo de pH (Shanmugam et al., 2014). Porém, valores de pH 4,5 viabilizam a produção de etanol e, conseqüentemente, reduz o rendimento de H_2 durante a fermentação (Lin et al., 2012).

O pH inicial adequado depende do substrato utilizado e estrutura da comunidade microbiana (Wang and Wan, 2009), embora, possa ser ajustado para permitir o aparecimento de rotas metabólicas e microrganismos desejados. Neste contexto, pode ser considerado pH 5,5 como adequado para resíduos do processamento de café, uma vez que nesta condição obteve-se o maior rendimento de H_2 ($2,6 \text{ mol } H_2 \text{ mol}^{-1} \text{ hexose}$) utilizando água residuária de café (20 g DQO L^{-1}) e microrganismos autóctones, durante a operação de reatores em batelada a 35°C , pH 5,5 e TDH de 6 h (Jung et al., 2011b).

A fermentação pode ser conduzida em temperaturas mesofílicas ($25\text{-}40^\circ\text{C}$), termofílicas ($40\text{-}65^\circ\text{C}$), termofílicas extremas ($65\text{-}80^\circ\text{C}$) e hipertermofílicas ($>80^\circ\text{C}$) (de Sá et al., 2014). A temperatura afeta diretamente a velocidade de duplicação e espécies de microrganismos em crescimento, portanto, toda a estrutura da população anaeróbia. Com isto, microrganismos anaeróbios com rotas de maior rendimento para a síntese de metabólitos de interesse podem ser selecionados.

A escolha da temperatura depende em grande parte da origem do inóculo e tipo de material utilizado como substrato. Embora, em muitas ocasiões tenha sido observado aumento do metabolismo com a temperatura, uma vez que promove a hidrólise, diminui a solubilidade do H_2 e limita a atividade de microrganismos não produtores de H_2 (Sivagurunathan and Kumar, 2015).

Jung e colaboradores (2010) e (2012) verificaram para água residuária de café, microrganismos autóctones, e reatores UASB e em batelada que a temperatura adequada foi de 35°C para produção máxima de H_2 de $2,45 \text{ L } H_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Os autores também verificaram que em condições termófilas (55°C) a produção de H_2 foi menor em relação a condição mesófila (35°C).

Agitação geralmente é aplicada para permitir uniformidade no reator, facilitar a transferência de massa (principalmente de substrato) e a exaustão do H_2 produzido para o *headspace*, uma vez que a permanência de concentrações altas de H_2 na fase líquida podem

levar a inibição das enzimas hidrogenases. No entanto, altas velocidades conduzem ao aumento da força de cisalhamento com ruptura das células microbianas (Ri et al., 2017).

Este fator foi estudado por Ri et al. (2017) em reator horizontal com agitação contínua entre 30 e 70 rpm utilizando melão (3.000 mg L^{-1}) a COV de $15 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, 35°C e pH 4,0 - 4,5. Os autores verificaram que 50 rpm foi a agitação ótima, atingindo $6,8 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Verificaram também mudanças importantes no rendimento H_2 em relação a velocidade de agitação, uma vez que afetou a hidrodinâmica do reator, turbulência e volume de biogás.

O volume de *headspace* do reator influencia diretamente a pressão parcial H_2 (pH_2), portanto o seu efeito pode ser estudado modificando o volume do meio líquido (Sigurbjornsdottir and Orlygsson, 2012). Mudanças na pH_2 interferem na rota metabólica predominante, uma vez que diante de elevadas concentrações de H_2 o fluxo de carbono e elétrons é redirecionado para a produção de metabólitos mais reduzidos como ácido lático, ácido fórmico, etanol e butanol, sem alteração da velocidade de crescimento e fluxo de glicose. Isso resulta na perda do rendimento de H_2 , na inibição por produto e/ou diminuição na produção de ATP (Sigurbjornsdottir and Orlygsson, 2012; Ciranna et al., 2014; de Sá et al., 2014). Isto porque, algumas reações de oxidação de ácidos orgânicos são termodinamicamente possíveis somente em baixas pH_2 , uma vez que geram H_2 (Dionisi and Silva, 2016).

Enzimas hidrogenases também são inibidas em concentrações altas de H_2 , já que o fluxo de energia é menor ao ser direcionado para processos catabólicos. Em pH_2 superior a 742 mbars, ocorre a diminuição da atividade de enzimas responsáveis pela hidrólise, como consequência da lenta difusão de intermediários dissolvidos (Ciranna et al., 2014).

Sigurbjornsdottir e Orlygsson (2012) avaliaram o efeito da pressão parcial de hidrogênio (pH_2) na produção de H_2 e etanol, variando o volume de *headspace* dos reatores entre 95,7% a 23,4% a partir de substratos como monossacarídeos, carboidratos poliméricos e hidrolisados de material lignocelulósico em reatores em batelada com *Thermoanaerobacterium* AK54. Os autores observaram $1,8 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicose com *headspace* de 95,7% e de $0,95 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ com *headspace* 23,4%.

Para a produção de H_2 a partir de resíduos de café em reatores em batelada (Tabela 3.2), observou-se volume máximo de *headspace* de 68,35% durante a auto-fermentação de água residuária de café (Jung et al., 2010) e mínimo foi de 23,6% na co-digestão de mucilagem de café e dejetos de suinocultura (Hernández et al., 2014). A máxima produção de

H₂ de 2,59 L H₂ L⁻¹ h⁻¹ foi observada em *headspace* de 68,3% a 20 g DQO L⁻¹ de água residuária, 35 °C e pH 5,5 (Jung et al., 2010).

Uma estratégia utilizada para potencializar a degradação dos substratos e melhorar a estabilidade do processo é a bio-aumentação, durante a qual adiciona-se no reator uma cepa específica ou população microbiana com atividade catalítica desejada (Kumar et al., 2016; Sivagurunathan and Kumar, 2015). Algumas vantagens reportadas deste processo são a diminuição do tempo de início da fermentação, aumento da tolerância do inóculo a altas cargas de substrato, maior degradação de substratos e rendimento H₂ (Kumar et al., 2016).

O sinergismo entre diferentes populações nos consórcios microbianos é favorável para a maior degradação de substratos, resistência às condições ambientais adversas e capacidade de hidrólise de compostos complexos. Adicionalmente, reatores com culturas mistas são mais fáceis de operar, uma vez que não se fazem necessárias condições estéreis e sendo possível aplicar maior variedade de substratos (Boboescu et al., 2014).

A bio-aumentação de microrganismos com enzimas que agem sobre o amido, celulose, xilose, lipídeos e proteínas tem demonstrado aumento significativo na hidrólise dos resíduos lignocelulósicos, e consequentemente na produção de H₂. Zhang et al. (2019) isolaram a bactéria *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16 com capacidade de degradação de xilose, arabinose, manose, celobiose entre outros componentes da lignocelulose. A bio-aumentação desta bactéria em reator em batelada com hidrolisado de palha de milho (pré-tratamento com H₂SO₄ 1,7% + autoclave por 120 min) aumentou o rendimento de H₂ de 8,78 para 9,9 mmol H₂ g⁻¹ utilizando como inóculo palha de milho em decomposição, de 8,18 para 8,42 mmol H₂ g⁻¹ com compostagem de esterco de vaca e de 8,55 para 9,17 mmol H₂ g⁻¹ com lodo de digestor anaeróbio. Adicionalmente, os autores reportaram que a produção de metabólitos solúveis também variou após bio-aumentação, permitindo maior produção de ácido acético e menor de etanol. A fermentação foi conduzida com 5 g L⁻¹ de açúcares no hidrolisado, 5% de volume de bio-aumentação, pH 7,0 e 55 °C (Zhang et al., 2019).

Adição de quantidades inadequadas de populações microbianas durante a fermentação pode conduzir a perda da atividade em função do tempo e falhas no sistema, por isso, a determinação da concentração de bio-aumentação é considerada um fator operacional importante (Kumar et al., 2016). Neste contexto, Yang et al. (2016) avaliaram diferentes proporções de bio-aumentação de *Hydrogenispora ethanolica* (LX-B) em relação ao inóculo

para a produção de H_2 a partir de batata (10 g SV L^{-1}), utilizando reator em batelada em pH 7,0, 37°C e inóculo de lodo anaeróbio de reator UASB usado no tratamento de resíduo de cervejeira. Para as relações LX-B/inóculo de 0,06, 0,12, 0,24 e ausência de bio-aumentação, obteve-se R_m de 1,0, 1,78, 0,48 e $0,57 \text{ mL } H_2 \text{ h}^{-1} \text{ g SV}^{-1}$, respectivamente, determinando-se a maior produção de H_2 para a relação de 0,12, com abundância relativa de ~20% para *Hydrogenispora ethanolica* e ~50% para *Clostridium* sp.

Não há relatos na literatura de bio-aumentação de consórcios microbianos na fermentação de resíduos de processamento de café (Tabela 3.2). No entanto, considerando a alta produção de H_2 de $9,9 \text{ mmol } H_2 \text{ g}^{-1}$ partir de resíduo lignocelulósico pré-tratado relatado por Zhang et al. (2019), foi possível inferir que 5% de bio-aumentação pode ser adequada para a co-digestão de resíduos de café pré-tratados em reator hidrotérmico.

Em relação ao tipo de substrato, sabe-se que, de acordo com a sua composição química, é possível definir o potencial de síntese de H_2 e os produtos que serão obtidos (Dionisi and Silva, 2016). Deste modo, para substratos com alto conteúdo de açúcares se obtém maiores rendimentos, enquanto para resíduos ricos em proteínas e gorduras observa-se baixa capacidade de transformação em H_2 , pelo qual seu aproveitamento pode ser mais limitado (Show et al., 2011).

Similarmente, substratos simples como monossacarídeos (glicose, frutose, xilose, entre outros) são metabolizados diretamente através da via glicolítica, enquanto material polimérico ou complexo precisa de enzimas específicas que possibilitem a prévia hidrólise para a formação de monômeros como pentoses e hexoses (Dionisi and Silva, 2016).

Com material lignocelulósico, os microrganismos metabolizam preferencialmente a hemicelulose sobre outros componentes estruturais como a celulose e lignina, pelo qual, maiores tempos de operação são necessários para a sua digestão anaeróbia (Yue et al., 2010).

A concentração de substrato também apresenta influência significativa sobre a produção de H_2 . Altas cargas de matéria orgânica podem levar a acumulação de ácidos orgânicos e diminuição do pH, inibindo o sistema e prejudicando o rendimento H_2 (Gómez et al., 2011). Também, aumenta a diversidade microbiana e diminui a competição ao disponibilizar mais alimento e nutrientes (Vasconcelos et al., 2016).

Para a produção de H_2 a partir de resíduos de café, a água residuária foi tema de estudo por diversos pesquisadores (Tabela 3.2), observando-se o máximo rendimento H_2 de $2,6 \text{ mol } H_2 \text{ mol}^{-1} \text{ hexose}$ a partir de 31 g DQO L^{-1} (Jung et al., 2012). No entanto, para a casca e polpa

de café não foram encontradas pesquisas avaliando este resíduo em reatores fermentativos, pelo qual, estudou-se este fator a partir de celulose, principal componente deste resíduo.

Islam et al. (2015) avaliaram entre 10 e 50 g L⁻¹ de celulose para a produção de H₂ com *Clostridium thermocellum* em reatores em batelada a 60 °C, pH 7,3 – 7,4 e 100 rpm. Os autores otimizaram a produção de H₂ (57,28 mmol H₂ L⁻¹ e 1,3 mol H₂ mol⁻¹ glicose) utilizando 25 g L⁻¹ de celulose, verificando aumentos de 23 vezes na produção de H₂.

Em outros exemplos, Selvankumar et al. (2017) otimizaram a produção de biogás a partir da co-digestão de polpa de café pré-tratada (a cada 1 g polpa 10 mL de NaOH 1%) e esterco de vaca em reatores em batelada em pH 8,0 e temperatura entre 30 e 50 °C. Na avaliação de concentrações de polpa entre 1 e 3 g e esterco entre 1 e 5 g, os autores obtiveram a máxima produção de metano de 144 mL CH₄ kg⁻¹ utilizando 1:3 de polpa de café: esterco de vaca.

Macro, micronutrientes e vitaminas são essenciais para o crescimento dos microrganismos. Por exemplo, para bactérias celulolíticas deve ser disponibilizado nitrogênio, fósforo, enxofre, vitaminas, macro e micronutrientes para permitir seu crescimento e atividade. No entanto, em alguns casos pode não ser requerido, uma vez que pode estimular o crescimento excessivo de microrganismos específicos (Lynd et al., 2002). Concentrações altas de substrato podem inibir o crescimento celular por limitação de nutrientes.

Estes elementos podem ser disponibilizados mediante a adição de extrato de levedura, peptona e triptona (Ren et al., 2009). Entre eles, o extrato de levedura é uma fonte complexa de nutrientes para o crescimento microbiano, contendo nitrogênio (aminoácidos e nucleotídeos) e vários micronutrientes (Islam et al., 2015).

A adição de extrato de levedura para a fermentação de resíduos de café não foi tema de pesquisa previo, no entanto, resultados com substratos lignocelulosicos podem ser exemplificados. Durante a pesquisa de Islam et al. (2015) avaliou-se a adição de extrato de levedura entre 1 e 2 g L⁻¹ durante a produção de H₂ em reatores em batelada a partir de celulose com *Clostridium thermocellum*. A máxima produção de H₂ de 57,28 mmol H₂ L⁻¹ foi observada para 2 g L⁻¹ de extrato de levedura.

Resultados similares foram reportados por Soares et al. (2017) durante a fermentação com bagaço de cada pré-tratado em reator hidrotérmico (200 °C por 10 min), com produção ótima de H₂ de 17,7 mmol H₂ L⁻¹ utilizando 3 g L⁻¹ de extrato de levedura. Os autores

operaram reatores em batelada a temperatura entre 35,8 e 64,2 °C, pH 6,0, bagaço de cana de 2 g L⁻¹ e inóculo lodo anaeróbio de reator UASB alimentado com vinhaça.

Segundo a informação analisada previamente, é possível concluir que a seleção adequada das condições de fermentação conduz a máxima produção de H₂. No entanto, é importante considerar que durante a aplicação de consórcios microbianos autóctones aos resíduos é possível encontrar microrganismos consumidores do H₂ como as bactérias homoacetogênicas, que podem afetar negativamente o rendimento do processo (Shanmugam et al., 2014).

3.6. Homoacetogênese

As bactérias homoacetogênicas são anaeróbias estritas, tolerantes a altas p_{H₂}, sobrevivência em amplo intervalo de temperatura (4 - 80°C), com faixa de pH ótimo entre 6,8 e 7,5, formadoras de endósporos resistentes a pré-tratamentos físicos e químicos, fácil adaptação às condições psicrófilas, crescimento autotrófico (com H₂/CO₂ ou CO), heterotrófo (açúcares, álcoois, compostos aromáticos, metanol, formiato e 2,3-butanodiol) ou mixotrófico (uso de vários substratos simultaneamente), predominância em condições de deficiência de nutrientes e capacidade de produção de metabólitos como ácido acético, ácido láctico, ácido succínico e etanol (Saady, 2013; Wang et al., 2013; Shanmugam et al., 2014;). Alguns gêneros de bactérias homoacetogênicas são *Clostridium* sp., *Acetobacterium* sp., *Butyribacterium* sp., *Eubacterium* sp., *Peptostreptococcus* sp. e *Sporomusa* sp.

Estas bactérias são uns dos principais problemas durante a fermentação H₂, uma vez que muitas delas são do gênero *Clostridium* sp., abundantes em reatores fermentativos. Suas características versáteis permitem sua fácil adaptação a variados processos, tipos de reatores e pré-tratamentos do inóculo (Penteado et al., 2013; Saady, 2013). Por isso, os melhores métodos de inibição deste metabolismo são a controle dos parâmetros operacionais, evitando condições favoráveis para o crescimento destas bactérias (Vasconcelos et al., 2016).

Os microrganismos acetogênicos modificam seu metabolismo sob condições de estresse ou esgotamento de substrato para o crescimento autotrófico, tendo crescimento mais rápido com CO₂/H₂, quando comparado com acetogênicos que usam substrato orgânico (Saady, 2013). Ainda, sob condições limitantes, os acetogênicos tem capacidade de crescer durante todo o tempo da fermentação, predominando o metabolismo autotrófico em condições

de limitação de nutrientes, mas com maior ganho energético durante a heterotrofia (Saady, 2013).

O consumo como hidrogênio molecular é possível por meio da rota acetil-CoA ou via redutiva (rota Wood - Ljungdahl), sendo o ácido acético sintetizado em dois passos: primeiro, o grupo metil do ácido acético é formado por diversas enzimas que utilizam ácido fórmico e intermediários de um carbono reduzidos e segundo, o grupo carboxil é sintetizado a partir de CO₂ pela ação da enzima monóxido de carbono desidrogenase que também catalisa a formação de acetil-CoA. Finalmente, o acetil-CoA é convertido em ácido acético (Saady, 2013).

A alteração do metabolismo produtor de H₂ para o consumidor via homoacetogênese tem sido tema de pesquisas por alguns autores durante os últimos anos (Tabela 3.5), sem chegar a um esclarecimento sobre as condições ambientais ou operacionais que potencializam este metabolismo.

Park et al. (2005) observaram a produção de H₂ a partir de glicose em reator de mistura completa inoculado com lodo de estação de tratamento de esgotos. Os autores observaram que quando o CO₂ do *headspace* foi removido com KOH aumentou a produção de H₂, já que diminuiu a disponibilidade de CO₂ como fonte de carbono para a produção de ácido acético via homoacetogênese.

Arooj et al. (2008) avaliaram o efeito da variação do tempo de fermentação entre 4 e 18 h em reatores contínuos de mistura completa. Os autores observaram maior consumo de H₂ por homoacetogênese quando o tempo de fermentação aplicado era menor, assim mais de 40% do H₂ foi consumido com 4 e 9 h. O máximo rendimento de 0,98 mol H₂ mol⁻¹ glicose foi obtido com 12 h.

Kotsopoulos et al. (2009) operaram um reator de mistura completa hipertermofílico (70 °C) alimentado com dejetos de suinocultura. As maiores produções de H₂ foram favorecidas pelas altas temperaturas, sem precisar de pré-tratamentos ou controle de pH. As bactérias homoacetogênicas foram responsáveis pelo consumo de H₂, já que não foi observado metano no biogás.

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

Tabela 3.5: Causas e estratégias de controle da homoacetogênese durante a produção de H₂.

Substrato	Reator	Inóculo	Rendimento máximo	Diminuição do rendimento (%)	Homoacetogênese		Referência
					Causas	Estratégias de controle	
Soro de queijo	Contínuo	Compostagem de resíduos de cozinha	0,9 mol H ₂ mol ⁻¹ lactose	---	Longos TDH (24 h)	TDH inferior a 12 h	(Castelló et al., 2018)
Bagaço de agave	Mistura completa contínuo	Lodo do tratamento de vinhaça de tequila	105 mL H ₂ g ⁻¹ bagaço	---	Baixo pH (5,5) e TDH 6 h	Agitação para liberação do H ₂ da meio líquido	(Corona and Razo-Flores, 2018)
Glicose	Batelada	Lodo do tratamento de água residuária	---	---	Solução de nutrientes adequada e disponibilização de CO ₂ e H ₂	Retirada do <i>headspace</i> , controle do CO ₂ , controle do H ₂ e CO ₂	(Zhou et al., 2017)
Glicose	Batelada alimentada	Lodo do tratamento de água residuária de suinocultura	70% glicose foi transformada em H ₂	Entre 3 e 52	Alta pressão parcial H ₂	Baixa pressão de <i>headspace</i>	(Liu and Wang, 2017)
Glicose	Batelada alimentada	Lodo do tratamento de água residuária de cervejaria	1,89 mol H ₂ mol ⁻¹ hexose	98	Incremento da temperatura (condição termofílica a 55°C)	pH baixo, temperatura mesofílica (35°C), pré-tratamento com ácido linoléico e choque de carga	(Shanmugam et al., 2016)
Lodos ativados	Mistura completa em batelada e Contínuo	Lodos ativados mesofílico e termofílico	19,2 (37°C) e 80,1 mL H ₂ g ⁻¹ SSV ⁻¹ (55°C) 6,5 (37°C) e 78,3 mL H ₂ g ⁻¹ SSV ⁻¹ (55°C)	---	Fermentação mesofílica (37°C)	Fermentação alcalina em pH 10 e 55°C	(Wan et al., 2016)
Água residuária sintética	Leito estruturado e leito fixo	Fermentação natural	0,5 mol H ₂ mol ⁻¹ hexose 3,5 mol H ₂ mol ⁻¹ hexose	---	Acumulação de biomassa e baixa disponibilidade compostos orgânicos	Controle da acumulação de biomassa	(Anzola-Rojas et al., 2015; Anzola-Rojas and Zaiat, 2015)
Ácido acético	Células a combustível microbianas	---	---	---	Concentrações altas de H ₂	---	(Rago et al., 2015)
Água residuária da fabricação de óleo de oliva	Mistura completa	Lodo de ETE pré-tratado com BES	---	---	50 g DQO L ⁻¹ com alto conteúdo de tóxicos (fenóis e lipídeos)	25 g DQO L ⁻¹ com inferior conteúdo de compostos tóxicos	(Gonçalves et al., 2014)

Continua.

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

Continuação Tabela 3.5.

Substrato	Reator	Inóculo	Rendimento máximo	Diminuição do rendimento (%)	Homoacetogênese		Referência
					Causas	Estratégias de controle	
CO ₂ e H ₂	Células a combustível microbianas	Biofilme (predominância de <i>δ</i> proteobactéria e <i>Acetobacterium</i>)	---	---	Acumulação de H ₂ e baixo TDH	---	(Parameswaran et al., 2012)
Glicose	Batelada alimentada	Lodo mesófilico de ETE Lodo termofílico do tratamento de esterco	1,77 mol H ₂ mol ⁻¹ hexose 1,68 mol H ₂ mol ⁻¹ hexose	---	pH inicial neutro e temperatura de fermentação mesofílica (35°C)	Condição termofílica (55°C) e pH inicial de 5,5	(Luo et al., 2011)
Sacarose suplementada com nutrientes	Mistura completa alimentado	Lodo de ETE	1,72 mol H ₂ mol ⁻¹ hexose	---	Baixas COV durante a partida do reator	Aumento da COV	(Mariakakis et al., 2011)
Glicose	Mistura completa alimentado	Lodo de tratamento de água residuária de cervejaria	---	---	Alta concentração de H ₂ e sistema de alimentação em batelada	---	(Ni et al., 2011)
Esterco suíno	Mistura completa hiper-termofílico	Lodo de reator mesófilico metanogênico de esterco suíno	---	--	---	Condição hipertermofílica (70°C)	(Kotsopoulos et al., 2009)
Amido	Mistura completa	Lodo de ETE	0,92 mol H ₂ mol ⁻¹ hexose	57	TDH entre 9 e 12 h	TDH iguais ou superiores a 12h	(Arooj et al., 2008)
Glicose	Mistura completa	Lodo de ETE	2 mol H ₂ mol ⁻¹ hexose	24,3	Altas pressões parciais H ₂ e disponibilidade de CO ₂	Remoção do CO ₂ do <i>headspace</i> e fase líquida	(Park et al., 2005)

BES Ácido 2-bromoetanesulfônico, *COV* Carga orgânica volumétrica, *ETE* Estação de tratamento de esgotos, *TDH* Tempo de detenção hidráulica.

Ni et al. (2011) operaram dois reatores (sendo o primeiro para a fermentação de glicose e o segundo para homoacetogênese) avaliando a operação em batelada e em batelada alimentada. Aumento de 40% na homoacetogênese aconteceu diante das condições de batelada alimentada, observando balanço entre a produção de H_2 via acetogênese e consumo via homoacetogênese.

Mariakakis et al. (2011) estudaram as populações microbianas num reator de mistura completa de 30 L diante de variações na COV e o tempo de retenção do lodo. Durante a partida do reator foi constatada a presença de bactérias homoacetogênicas consumidoras de H_2 como *Clostridium* sp., embora o aumento gradual da COV mudo a estrutura da comunidade, com o aparecimento de espécies acidogênicas como *Selenomonas* sp. Esta mudança foi decorrente da limitação no crescimento das homoacetogênicas, a traves da geração de sub-produtos inibitórios e incremento na COV com uma maior concentração e substrato.

Luo et al. (2011) avaliaram o efeito de pré-tratamentos (térmico, ácido e choque de carga) sobre a produção de H_2 em cultivos em batelada sucessivos a temperaturas mesofílicas e termofílicas (35 °C e 55 °C) e diferentes pH iniciais (7,0 e 5,5). Os autores verificaram que 55% do H_2 foi consumido por homoacetogênese durante a quinta batelada, inferindo que os pré-tratamentos tem um efeito a curto prazo, uma vez que as bactérias homoacetogênicas formadoras de esporas que se adaptam a mudanças nas condições ambientais. A maior produção de H_2 ocorreu em temperatura de 55 °C e pH de 5,0, sendo de 1,77 mol H_2 mol⁻¹ glicose para o inóculo mesófilico mediante pré-tratamento térmico e 1,68 H_2 mol⁻¹ glicose para a o inóculo termofílico pré-tratado com ácido. Desta forma, os parâmetros da fermentação foram mais importantes que o tipo de pré-tratamento aplicado.

Parameswaran et al. (2012) avaliaram a interação entre arqueias metanogênicas e bactérias homoacetogênicas em células de combustível microbianas, com H_2 como doador de elétrons e CO_2 como fonte de carbono. As bactérias homoacetogênicas competiram efetivamente com arqueias metanogênicas no biofilme sobre condições de TDH inferior a 1 h e acúmulo de ácido acético.

Gonçalves et al. (2014) observou controle da homoacetogênese e metanogênese aplicando concentrações de substrato de 50 g DQO L⁻¹. Para isto, os autores operaram reatores de mistura completa a 37 °C e 200 rpm, com lodo do tratamento de esgoto sanitário pré-tratado com BES (ácido 2-bromoetanesulfônico). Altas concentrações de lipídeos e fenóis foram observadas a 100 g DQO L⁻¹, o que resultou na inibição da maioria dos microrganismos presentes.

Rago et al. (2015) analisaram o crescimento de bactérias homoacetogênicas e arqueias metanogênicas em células a combustível microbiana. Os autores observaram que mediante o pré-tratamento com BES (Ácido 2-bromoetanesulfônico) ocorreu diminuição da comunidade metanogênica e aumento de 56% da atividade homoacetogênica, principalmente de bactérias como *Acetobacterium* sp.

Anzola-Rojas e Zaiat (2015) e Anzola-Rojas et al. (2015) operaram reatores de leito fixo e estruturado a 25 °C, TDH de 2 h e COV de 2,4 g L⁻¹ d⁻¹, alimentados com água residuária sintética composta por sacarose, ureia e solução de nutrientes. Os autores observaram diminuição do H₂ em ambos os reatores. Excessiva acumulação de biomassa, baixa disponibilidade de matéria orgânica e competição por substrato potencializaram a homoacetogênese autotrófica. O consumo de H₂ foi reduzido drasticamente mediante o descarte de biomassa

Wan et al. (2016) compararam a fermentação alcalina (pH 10) de lodos ativados em condições mesofílicas (37 °C) e termofílicas (55 °C), para a produção de H₂ e homoacetogênese em reatores de mistura completa e contínuo. Alta expressão de genes relacionados a homoacetogênese foi observada a 37 °C, com abundância do gênero *Clostridium* sp. 5 vezes superior quando comparada com 55 °C. Assim, o consumo de H₂ foi inibido a condições termofílicas e pH 10 em ambos os reatores, persistindo ao longo do tempo no processo contínuo. Os autores consideraram que a rota homoacetogênica heterotrófica foi predominante nestes sistemas, utilizando os ácidos voláteis para a produção de acetato, com adaptação para o consumo de H₂ mediante a rota autotrófica somente depois de vários dias de operação.

Shanmugan et al. (2016) observaram até 98% de perdas no rendimento de H₂ no reator controle (sem pré-tratamento), devido a microrganismos homoacetogênicos, tais como *Moorella thermoacetica*. Para isto, os autores avaliaram a produção mesofílica (35 °C) e termofílica (55 °C) de H₂ em culturas em batelada sucessivas diante de pré-tratamentos térmicos, com ácido, base, BES (Ácido 2-bromoetanesulfônico), ácido linoléico e choques de carga. Nos ensaios mantidos a 55 °C observaram rendimentos de H₂ inferior devido ao crescimento de bactérias homoacetogênicas e formadores de endósporos como *Clostridium* sp.; uma vez que a metanogênese foi inibida. De acordo com os autores, o aumento da temperatura afetou negativamente a homoacetogênese, em contrapartida, em condições mesofílicas obtiveram rendimento máximo de 1,89 mol H₂ mol⁻¹ glicose, com inibição da homoacetogênese, mediante o

pré-tratamento com ácido linoléico (2 g L^{-1} por 24 h) e choque de carga orgânica (20 g L^{-1} por 24 h).

Liu e Wang (2017) estudaram o efeito de pressão do *headspace* entre 20 e 100 kPa na homoacetogênese e produção de H_2 em reatores em batelada mesofílicos, e verificaram que o rendimento de H_2 foi somente de 43,9% sob condições de degradação de glicose de 90% e baixa pressão de 20 kPa, uma vez que a homoacetogênese não foi inibida.

Zhou et al. (2017) avaliaram o efeito da redução na pH_2 sobre a fermentação aplicando as estratégias de retirada do *headspace*, injeção de CO_2 e injeção de CO_2/H_2 . Os autores concluíram que nesta última estratégia a homoacetogênese foi mais significativa, diante da predominância de *Clostridium* sp. na comunidade microbiana.

Corona e Razo-Flores (2018) estudaram o efeito da agitação (entre 150 e 300 rpm) e COV (entre 40 e 52 $\text{g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) na produção de H_2 e ocorrência de homoacetogênese em reatores de mistura completa, identificando que diante de condições de agitação de 300 rpm e COV de 44 $\text{g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ obteve-se controle da homoacetogênese (valor mínimo de 29% de ácido acético por homoacetogênese) devido ao aumento da transferência do H_2 do líquido para o biogás.

Castelló et al. (2018) avaliaram a homoacetogênese durante a produção de H_2 em reatores em batelada com soro de queijo, e identificaram diminuição no H_2 e instabilidade no reator como consequência de metabolismo homoacetogênico após 24 h de fermentação (até 57% ácido acético por homoacetogênese).

A relevância da rota homoacetogênica foi verificada por diversos autores, no entanto, existe falta de informação que permita concretizar medidas de controle do consumo de H_2 por homoacetogênese. Neste contexto, técnicas moleculares que auxiliam analisar a mudança na comunidade microbiana, identificar genes funcionais e elucidar rotas metabólicas, podem aumentar o entendimento do processo biológico.

3.7. Ferramentas de estudo da diversidade microbiana

O conhecimento da comunidade microbiana de sistemas biológicos mediante ferramentas de biologia molecular permite conhecer a riqueza taxonômica (composição de espécies) e funcional (genes relacionados a enzimas específicas) responsáveis pela produção de um metabólito de interesse.

Algumas ferramentas de Biologia molecular para o estudo da diversidade microbiana como a PCR-DGGE (Reação em Cadeia da Polimerase – Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante), sequenciamento de genes específicos e sequenciamento do metagenoma tem permitido identificar microrganismos associados aos resíduos de café ou sistemas biológicos alimentados com estes resíduos (Tabela 3.6). Os genes alvos de pesquisa foram o gene RNAr 16S para o domínio Bactéria e os genes da região espaçadora transcrita interna (ITS) do RNAr nuclear para o domínio Eucariota. Este último com o objetivo de estudar especificamente a comunidade de fungos (White et al., 1990). Para a análise Metagenômica (genoma completo dos microrganismos), aplica-se sequenciamentos em larga escala (de Carvalho Neto et al., 2017; Suárez et al., 2018) por meio dos quais tem-se o sequenciamento de bilhões de fragmentos de DNA de forma paralela.

Neste contexto, Hamdouche et al. (2016) analisaram a comunidade microbiana de amostras obtidas a partir do processamento via úmida e seca de café. Durante o processamento via úmida foram realizadas as etapas de classificação dos grãos de café, despulpamento, fermentação, lavagem e secagem ao sol, utilizando grãos tipo *Coffea arabica*. Para o processamento via seca realizou-se a sequência de classificação dos grãos, secagem ao sol e retirada da casca de café, utilizando café tipo *Coffea canephora*. As análises da comunidade foram conduzidas mediante PCR-DGGE e seleção de algumas bandas para o sequenciamento. Os autores observaram que a estrutura da comunidade modificou-se com o método do processamento pós-colheita aplicado, espécie do grão de café (*Coffea arabica* ou *Coffea canephora*) e a região geográfica de origem da amostra. Durante o processamento úmido predominou *Weissella* sp, *Lactobacillus* sp, *Leuconostoc mesenteroides*, *Ralstonia* sp., *Acidovorax* sp., *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis* e os fungos da classe Saccharomycetes. Durante o processamento seco verificou-se *Chryseobacterium* sp. e *Citrobacter* sp. e os fungos *Sordariomycetes* sp., *Meyerozyma caribbica*, *M. guilliermondii* e *Cladosporium sphaerospermum*. Os autores reportaram que durante o processamento úmido predominaram bactérias lácticas. Algumas funções associadas aos microrganismos identificados foram a degradação de polímeros, fermentação e propriedades antifúngicas.

Tabela 3.6: Estudo da diversidade microbiana associada a resíduos de café.

Técnicas aplicadas	Objeto de estudo	Principais microrganismos	Funções metabólicas associadas	Referência
PCR-DGGE e sequenciamento dos genes 16S rRNA para bactérias e 26S rRNA para fungos a partir de bandas do gel	Grãos de café originados do processamento via úmida e seca do café	Via úmida: <i>Weissella</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Ralstonia</i> sp. <i>Acidovorax</i> sp., <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>Saccharomycetes</i> sp. Via seca: <i>Chryseobacterium</i> sp., <i>Citrobacter</i> sp. <i>Sordariomycetes</i> sp., <i>Meyerozyma caribbica</i> , <i>M. guilliermondii</i> , <i>Cladosporium sphaerospermum</i> .	Fermentação, produção de ácido láctico, degradação de polímeros, síntese de moléculas antifúngicas.	(Hamdouche et al., 2016)
Isolamento e sequenciamento do gene ITS-rRNA para fungos	Auto-fermentação (processamento via úmida do café)	<i>Saccharomyces</i> sp., <i>Torulaspora delbrueckii</i> , <i>Pichia kluyveri</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>H. vineae</i> e <i>Meyerozyma caribbica</i> .	Produção de ácido acético, láctico, succínico, etanol e outros compostos orgânicos voláteis. Degradação da pectina.	(de Carvalho Neto et al., 2017)
Sequenciamento do gene 16S rRNA	Digestor anaeróbio alimentado com mucilagem, polpa e água residuária de café.	Bacterioides, Parabacteroide, Comamonas, Acinetobacter e Trichococcus.	Degradação de celobiose, compostos orgânicos e carboidratos. Remoção de fósforo e metais. Produção de ácido láctico.	(Rojas-Sossa et al., 2017)
Sequenciamento do metagenoma	Reator UASB dois estágios alimentado com água residuária de café.	<i>Syntrophus</i> sp., <i>Candidatus Cloacimonas</i> , Filos <i>Actinobactéria</i> , <i>Chloroflexi</i> e <i>Firmicutes</i> .	Produção de H ₂ , degradação de compostos orgânicos, fenol e aminoácidos. Redução de sulfato.	(Suárez et al., 2018)
Sequenciamento do gene RNAr 16S	Auto-fermentação (processamento via úmida do café)	<i>Fructobacillus</i> sp., <i>Pseudonocardia</i> sp., <i>Pedobacter</i> sp., <i>Sphingomonas</i> sp. e <i>Hymenobacter</i> sp..	Degradação da frutose, fermentação com produção de ácido láctico, acético, etanol, ácidos de cadeia curta e acetaldeído.	(de Carvalho et al., 2018)
Isolamento e sequenciamento do gene RNAr 16S	Reator batelada alimentado com mucilagem de café e resíduo orgânico.	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>Kocuria kristinae</i> , <i>Streptococcus uberis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>Cremosis</i> , <i>Brevibacillus laterosporus</i> , <i>Bacillus farraginis</i> /smithii/fordii e <i>Staphylococcus epidermidis</i> .	Produção de ácido láctico e H ₂ . Enzimas protease e glicosidase.	(Cárdenas et al., 2019)

PCR-DGGE Reação em Cadeia da Polimerase – Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante., *ITS* Região espaçadora transcrita interna.

De Carvallho Neto et al. (2017) analisaram a comunidade fúngica associada a fermentação de grãos de café, a partir de amostras de auto-fermentação dos grãos durante o processamento úmido de café na região de Minas Gerais - Brasil. Após a retirada mecânica da polpa utilizando água (processamento úmido), uma parte do líquido obtido durante o despolpamento foi adicionada à fermentação. Esta última foi conduzida em tanques de cimento a temperatura ambiente por 48 h. Para a análise da comunidade microbiana os autores isolaram leveduras de amostras coletadas durante a fermentação, os quais corresponderam a *Saccharomyces* sp., *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia kluyveri*, *Hanseniaspora uvarum*, *H. vineae*

e *Meyerozyma caribbica*, responsáveis pela produção de mais de 25 compostos orgânicos voláteis, principalmente etanol. As leveduras também foram associadas ao consumo de açúcares provenientes da polpa (glicose e frutose) para a síntese de ácidos orgânicos, como o lático, succínico e acético, além da degradação da pectina por *Saccharomyces* sp.

Rojas-Sossa et al. (2017) estudaram a diversidade de bactérias em digestores anaeróbios alimentados com resíduos do processamento de café (mucilagem, polpa e água residuária, proporção 1:0,3:0,1) nas condições de operação a 35 °C e inóculo de lodo estabilizado. Os autores verificaram ampla diversidade de bactérias anaeróbias, com predominância de *Acinetobacter* sp. e *Commamonas* sp., relacionados com a remoção de fósforo e degradação de compostos orgânicos, respectivamente.

Suárez et al. (2018) analisaram a comunidade microbiana de reator UASB de dois estágios alimentado com água residuária do processamento de café via úmida para a produção de CH₄. Os reatores foram operados em pH ~7,2 e temperatura 20,7 -24 °C e carga orgânica volumétrica alta (18,2 g DQO L⁻¹ d⁻¹) e baixa (6,1 g DQO L⁻¹ d⁻¹). Foram coletadas amostras referentes ao primeiro estágio, nas condições de alta e baixa COV, para a análise metagenômica. Os autores observaram aumento na comunidade de bactérias quando a COV passou de 6,1 (58,6%) para 18,2 g DQO L⁻¹ d⁻¹ (77,1%). Identificou-se *Syntrophus* sp. (58%), bactéria produtora de H₂ a partir de compostos orgânicos e degradadora de fenol. Adicionalmente, *Candidatus* Cloacimonas (14,2%), com capacidade de fermentar aminoácidos e oxidar ácido propiônico para a produção de H₂. Em menor proporção identificaram representantes dos filos Actinobactéria, Chloroflexi, Firmicutes, associados a fermentação de carboidratos e aminoácidos, além de redução de sulfato.

De Carvalho et al. (2018) estudaram a comunidade microbiana da auto-fermentação de grãos de café durante o processamento úmido de café (despolpamento e fermentação) na região de Minas Gerais – Brasil. A fermentação ocorreu em tanques de cimento a temperatura ambiente (12 – 32 °C) por 24 h. Os autores observaram comunidade rica e complexa, com alta diversidade de bactérias com potencial aplicação para fins biotecnológicos. As maiores abundâncias relativas corresponderam a Proteobacteria (*Erwinia* sp., *Pseudomonas* sp. e *Methylobacterium* sp.) e Firmicutes (*Bacillus* sp., *Fructobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., e *Lactococcus* sp.). Ressaltou-se a detecção de *Fructobacillus* sp., devido a sua capacidade de degradação de frutose na polpa de café. Adicionalmente, a predominância de bactérias lácticas (26,3% para *Lactobacillus* sp.,

Pediococcus sp., *Enterococcus* sp., *Leuconostoc* sp. e *Lactococcus* sp.) que corresponderam a alta produção de ácido láctico observada durante a fermentação ($0,32 \text{ g L}^{-1}$).

Cárdenas et al. (2019) operaram reatores em batelada para a produção de H_2 a partir de mucilagem de café e resíduo orgânico (lixo de mercado). O reator de 30 L foi operado a $30 - 40^\circ\text{C}$, pH $5,0 - 8,0$, concentração dos substratos entre $20 - 60 \text{ g DQO L}^{-1}$ e proporção dos substratos $8:2$, $5:5$ e $2:8$ de mucilagem: resíduo orgânico. Para reatores com alta produção de H_2 os autores isolaram bactérias fermentativas e constataram que os microrganismos isolados corresponderam a *Micrococcus luteus*, *Kocuria kristinae*, *Streptococcus uberis*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *Cremosis*, *Brevibacillus laterosporus*, *Bacillus farraginis/smithii/fordii* e *Staphylococcus epidermidis*. *Streptococcus uberis*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *Cremosis* foram associadas a produção de ácido láctico, enquanto *Brevibacillus laterosporus*, *Bacillus farraginis/smithii/fordii*, *Micrococcus luteus* e *Kocuria kristinae* com a capacidade de metabolizar substratos complexos, produzir enzimas protease e glicosidase e produzir H_2 .

Por meio destas pesquisas pode-se observar que os resíduos do processamento de café são fonte potencial para a obtenção de consórcios de microrganismos com funções metabólicas de interesse, como a produção de H_2 , ácidos orgânicos e álcoois. Ressalta-se que os microrganismos identificados nestes substratos têm a capacidade de degradar, tanto os componentes da lignocelulose na polpa e casca de café, como compostos inibitórios na água residuária como o fenol. Obtendo-se um consórcio microbiano, é possível pesquisar as condições que favorecem a co-digestão de resíduos de café mediante planejamentos experimentais de *screening* das condições de fermentação com posterior otimização do processo.

3.8. Desenhos experimentais fatoriais para o estudo de processos biológicos

A produção de H_2 a partir de fermentação, é afetada por diversos fatores como o pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes, agitação, volume de *headspace*, concentração de água residuária, resíduo de polpa e casca, bio-aumentação e extrato de levedura. Algumas metodologias aplicadas como o planejamento Plackett-Burman permitem realizar um *screening* inicial dos fatores importantes no processo, e posteriormente desenhos fatoriais como os fracionados, desenho de composto central (DCC), ou desenho de composto central rotacional (DCCR) facilitam estudar a interação entre fatores e encontrar os valores ótimos de uma resposta de interesse, como a produção de H_2 (Nath and Das, 2011). Alguns exemplos de ferramentas

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

importantes para o estudo de novos consórcios microbianos ou substratos foram analisados na Tabela 3.7.

Tabela 3.7: Estudo de processos aplicando desenhos experimentais fatoriais.

Substratos	Planejamento	Fatores analisados	Condições selecionadas	Resultado	Referência
Polpa de café	DCCR	Concentração de NaOH, Ca(OH)_2 e tempo de pré-tratamento alcalino	4% de NaOH, ausência de adição de Ca(OH)_2 e 25 min	Produção de etanol de 13,66 g L^{-1}	(Menezes et al., 2014)
	PB	Concentração de glicose, peptona, extrato de carne, extrato de malta, extrato de levedura, KCl, NaCl, NH_4Cl , ZnCl_2 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.	Glicose, extrato de levedura, extrato de malta, peptona e NaCl	0,72 mol $\text{H}_2 \text{ mol}^{-1}$	
Talho de milho pré-tratado.	DCC	Concentração de glicose, peptona, extrato de malta, extrato de levedura e NaCl	19,25 g L^{-1} de glicose, 5,64 g L^{-1} de peptona, 1,64 g L^{-1} de extrato de malta, 3,16 g L^{-1} de extrato de levedura e 4,312 g L^{-1} de NaCl	0,79 mol $\text{H}_2 \text{ mol}^{-1}$	(Samson and Manikkandan, 2017)
	Box-Behnken	Concentração de substrato, temperatura e tempo de fermentação	pH 7,0, 34,5 °C e 42,5 h	0,91 mol $\text{H}_2 \text{ mol}^{-1}$	
Bagaço de cana pré-tratado	DCC	Concentração de extrato de levedura e temperatura.	3 g L^{-1} de extrato de levedura e 60 °C.	23,10 mmol $\text{H}_2 \text{ L}^{-1}$	(Soares et al., 2017)
Bagaço de cana	DCC	Concentração de substrato e pH	7 g L^{-1} de bagaço e pH 7,2	23,10 mmol $\text{H}_2 \text{ L}^{-1}$	(Rabelo et al., 2018)
Bagaço de cana	DCCR	Temperatura, tempo e concentração de H_2O_2 do pré-tratamento	180 °C, 12 min e 7,36% de H_2O_2	23,10 mmol $\text{CH}_4 \text{ L}^{-1}$	(Ahmad et al., 2018b)
Mucilagem de café e resíduo orgânico.	Fatorial fracionado	DQO do substrato, temperatura e pH	60 g DQO L^{-1} , 30 °C e pH 7,0	17,17 mmol $\text{H}_2 \text{ L}^{-1}$	(Cárdenas et al., 2019)

PB Plackett-Burman, *DCC* Desenho de composto central, *DCCR* Desenho de composto central rotacional.

Menezes et al. (2014) avaliaram a otimização do pré-tratamento alcalino de polpa de café para a produção de etanol utilizando DCCR para os fatores: concentração de NaOH (entre 0 e 8 g L^{-1}), concentração de Ca(OH)_2 (entre 0 e 8 g L^{-1}) e tempo de pré-tratamento entre (16,5 e 33,4

min). O melhor pré-tratamento foi observado com 4% de NaOH, ausência de adição de Ca(OH)_2 e 25 min, uma vez que verificou-se produção de etanol de $13,66 \text{ g L}^{-1}$ e características na polpa pré-tratada como 69,18% de celulose, 44,15% de hemicelulose, 25,19% de lignina e $38,13 \text{ g L}^{-1}$ de açúcares redutores. O pré-tratamento foi realizado em autoclave com 100 g de polpa e 100 mL de solução alcalina. A fermentação foi conduzida em reator em batelada de 1 L a 30°C , sem controle de pH, levedura liofilizada como inóculo, 155 g de polpa pré-tratada e tempo de fermentação de 48 h.

Samson e Manikkandan (2017) estudaram a otimização de meio de cultura e posteriormente os fatores da fermentação para a produção de H_2 a partir de talho de milho pré-tratado (H_2SO_4 1% e autoclave 75 min) e cepa isolada de amostras de solo. Inicialmente realizaram planejamento de Plackett-Burman para identificar os principais componentes do meio de cultura, identificando a glicose, extrato de levedura, extrato de malta, peptona e NaCl foram os mais significativos para a produção de H_2 . Posteriormente, aplicaram DCC para encontrar os valores ótimos de cada componente, sendo $19,25 \text{ g L}^{-1}$ de glicose, $5,64 \text{ g L}^{-1}$ de peptona, $1,64 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de malta, $3,16 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de levedura e $4,312 \text{ g L}^{-1}$ de NaCl. Utilizando este meio de cultivo, avaliou-se os fatores de fermentação pH (entre 6,5 e 7,5), temperatura (entre 32 e 36°C) e tempo de fermentação (entre 40 e 44 h) mediante desenho de Box-Behnken. A máxima produção de H_2 de $0,91 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ de substrato foi observada nas condições de pH 7,0, $34,5^\circ\text{C}$ e 42,5 h de fermentação.

Soares et al. (2017) avaliaram o DCC na otimização da produção de H_2 a partir de bagaço de cana pré-tratada em sistema hidrotérmico (200°C por 10 min). Os fatores avaliados foram concentração de extrato levedura entre 0,58 e $3,32 \text{ g L}^{-1}$ e temperatura da fermentação entre $35,8$ e $64,2^\circ\text{C}$, utilizando reator em batelada em pH 6,0, 2 g L^{-1} de bagaço e inóculo de reator UASB para o tratamento termofílico de vinhaça. Nas condições de 3 g L^{-1} de extrato de levedura e 60°C obteve-se a máxima produção de H_2 de $17,17 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$.

Rabelo et al. (2018) analisaram os fatores da fermentação de concentração de bagaço de cana (entre 0,8 e $9,2 \text{ g L}^{-1}$) e pH (entre 4,6 e 7,4) para a produção de H_2 em reatores em batelada, em pH, 37°C e consórcio microbiano autóctone e alóctone ao resíduo. Aplicando DCC obteve-se a máxima produção de H_2 de $23,10 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$ com 7 g L^{-1} de bagaço de cana e pH 7,2.

Ahmad et al. (2018d) aplicaram desenho de composto central rotacional para otimizar as condições de pré-tratamento em reator hidrotérmico de bagaço de cana para a produção de CH_4 .

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

Os fatores estudados foram temperatura entre 160 e 200 °C, tempo de pré-tratamento entre 5 e 19 min e concentração de H₂O₂ entre 2 e 6% v/v. Nas condições otimizadas de 180 °C, 12 min e 7,36% de H₂O₂ obteve-se a máxima deslignificação de 73,1%, remoção da xilana de 75,8% e aumento da glucano de 139,5%. Verificou-se aumento na produção de metano de 147,8 (resíduo sem pré-tratamento) para 323,3 mL CH₄ g⁻¹ quando utilizado bagaço pré-tratado (1 g L⁻¹), utilizando reator em batelada a 37 °C, meio sintético zinder e inóculo de reator UASB para o tratamento de águas residuárias de matadouro de aves.

Cárdenas et al. (2019) estudaram a produção de H₂ em reatores em batelada alimentados com mucilagem de café e resíduo orgânico (lixo de mercado), aplicando desenho fatorial fracionado. Os fatores de concentração de substrato (entre 20 – 60 g DQO L⁻¹), temperatura (entre 30 – 40 °C) e pH (entre 5,0 – 8,0) foram estudados, encontrando que nas condições de 60 g DQO L⁻¹, 30 °C e pH 7,0 obteve-se a maior produção de H₂ de 25,9 L H₂.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada em 8 etapas (Figura 4.1): (1) Preparação e caracterização dos resíduos do processamento de café, (2) Obtenção do consórcio de microrganismos autóctones, (3) Seleção das condições de pré-tratamento da polpa e casca, (4) Avaliação do efeito da co-digestão dos resíduos (casca, polpa e água residuária) na produção de H_2 , (5) Avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H_2 , ácidos orgânicos e álcoois e caracterizar a comunidade microbiana, (6) Avaliação dos fatores da fermentação que conduzem ao consumo de H_2 por homoacetogênese (7) Seleção das condições de otimização da produção de H_2 e diminuição do seu consumo via homoacetogênese, (8) Caracterização taxonômica e funcional das comunidades microbianas.

Figura 4.1. Fluxograma experimental

Fonte: Elaboração própria.

4.1. Resíduos do processamento do café

A água residuária e resíduo de polpa e casca de café foram coletados na fazenda “Da lagoa” (Pedregulho, São Paulo) no início da temporada de safra (Maio/2016), posterior ao processamento via úmida dos grãos de café. Para o despulpamento e desmucilagem mecânico utilizou-se grãos de café *Arabica*, caracterizado por frutos tipo cereja (vermelho) e em menor proporção verde. Posterior ao processamento, a água residuária de café era armazenada em uma lagoa (Figura 4.2b), local onde foi realizada a coleta após 1 dia de lançamento. Cerca de 2,4 L de água eram utilizadas para despolar 1 L de café, para o qual a água era mantida em recirculação durante todo o dia antes de ser despejada na lagoa de armazenamento. A água residuária foi coletada e armazenada em frascos plásticos, transferida para o laboratório e mantida em freezer a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o seu uso.

Figura 4.2. Locais de colheita dos resíduos de café.

(a) Pilhas de secagem ao sol de polpa e casca e (b) lagoa de armazenamento da água residuária. Fonte: Elaboração própria.

O resíduo sólido consistiu de mistura de polpa e casca, sendo obtido posterior ao despulpamento pela via úmida dos grãos de café, os quais foram recuperados ainda úmidos de pilhas de secagem ao sol. Um total de 96 mil L de resíduos sólidos foram gerados diariamente na fazenda “Da Lagoa”. Para esta pesquisa, foram coletadas as camadas superiores das pilhas de casca e polpa, com a finalidade de obter o resíduo mais recente coletado da máquina despulpadora. Esses resíduos foram coletados na fazenda (Figura 4.2a), transferidos para estufa a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ em bandejas de alumínio e mantido nessa condição até a sua secagem. Uma parte deste resíduo foi moído até atingir tamanho de partícula entre 0,05 e 1,2 mm, utilizando moinho de

facas tipo Willey SL-31, marca Solab. Posteriormente, embalados em sacos plásticos e mantidos em freezer a -10 °C até o seu uso.

4.2. Consórcio microbiano

Consórcio microbiano autóctone foi obtido mediante simulação do processamento do café por via úmida para obtenção da água residuária e resíduo de polpa e casca in natura. Para tanto, 1 L de grãos de café tipo *Arabica* foi mantido durante 24 h em recipiente de vidro com 2 L de água. A polpa e casca foram retiradas dos grãos manualmente, lavando estes últimos com a mesma água aonde permaneceram umedecidos. O líquido (água residuária de café) foi separado dos grãos e material vegetal por filtração em malha de 2 mm. O resíduo sólido foi transferido para estufa a 60 °C até secagem. A partir destes resíduos foram montados reatores em batelada com a finalidade de obter consórcio microbiano autóctone, nas condições de 3,5 g DQO L⁻¹ de água residuária, 2 g L⁻¹ de resíduo de polpa e casca, 1 g L⁻¹ de extrato de levedura e sem ajuste do pH (pH ~5.0). Utilizou-se frasco Duran como reatores, aumentando gradualmente o volume do reator após a fase de estabilização da produção de H₂ de 250 mL (R1, *headspace* 60%) para 500 mL (R2, *headspace* 50%), 1 L (R3 e R4, *headspace* 50%) e 2 L (R5, *headspace* 50%). O *headspace* foi submetido a atmosfera de N₂ (100%), os reatores fechados com tampa de butila e rosca plástica e incubados a 35 °C sem agitação. A biomassa de cada reator foi recuperada por centrifugação (R1, R2 e R3) ou sedimentação (R4 e R5), sendo transferida do R1 para R2 e, assim sucessivamente até o R5, e posteriormente ressuspensa em meio novo (água residuária de café, resíduo de polpa e casca e extrato de levedura).

Figura 4.3. Fluxograma de obtenção do consórcio microbiano.

Fonte: Elaboração própria.

Para a fermentação durante as diferentes fases de pesquisa, o consórcio obtido nas condições previamente descritas foi adicionado a concentração correspondente a 0,05 g SSV L^{-1} , sendo centrifugado a 8.000 rpm por 5 min e posteriormente o *pellet* resuspenso em cada reator em batelada.

4.3. Pré-tratamento

O sistema hidrotérmico da Figura 4.4 foi utilizado para o pré-tratamento da polpa e casca de café. Inicialmente, adicionava-se o resíduo de polpa e casca e a água destilada no reator até atingir a capacidade máxima de 200 mL (Figura 4.4 (1)). A temperatura foi ajustada em painel eletrônico (Figura 4.4 (2)), e o reator aquecido até a temperatura entre 160 a 210 °C, o qual resultava em pressão entre 6 a 20 bar, respectivamente. Após contabilizado o tempo de retenção correspondente (entre 10 e 15 min), a válvula de escape (Figura 4.4 (3)) foi aberta permitindo a rápida liberação da pressão interna do reator para um ciclone (Figura 4.4 (4)). Na parte inferior do ciclone foi colocado um recipiente para a coleta da fração líquida e polpa e casca pré-tratada. O material vegetal remanescente foi retirado do ciclone e integrado com as demais frações

recuperadas. Uma vez o reator atingia temperaturas inferiores a 100 °C, este era aberto, lavado e alimentado novamente com água, polpa e casca.

Figura 4.4. Reator para o pré-tratamento hidrotérmico da polpa e casca de café.

(1) Reator hidrotérmico, (2) Painel eletrônico, (3) Válvula de escape, (4) Ciclone. Fonte: Elaboração própria.

4.4. Procedimento experimental

4.4.1. Avaliação do efeito do pré-tratamento hidrotérmico nas características físico-químicas do resíduo de polpa e casca de café

Para o pré-tratamento hidrotérmico foi utilizado o sistema anteriormente descrito (Figura 4.4), aplicando diferentes temperaturas e o tempos de reação (Tabela 4.1) com o objetivo de avaliar baixas severidades (entre 3,2 e 3,5) com resíduo moído (M , entre 0,05 e 1,2 mm) e altas (entre 3,6 e 4,2) com resíduo *in natura* (N), segundo a equação 3.1 de Overend e Chornet (1987).

O reator hidrotérmico foi operado em batelada, sendo alimentado com 3 g de resíduo de polpa e casca (massa seca >95%). Ao final de cada ciclo, a fração sólida (resíduo de polpa e

casca pré-tratado) e líquida (*L*) foram separadas por peneiramento (2 mm), sendo caracterizadas mediante análises físico-químicas e cromatográficas. A polpa e casca pré-tratada secou-se a 60 °C. Os resíduos foram congelados até seu uso.

Tabela 4.1: Condições do pré-tratamento hidrotérmico da polpa e casca de café.

Casca e polpa:	Severidade (Ro)	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
Moída	3,24	160	30
	3,36	170	20
	3,53	180	15
<i>In natura</i>	3,65	190	10
	3,94	200	10
	4,24	210	10

4.4.2. Avaliação do efeito da co-digestão de resíduos de café brutos ou pré-tratados

Os substratos da fermentação foram água residuária (*A*), resíduo de polpa e casca *in natura* (*N*), resíduo de polpa e casca moída (*M*), resíduo de polpa e casca pré-tratada a diferentes severidades (*M* 3,2-3,5 e *N* 3,6-4,2), fração líquida do reator hidrotérmico a diferentes severidades (*L* 3,2-4,2), e mistura destes resíduos (Tabela 4.2 e Figura 4.5).

As fermentações foram conduzidas em reatores de 100 mL com 50% de volume reacional e 50% de *headspace* sob atmosfera de N₂ (100%). A água residuária e fração líquida foram ajustadas em pH 6,0 e posteriormente misturados com resíduo de polpa e casca *in natura* ou pré-tratado, 10% (v/v) de bio-aumentação do consórcio microbiano autóctone e 1 g L⁻¹ de extrato de levedura. Os frascos foram fechados com tampa de butila e rosca plástica e incubados a 35 °C, sem agitação.

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

Tabela 4.2: Avaliação do efeito da co-digestão de resíduos de café brutos ou pré-tratados.

Reator	Pré-tratamento do resíduo de polpa e casca					Substratos		
	Casca e polpa:	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Pressão (Bar)	Ro	Casca e polpa (g L ⁻¹)	Água residuária (g DQO L ⁻¹)	Fração líquida (g DQO L ⁻¹)
A	Moída	-	-	-	-	-	3,5	-
M		-	-	-	-	2	-	-
AM		-	-	-	-	2	3,5	-
N		-	-	-	-	2	-	-
AN		-	-	-	-	2	3,5	-
M 3,2	Moída	160	30	6	3,2	2	-	-
L 3,2						-	-	3,5
ML 3,2						2	-	3,5
AM 3,2						2	3,5	-
AML 3,2						2	1,75	1,75
M 3,4		170	20	8	3,4	2	-	-
L 3,4						-	-	3,5
ML 3,4						2	-	3,5
AM 3,4						2	3,5	-
AML 3,4						2	1,75	1,75
M 3,5		180	15	10	3,5	2	-	-
L 3,5						-	-	3,5
ML 3,5						2	-	3,5
AM 3,5						2	3,5	-
AML 3,5						2	1,75	1,75
N 3,6	In natura	190	10	12	3,6	2	-	-
L 3,6						-	-	3,5
NL 3,6						2	-	3,5
AN 3,6						2	3,5	-
ANL 3,6						2	1,75	1,75
N 3,9		200	10	15	3,9	2	-	-
L 3,9						-	-	3,5
NL 3,9						2	-	3,5
AN 3,9						2	3,5	-
ANL 3,9						2	1,75	1,75
N 4,2		210	10	20	4,2	2	-	-
L 4,2						-	-	3,5
NL 4,2						2	-	3,5
AN 4,2						2	3,5	-
ANL 4,2						2	1,75	1,75

A água residuária de café, M polpa e casca moída, N polpa e casca *in natura*, L fração líquida do reator hidrotérmico, DQO demanda química de oxigênio.

Figura 4.5. Fluxograma de avaliação do efeito da co-digestão de resíduos de café brutos ou pré-tratados.

A água residuária de café, *M* polpa e casca moída, *N* polpa e casca *in natura*, *L* fração líquida do reator hidrotérmico, *DQO* demanda química de oxigênio. Fonte: Elaboração própria.

Fonte: Elaboração própria.

4.4.3. Avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H₂, ácidos orgânicos e álcoois

Planejamento Plackett-Burman foi realizado para 8 fatores, com 12 ensaios e 3 pontos centrais (PB12, Tabela 4.3 e Figura 4.6) (Plackett and Burman, 1946). Os fatores estudados foram pH inicial (4,0, 5,5 e 7,0), temperatura (30, 40 e 50 °C), velocidade de agitação (90, 180 rpm e sem agitação), volume de *headspace* (50, 60 e 70%), porcentagem de bio-aumentação (10 e 20% e sem bio-aumentação), concentração do resíduo de polpa e casca (2, 4 e 6 g L⁻¹),

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

concentração de água residuária (7, 18,5 e 30 g DQO L⁻¹) e concentração de extrato de levedura (1, 2 g L⁻¹ e sem extrato de levedura).

Tabela 4.3: Matrix experimental para avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H₂, ácidos orgânicos e álcoois.

Ensaio	Valores codificados								Condições experimentais							
	pH	Temp.	Agitação	Headspace	Bio-aumentação	Polpa e casca	Água residuária	Extrato de Levedura	pH	Temp. (°C)	Agitação (rpm)	Headspace (%)	Bio-aumentação (%)	Polpa e casca (g L ⁻¹)	Água Residuária (g L ⁻¹)	Extrato de Levedura (g L ⁻¹)
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	7,0	30	180	50	0	2	30	2
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	7,0	50	0	70	0	2	7	2
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	4,0	50	180	50	20	2	7	0
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	4,0	30	180	70	0	6	7	0
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	7,0	50	0	70	20	2	30	0
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	7,0	50	180	50	20	6	7	2
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	4,0	50	180	70	0	6	30	0
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	4,0	30	180	70	20	2	30	2
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	4,0	30	0	70	20	6	7	2
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	7,0	30	0	50	20	6	30	0
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	4,0	50	0	50	0	6	30	2
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	4,0	30	0	50	0	2	7	0
13 PC	0	0	0	0	0	0	0	0	5,5	40	90	60	10	4	18,5	1
14 PC	0	0	0	0	0	0	0	0	5,5	40	90	60	10	4	18,5	1
15 PC	0	0	0	0	0	0	0	0	5,5	40	90	60	10	4	18,5	1

PC Ponto central.

Figura 4.6. Fluxograma de avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H₂, ácidos orgânicos e álcoois.

Utilizaram-se reatores em batelada de 250 mL, bio-aumentação com consórcio microbiano auctóctone dos resíduos do café ($0,05 \text{ gSSV L}^{-1}$) e polpa e casca pré-tratada em reator hidrotérmico a severidade 3,5 (180°C durante 15 min). O pH, temperatura, agitação, volume de *headspace*, porcentagem de bio-aumentação, concentração de polpa e casca, água residuária e extrato de levedura foram ajustadas segundo as condições de cada ensaio na Tabela 4.3. O volume reacional foi de 125 mL para *headspace* 50%, 100 mL para *headspace* 60% e 75 mL para *headspace* 70%. Os reatores eram submetidos a atmosfera gasosa de N_2 (100%) por 5 min, fechados com tampa de butila e rosca plástica, sendo operados durante 3 dias ou até estabilização da produção de hidrogênio.

4.4.4. Avaliação dos fatores da fermentação no consumo de H_2 por homoacetogênese

Foram avaliados o efeito do pH inicial, volume do *headspace*, concentração da polpa e casca e concentração de água residuária sobre a produção de H_2 (Tabela 4.4 e Figura 4.7) e de ácido acético por homoacetogênese (Ac_{Homo}). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, mais 4 pontos centrais para o total de 28 reatores.

O pH, *headspace*, concentração de água residuária e concentração de resíduo de polpa e casca foram ajustadas para cada ensaio segundo a Tabela 4.4. O volume dos reatores foi de 500 mL, com volume reacional de 300 mL para *headspace* 40%, 250 mL para *headspace* 50% e 200 mL para *headspace* 60%. O resíduo de polpa e casca era previamente pré-tratado mediante reator hidrotérmico a severidade 3,5 (180°C durante 15 min). O *pellet* do consórcio microbiano ($0,05 \text{ gSSV L}^{-1}$) foi bio-aumentado conforme as condições de cada ensaio e N_2 gasoso foi borbulhado por 5 min nos reatores, sendo fechados com tampa de butila e incubados a 30°C em ausência de agitação.

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

Tabela 4.4: Matrix experimental para a avaliação dos fatores da fermentação que conduzem ao consumo de H_2 por homoacetogênese.

Ensaio	Valores codificados				Condições Experimentais			
	pH	Headspace	Polpa e casca	Água residuária	pH	Headspace	Polpa e casca	Água residuária
						(%)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)
1	-1	-1	-1	-1	5,5	40	3	10
2	1	-1	-1	1	7,5	40	3	30
3	-1	1	-1	1	5,5	60	3	30
4	1	1	-1	-1	7,5	60	3	10
5	-1	-1	1	1	5,5	40	9	30
6	1	-1	1	-1	7,5	40	9	10
7	-1	1	1	-1	5,5	60	9	10
8	1	1	1	1	7,5	60	9	30
9 PC	0	0	0	0	6,5	50	6	20
10 PC	0	0	0	0	6,5	50	6	20
11 PC	0	0	0	0	6,5	50	6	20
12 PC	0	0	0	0	6,5	50	6	20

PC Ponto central.

Figura 4.7. Fluxograma de avaliação dos fatores da fermentação que conduzem ao consumo de H_2 por homoacetogênese.

Fonte: Elaboração própria.

Os reatores em batelada foram operados 9 dias após estabilização da produção de H₂ (7-11 dias), mediante monitoramento do biogás por cromatografia gasosa. A presença de metabolismo homoacetogênico também foi verificada mediante a quantificação do H₂ acumulado no *headspace* e síntese de ácido acético por homoacetogênese em 3 momentos diferentes:

- (1) Homoacetogênese 1: Após 3 dias de atingida a estabilização na produção de H₂,
- (2) Homoacetogênese 2: Após 6 dias de atingida a estabilização na produção de H₂ e,
- (3) Final da fermentação: Após 9 dias de atingida a estabilização na produção de H₂.

Amostras da fase gasosa e líquida eram coletadas em cada momento, para análise do biogás por cromatografia gasosa e quantificação de ácido acético por cromatografia líquida. Para a determinação da produção de ácido acético por homoacetogênese (Ac_{Homo}) utilizou-se a equação 4.1 modificada por Luo et al. (2011) (concentrações em mM):

$$Ac_{Homo} = (2[\text{Ácido butírico}] + 2[\text{Ácido acético}] - [\text{Ácido propiônico}] - [H_2])/6 \quad (Eq. 4.1)$$

4.4.5. Otimização da produção de hidrogênio

A metodologia de desenho de composto central rotacional (DCCR) foi utilizado para o estudo dos fatores pH inicial, volume de *headspace* e concentração de polpa e casca na otimização da produção de H₂ com resíduos de café (Tabela 4.5 e Figura 4.8). Foram realizados 3 pontos centrais e 17 ensaios com 4 réplicas para cada condição, dos quais 2 reatores foram usados para amostragem da fase gasosa e 2 da fase líquida, com o total de 68 reatores.

A concentração de polpa e casca (pré-tratada em sistema hidrotérmico à severidade de 3,5), volume de *headspace* e o pH inicial foram ajustados segundo as condições de cada ensaio da Tabela 4.5. O consorcio microbiano foi bio-aumentado (0,05 g SSV L⁻¹) e água residuária de processamento de café (30 g DQO L⁻¹) em cada reator. N₂ gasoso foi borbulhado por 5 min e as garrafas foram fechadas com tampa de butila. O experimento foi conduzido a 30 °C sem agitação.

Para tanto, os ensaios foram realizados em duas etapas: **Etapa I** - desde o início da fermentação até a estabilização da produção de H₂ e **Etapa II** - desde a estabilização da produção de H₂ até estabilização do consumo de H₂. No final de cada etapa quantificou-se a produção do acético por homoacetogênese (Ac_{Homo}, Equação 4.1). O modelo de produção de H₂ foi validado em duplicata utilizando reatores em batelada de 500 mL, com 30% de volume de *headspace* e 70% de volume reacional. As condições de fermentação foram concentração de água residuária

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

(30 g DQO L⁻¹), 7 g L⁻¹ de resíduo de polpa e casca pré-tratada em reator hidrotérmico a severidade 3,5 (180 °C durante 15 min), bio-aumentação do consórcio microbiano de 10% (v/v), temperatura de 30 °C e pH inicial 7,0. N₂ gasosos foi borbulhado 5 min no meio líquido, os reatores fechados com tampa de butila e incubados a 30 °C sem agitação.

Tabela 4.5: Matrix experimental para a seleção das condições de fermentação de otimização da produção de H₂

Ensaio	Tabela codificada			Experimentos		
	pH	Headspace	Polpa e casca	pH	Headspace	Polpa e casca
		(%)	(g L ⁻¹)		(%)	(g L ⁻¹)
1	-1	-1	-1	5,5	40	9
2	1	-1	-1	7,5	40	9
3	-1	1	-1	5,5	60	9
4	1	1	-1	7,5	60	9
5	-1	-1	1	5,5	40	15
6	1	-1	1	7,5	40	15
7	-1	1	1	5,5	60	15
8	1	1	1	7,5	60	15
9	-1,68	0	0	4,82	50	12
10	1,68	0	0	8,18	50	12
11	0	-1,68	0	6,5	33,18	12
12	0	1,68	0	6,5	66,82	12
13	0	0	-1,68	6,5	50	6,95
14	0	0	1,68	6,5	50	17,05
15 PC	0	0	0	6,5	50	12
16 PC	0	0	0	6,5	50	12
17 PC	0	0	0	6,5	50	12

PC Ponto central.

Figura 4.8. Fluxograma para a seleção das condições de fermentação de otimização da produção de H₂.

Fonte: Elaboração própria.

4.5. Análises físico-químicas e cromatográficas

Os resíduos sólidos (polpa e casca *in natura* ou pré-tratada) e líquidos (água residuária e fração líquida do reator hidrotérmico) foram caracterizados por meio das análises de sólidos totais (ST), sólidos totais voláteis (STV) (APHA/AWWA/WEF, 2012), carboidratos totais (Dubois et al., 1956; Blundi e Gadelha, 2001) e fenóis (Buchanan e Nicell, 1997) (Tabela 4.6). Para a análise de ST e STV, 30 mL de água residuária ou 3 g de casca e polpa foram levados para estufa (100 °C) por ~1 dia, dessecador por ~ 45 min e pesados (ST). Posteriormente, as amostras secas foram deixadas por 1 h em mufla a 550 °C, transferidas por ~ 30 min em estufa (100 °C) e ~ 45 min em dessecador para realizar a segunda pesagem (sólidos totais fixos e STV). Para as amostras coletadas na fazenda (água residuária e resíduo de polpa e casca), analisou-se adicionalmente nitrogênio total, fósforo total e metais (APHA/AWWA/WEF, 2012). Esta última análise foi realizada pelo Laboratório de Saneamento da Universidade de São Paulo-São Carlos.

Na água residuária e fração líquida do reator hidrotérmico quantificou-se adicionalmente a demanda química de oxigênio (DQO) e pH segundo a APHA/AWWA/WEF (2012). Por cromatografia líquida quantificou-se os ácidos orgânicos, furfural e 5-HMF (5-hidroximetilfurfural) conforme Ratti et al. (2013) e a composição de carboidratos seguindo a metodologia de Ahmad et al. (2018b). Prévio a análise das frações líquidas do reator hidrotérmico por cromatografia líquida, foi adicionado 697 µl de H₂SO₄ (72% m/m), hidrolisadas 1 h em autoclave, neutralizadas com CaCO₃ puro, passadas no cartucho CHROMABOND C18ec para a remoção da cor e filtradas (0,2 µm) (Ahmad et al., 2018b). Adicionalmente, realizou-se cromatografia gasosa para a determinação de ácidos orgânicos e álcoois diferentes aos quantificados por cromatografia líquida.

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

Tabela 4.6: Análises físico-químicas e cromatográficas realizadas nas diferentes etapas experimentais.

Parâmetro	Método	Referência	Frequência	Amostras
pH	Potenciometria	(APHA/AWWA/WEF, 2012)	Inicial	Água residuária da fazenda (seção 4.1)
			Final	Frações líquidas do hidrotérmico (seção 4.4.1)
			Inicial e final	Reatores seções 4.4.2, 4.4.3, 4.4.4 e 4.4.5.
DQO	Espectrofotometria	(APHA/AWWA/WEF, 2012)	Inicial	Água residuária da fazenda (seção 4.1)
			Final	Frações líquidas do hidrotérmico (seção 4.4.1)
			Inicial e final	Reatores seções 4.4.2, 4.4.3, 4.4.4 e 4.4.5.
Sólidos	Gravimetria	(APHA/AWWA/WEF, 2012)	Inicial	Água residuária, polpa e casca da fazenda (ST e STV, seção 4.1)
			Final	Frações líquidas do hidrotérmico (ST e STV, seção 4.4.1)
			Inicial e final	Reatores seções (SST) 4.4.2, 4.4.3, 4.4.4 e 4.4.5.
Lignina	Gravimetria/ Espectrofotometria	(Sluiter et al., 2008)	Inicial	Polpa e casca da fazenda (Klason e solúvel, seção 4.1)
			Inicial e final	Polpa e casca pré-tratada (Klason) seções 4.4.1 e 4.4.2
Cinzas	Gravimetria	(Sluiter et al., 2008)	Inicial	Polpa e casca da fazenda (seção 4.1)
Extrativos	Gravimetria	(APHA/AWWA/WEF, 2012)	Inicial	Polpa e casca da fazenda (seção 4.1)
Carboidratos totais	Espectrofotometria	(Dubois et al., 1956)	Inicial	Água residuária da fazenda (seção 4.1)
			Final	Frações líquidas do hidrotérmico (seção 4.4.1)
			Inicial e final	Reatores seções 4.4.2, 4.4.3, 4.4.4 e 4.4.5.
Fenóis	Espectrofotometria	(Buchanan e Nicell 1997)	Inicial	Água residuária, polpa e casca da fazenda (seção 4.1)
			Final	Frações líquidas do hidrotérmico (seção 4.4.1)
			Inicial e final	Reatores seções 4.4.2, 4.4.4 e 4.4.5.

Continua.

Continuação Tabela 4.6

Parâmetro	Método	Referência	Frequência	Amostras
Composição de carboidratos	Cromatografia líquida	(Ahmad et al., 2018b)	Inicial	Água residuária, polpa e casca da fazenda (seção 4.1)
			Final	Frações líquidas e polpa e casca pré-tratada no hidrotérmico (seção 4.4.1)
			Inicial e final	Reatores seções 4.4.2
Furfural e 5-HMF	Cromatografia líquida	(Ratti et al., 2013)	Final	Frações líquidas e polpa e casca pré-tratada no hidrotérmico (seção 4.4.1)
			Inicial e final	Reatores seções 4.4.2
Ácidos orgânicos e álcoois	Cromatografia líquida e gasosa	(Ratti et al., 2013)	Inicial	Água residuária da fazenda (seção 4.1)
			Final	Frações líquidas do hidrotérmico (seção 4.4.1)
			Inicial e final	Reatores seções 4.4.2, 4.4.3, 4.4.4 e 4.4.5.
N, P, Ca, Mg, Na, K, Fe, Zn, Ni, Mn, Cu	-	(APHA/AWWA/WEF, 2012)	Inicial	Água residuária, polpa e casca da fazenda (seção 4.1)
Composição do biogás	Cromatografia gasosa	(Ratti et al., 2013)	Periódicamente	Reatores seções 4.4.2, 4.4.3, 4.4.4 e 4.4.5.

DQO Demanda química de oxigênio, *5-HMF* 5-Hidroximetilfurfural, *N* Nitrogênio, *P* Fósforo, *Ca* Cálcio, *Mg* Magnésio, *Na* Sódio, *K* Potássio, *Fe* Ferro, *Zn* Zinco, *Ni* Níquel, *Mn* Manganês, *Cu* Cobre.

Para os resíduos de polpa e casca inicialmente retirou-se os extrativos (compostos não são constituintes da parede celular vegetal) utilizando ciclohexano: etanol (1:1) por 5 h, e água destilada por 1 h. Para os resíduos de polpa e casca pré-tratados em reator hidrotérmico determinou-se a lignina Klason, lignina solúvel (205 nm) e cinzas (Sluiter et al., 2012). Durante a análise de lignina realizou-se hidrólise do material lignocelulósico utilizando 0,16 g de polpa e casca e 1,5 mL de H₂SO₄ (72% m/m). O material foi deixado a 30 °C por 1 h em banho maria, diluído com 42 mL de água destilada, autoclavado por 1 h e finalmente filtrado (1,2 µm) (Sluiter et al., 2012). A partir deste hidrolisado foi determinada a composição de carboidratos por cromatografia líquida (Ahmad et al., 2018b), sendo considerado que na biomassa lignocelulósica os monossacarídeos ligam-se em cadeias. Portanto, os monossacarídeos quantificados foram

corrigidos com o fator de hidratação de 0,88 para pentoses (xilose e arabino) e 0,9 para hexoses (glicose, galactose e manose), obtendo-se os teores de glicana (polímero de glicose), xilana (polímero de xilose), galactana (polímero de galactose), arabinana (polímero de arabinose) e manana (polímero de manose) (Ahmad et al., 2018b).

Foram coletadas amostras no início e final da fermentação para a determinação do pH, sólidos suspensos voláteis (SST), DQO, carboidratos totais (Dubois et al., 1956; Blundi e Gadelha, 2001), fenóis (Buchanan e Nicell, 1997), composição de carboidratos (Ahmad et al., 2018b), ácidos orgânicos, álcoois, furfural e 5-HMF (Ratti et al., 2013), conforme descrito na Tabela 4.6. No resíduo de polpa e casca foi determinada a lignina Klason e carboidratos estruturais (Sluiter et al., 2012).

Para analisar a concentração de SST no final da fermentação, as amostras foram submetidas previamente a agitação manual ou mecânica com pérolas de vidro retirando a biomassa aderida ao material vegetal, filtração em papel filtro (7,5 μm) para separar a polpa e casca e filtração em membrana de fibra de vidro (1,2 μm) para reter a biomassa microbiana. Esta última membrana foi pesada previamente junto com o cadinho, levando ambos para estufa (100 °C) por ~1 dia, dessecador por ~45 min, e finalmente pesados (SST).

A quantificação de gás H_2 foi realizada por cromatografia gasosa (GC 2010, Shimadzu®), equipado com detector de condutividade térmica (TCD), coluna capilar Carboxen™ 1010 PLOT (30 m x 0,53 mm, Supelco) e argônio como gás de arraste (12 mL min⁻¹). As temperaturas usadas foram de 220 °C para o injetor, 130 °C para a coluna e 230 °C para o detector.

Ácidos orgânicos (ácido cítrico, málico, succínico, láctico, fórmico, acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico e capróico), furfural e 5-HMF foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Shimadzu®), equipado com bomba LC-10ADvp, injetor automático SIL e 20A HT, forno CT-20A, detector ultravioleta com arranjo de diodos do modelo SCL-M10AVP, e detector com índice de rarefação RID-10A, adicionalmente coluna Aminex® HPX-87H (300 mm x 7,8 mm; Bio-Rad). O eluente foi uma solução de H_2SO_4 0,005M, a um fluxo de 0,5 mL min⁻¹, temperatura do forno de 43 °C e injeção de 100 μl (Ratti et al., 2013).

Os ácidos orgânicos (ácido acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico e capróico) e álcoois (metanol, etanol, isobutanol) foram analisados por cromatografia gasosa

(GC 2010, Shimadzu®); utilizando coluna HP-INNOWAX (30m x 0,25mm x 0,25µm) com detector de ionização de chama (FID) usando hidrogênio como gás de arraste, e ar sintético e nitrogênio como gases auxiliares. A determinação foi feita por injeção automática (amostrador COMBI-PAL AOC5000, Shimadzu®).

As composições de carboidratos foram determinadas por HPLC (Shimadzu®) utilizando a coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) (300 x 7,8 mm), com fase móbil água ultra pura com H₂SO₄ 0,005 N em fluxo de 0,5 mL min⁻¹ e temperatura de forno de 43 °C conforme Ahmad et al. (2018b).

4.6. Análises cinéticas

Os dados de produção acumulada de H₂ foram ajustados ao modelo de Gompertz modificado (Equação 4.3) utilizando o software OriginPro 5.8 (Zwietering et al., 1990), a partir da qual estimou-se o potencial máximo de produção de H₂ (P), velocidade máxima de produção de H₂ (Rm) e tempo de início da fermentação (λ).

$$H = P \cdot \exp\left\{-\exp\left[\frac{Rm \cdot e}{P}(\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad (Eq.4.3)$$

Sendo:

H = Produção acumulada de H₂ (mL) no tempo (h)

P = Potencial máximo de produção de H₂ (mL)

Rm = Velocidade máxima de produção de H₂ (mL h⁻¹)

e = 2,718281828

λ = Tempo de início da fermentação (h)

4.7. Análise da comunidade microbiana

4.7.1. Extração de DNA

No final dos ensaios foram coletadas amostras 120 mL dos reatores em batelada, que posteriormente foram centrifugadas a 8.000 rpm por 5 min (Tabela 4.7). Realizou-se amostra composta dos ensaios 13, 14 e 15 (misturou-se 40 mL de cada reator antes da centrifugação,

indicada como 13-14-15), representando o ponto central do desenho Plackett-Burman referente a seção 4.4.3 sobre “*Avaliação do efeito dos fatores físicos, químicos e biológicos na fermentação*”. Amostra composta também foi realizada com os ensaios 15, 16 e 17 (misturou-se 40 mL de cada reator antes da centrifugação, indicada como 15-16-17) para o desenho de composto central rotacional DCCR referente a seção 4.3.5 sobre a “*Seleção das condições de fermentação de otimização da produção de H_2* ”. A biomassa de cada amostra foi lavada em tampão PBSX1 ($NaCl$ 8,2 g L^{-1} , Na_2HPO_4 1,05 g L^{-1} , $NaH_2PO_4+H_2O$ 0,35 g L^{-1}) e centrifugadas novamente a 8.000 rpm por 5 min. O *pellet* foi armazenado em tubos Falcon de 50 mL e transferido para freezer a $-20^{\circ}C$.

Tabela 4.7: Análises da comunidade microbiana nas diferentes etapas experimentais.

Método	Seção experimental	Amostras	Frequência
Extração de DNA	4.2	Consórcio microbiano	Final
	4.4.3 (Plackett- Burman)	Reatores em batelada dos ensaios 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13-14-15.	Final
	4.4.5 (DCCR)	Reatores em batelada dos ensaios 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15-16-17 e validação do modelo.	Final da etapa I, II e validação
PCR-DGGE	4.2	Consórcio microbiano	Final
	4.4.3 (Plackett-Burman)	Reatores em batelada dos ensaios 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13-14-15.	Final
	4.4.5 (DCCR)	Reatores em batelada dos ensaios 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15-16-17 e validação do modelo.	Final da etapa I, II e validação
Sequenciamento	4.2	Consórcio microbiano	Final
	4.4.3 (Plackett-Burman)	Reatores em batelada dos ensaios 9 e 13-14-15.	Final
	4.4.5 (DCCR)	Reatores em batelada dos ensaios 5 etapa I, 5 etapa II e validação do modelo.	Final da etapa I, II e validação

DCCR Desenho de composto central rotacional, *PCR-DGGE* Reação em cadeia da polimerase - Eletroforese em gel de gradiente desnaturante.

Para liberação dos microrganismos (fungos e bactérias) aderidos na polpa e casca do café, adicionou-se 3 mL de PBSX1 e 1 mL de pérolas de vidro para cada 1 mL de *pellet* (contendo polpa, casca e biomassa microbiana). As amostras foram submetidas ao vórtex por 30 segundos, as pérolas retiradas, e as amostras centrifugadas novamente a 8.000 rpm por 5 min.

O DNA foi extraído via Kit FastDNA® SPIN for Soil (MPbio), de acordo com o protocolo do fabricante. A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose de 0,8%, e a quantificação e a pureza foi realizada em Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific, https://mLz.garching.de/files/nanodrop_2000_user_manual).

4.7.2. PCR-DGGE

Na etapa da PCR (reação em cadeia da polimerase), utilizou-se o conjunto de iniciadores 968FGC - 1401R, referentes ao Domínio Bactéria (Nübel et al., 1996). Para a amplificação de fungos foram usados dois conjuntos de iniciadores ITS1 - ITS4 para a primeira corrida e ITS3GC- ITS4 (Orgiazzi *et al.*, 2012) para a segunda corrida.

O programa de corrida do termociclador para o domínio Bactéria (Eppendorf AG - 22331 Hamburg) foi de pré-desnaturação a 95 °C por 7 min; 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 45 segundos; anelamento a 56 °C por 45 segundos; extensão a 72 °C por 60 segundos; extensão final a 72 °C por 10 min; resfriamento a 4 °C.

Para os fungos as condições foram de pré-desnaturação de 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação de 94 °C por 30 segundos, anelamento de 60 °C na primeira corrida e 55 °C para a segunda corrida por 30 segundos, extensão de 72 °C por 45 segundos, extensão final de 72 °C por 7 min. O produto da PCR foi verificado em eletroforese em gel de agarose de 1,2%.

O produto da PCR (30 ng μL^{-1}) foi separado por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo gradiente desnaturante de 45% - 65% para domínio Bactéria (Muyzer et al., 1993) e de 30% - 65% para os fungos.

O DGGE (eletroforese em gel de gradiente desnaturante) foi realizado em DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad). As condições de corrida do DGGE foi de 75V e temperatura de 60 °C por 16 h. A leitura do perfil padrão das bandas do DGGE foi realizado no sistema de fotodocumentação (L.PixTouch - Loccus Biotechnology) sob a exposição de 254 nm

UV. A partir do perfil de bandas do DGGE foi utilizado o programa BioNumerics versão 7.0 para o cálculo do coeficiente de similaridade e a construção do dendrograma. O cálculo da diversidade de Shannon_H e estimador de riqueza de Chao-1 foram feitos via programa Past.

4.7.3. Sequenciamento e Análises de Bioinformática

Para esta análise foram utilizadas as amostras de DNA extraídas para o consórcio microbiano, ensaios 9 e 13-14-15 referente a seção 4.4.3, e ensaio 5 (amostra do final da etapa I e II) e ensaio de validação referente a seção 4.4.5 (Tabela 4.6). Foi preparada a biblioteca (DNA com insertos curtos – 500 bp) e sequenciado o metagenoma (3Gbases sequencias, Paired End 150 bp, Q30 > 85%) mediante a Plataforma Illumina NovaSeq6000 no laboratório Genone & Biotechnologies (Rio de Janeiro, Brasil, www.genone.com.br), de acordo com as especificações do fabricante.

A qualidade das bibliotecas foi conferida via ferramenta fastqc (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), e sequencias foram filtrados via ferramenta Trimmomatic (Bolger, Lohse e Usadel, 2014) para remover adaptadores e sequencias de baixa qualidade (*phred score* ≤ 20). Logo após, seguiu-se com a montagem individual de cada biblioteca com a ferramenta metaSPAdes (Bankevich et al., 2012, Nurk et al., 2013), utilizando os k-mers 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101. A qualidade da montagem foi verificada com a ferramenta metaQUAST (Mikheenko et al., 2016). Para melhor anotação, um corte mínimo de 150 pb foi utilizado nos *contigs*.

Para a anotação funcional, taxonômica e mapeamento de sequencias foi utilizado a ferramenta FMAP (*Functional Mapping and Analysis Pipeline for metagenomics and metatranscriptomics studies*, Kim et al., 2016) com *cutoff* de identidade de 80%, e-value <1e-3 e genes com cobertura >80%. FMAP utiliza um banco de dados próprio para a anotação funcional. O banco de dados de proteínas UNIREF (Suzek et al. 2014) foi filtrado pelo número de ortologias do KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; Kanehisa e Goto, 2000; Kanehisa et al., 2016; Kanehisa et al., 2017). Para a anotação taxonômica, FMAP utilizou-se o banco de dados RefSeq (NCBI reference sequence database, O'Leary et al., 2016). Este processamento de dados foi realizado na Divisão de Recursos Microbianos, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), Universidade de Campinas (UNICAMP).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da obtenção de consórcio microbiano fermentativo a partir dos resíduos do processamento de café (Hipótese 1)

Reatores em batelada R1 a R5 foram operados nas mesmas condições de 35 °C, água residuária 3,5 g DQO L⁻¹, pH 4,9, polpa e casca in natura 2 g L⁻¹ e extrato de levedura 1 g L⁻¹, com a finalidade de recuperar a biomassa oriunda dos resíduos de café. Obteve-se atividade fermentativa mediante produção de 4,0 mL H₂ em R1, 20,3 mL H₂ em R2, 44,4 mL H₂ em R3, 22,5 mL H₂ em R4 e 150,8 mL H₂ no R5. Não se verificou metano em nenhum dos reatores no período de 26 d. Mudança na coloração do líquido de marrom escuro para amarelo e desintegração do resíduo sólido na água, confirmou atividade dos microrganismos.

Por meio de microscopia de contraste de fase e luz comum (Figura 5.1), foi observado bactérias, e esporos e hifas (cenocíticas e septadas) de fungos (Figura 5.1b,) crescendo ao redor das fibras de polpa e casca, destacando-se a presença de bacilos com endósporo terminal (Figura 5.1a)), cocos Gram positivos individuais ou em cadeias (diplococos e estreptococos), além de bacilos Gram positivos e negativos (Figura 5.1b).

Figura 5.1. (a) Microscopia de contraste e (b) Microscopia de Luz comum e coloração de Gram do consórcio microbiano obtido a partir dos resíduos do processamento de café.

A seleção do consórcio microbiano com variedade fisiológica de bactérias e fungos favorece a diversidade de enzimas, principalmente as celulolíticas, importantes na quebra de moléculas de celulose para liberação de açúcares fermentáveis a partir do resíduo de polpa e casca. Alta riqueza e densidade celular pode também favorecer a maior estabilidade reacional, produção de H_2 e capacidade de adaptação à toxicidade procedente de material lignocelulósico hidrolisado provindo do pré-tratamento hidrotérmico da polpa e casca (Ren et al., 2009; Vasconcelos et al., 2016). Adicionalmente, os fungos podem disponibilizar enzimas de degradação da hemicelulose, lignina e celulose, facilitando o pré-tratamento biológico adicional na casca e polpa (Lynd et al., 2002; Waldron, 2010).

5.1.1. Considerações parciais

Observou-se produção de H_2 a partir de microrganismos autóctones aos resíduos do processamento de café, com morfologias características de bactérias e fungos. Segundo esta informação, a hipótese de que “*Nos resíduos do processamento de café tem-se bactérias e fungos autóctones que podem ser usados como consórcio microbiano para a fermentação*” foi confirmada.

5.2. Caracterização dos resíduos do processamento do café

Os resíduos do processamento de café foram caracterizados com o objetivo de identificar o potencial e limitações para a fermentação (Tabela 5.1 e 5.2). Na água residuária observou-se 31.250 mg L^{-1} de matéria orgânica na forma de DQO (demanda química de oxigênio) e 20.172 mg L^{-1} de ST (sólidos totais), com cerca de 74,6% de STV (sólidos totais voláteis, 15.047 mg L^{-1}).

Para o resíduo de polpa e casca de café foi observado 94,8% de ST (Tabela 5.2) e 84,2% de STV. No entanto, 29,4% desse material encontra-se na forma de lignina (Klason: 22,9% e solúvel: 6,5%), considerada resistente ao ataque enzimático e hidrólise (Menezes et al., 2014), fazendo-se importante a aplicação de processos de deslignificação físicos (mediante moagem e reator hidrotérmico) e biológicos (aplicação de microrganismos) nestes resíduos.

Em relação aos carboidratos, na água residuária verificou-se 2.833 mg L^{-1} na forma de galactose, arabinose e frutose (29, 943 e 328 mg L^{-1} , respectivamente) valor relativamente baixo

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

quando comparado com a concentração de ácidos orgânicos totais de 22.110 mg L⁻¹. Na polpa e casca de café observou-se 18,7% de celulose (glicana) e 13,9% na forma de hemicelulose (xilana, arabinana e galactana). Estes carboidratos podem ser hidrolisados para o aproveitamento no processo fermentativo. Materiais não fermentáveis foram observados em baixa concentração, como as cinzas (1,7%) e os extrativos (23%).

Tabela 5.1: Caracterização da água residuária do processamento de café.

Componentes		Concentração (mg L ⁻¹)
<i>Matéria orgânica</i>	DQO	31.250
	ST	20.172
<i>Carboidratos</i>	STV	15.047
	Totais	2.833
	Galactose	29
	Arabinose	943
	Frutose	328
<i>Ácidos orgânicos</i>	Ácidos totais	22.110
	Ácido láctico	7.256
	Ácido fórmico	1.256
	Ácido acético	2.009
	Ácido butírico	2.382
<i>Fenol</i>	Total	1.334
<i>Nutrientes e elementos traço</i>	Nitrogênio total	187,8
	Fósforo total	63,30
	Ferro	50,0
	Cobre	1,189
	Zinco	1,045
	Manganês	1,764
	Magnésio	71,6
	Sódio	6,3
	Cálcio	144,5
	Potássio	1.800

DQO demanda química de oxigênio, *ST* sólidos totais, *STV* sólidos totais voláteis.

Tabela 5.2: Caracterização do resíduo de polpa e casca de café.

Componentes	Concentração (%)
<i>Matéria orgânica</i>	ST
	94,8
	STV
	84,2
<i>Celulose</i>	Glicana
	18,7
<i>Hemicelulose</i>	Xilana
	8,4
	Galactana
	1,13
	Arabinana
	4,4
	Manana
	≤ LD
<i>Lignina</i>	Klason
	22,9
	Solúvel
	6,5
<i>Cinzas</i>	1,7
<i>Extrativos</i>	23
<i>Fenol</i>	Total
	12,1
<i>Nutrientes e elementos traço</i>	Nitrogênio total
	2,5
	Fósforo total
	1,6
	Ferro
	0,170
	Cobre
	0,004
	Zinco
	0,003
	Manganês
	0,006
	Magnésio
	0,193
	Sódio
	0,034
	Cálcio
	0,638
	Potássio
	4,1

ST sólidos totais, STV sólidos totais voláteis, ≤ LD inferior ao limite de detecção.

Por meio da caracterização da polpa e casca observaram-se valores diferentes em relação aqueles reportados por Juliastuti et al. (2017). Os autores observaram 63% de celulose, 2,3% de hemicelulose e 17% de lignina em resíduo de polpa obtido de máquinas despulpadoras de café. Início do processo de degradação deste resíduo no local de armazenamento na fazenda de café, pode explicar a inferior determinação de carboidratos constitucionais (celulose 18,7%, hemicelulose 13,9% e lignina 22,9%) em comparação com os resultados da literatura, uma vez que observou-se a presença de microrganismos (Figura 5.1) que possivelmente utilizaram estes componentes do material para seu crescimento.

Em relação a água residuária verificou-se pH de 3,93 e alta concentração de ácidos orgânicos (22.110 mg L⁻¹), consequente do processo de acidificação ocorrido durante o armazenamento na lagoa da fazenda, uma vez que microrganismos autóctones aos resíduos do

café podem ter favorecido a formação de ácidos orgânicos, como o ácido láctico, butírico, acético e fórmico (entre 1.256 e 7.256 mg L⁻¹, Tabela 5.1).

Elevada concentração de fenol foi observada em ambos os resíduos (1.334 mg L⁻¹ na água residuária e 12,1% no resíduo sólido, Tabela 5.1 e 5.2). Estes resultados foram superiores aos reportados em outras pesquisas com água residuária de café simulada (583 mg L⁻¹), embora próximos aos observados na mesma fazenda “Da Lagoa” durante a safra de 2014 (1.528 mg L⁻¹) (Villa-Montoya et al., 2016). Similarmente, Juliastuti et al. (2017) verificaram somente 3,78% de fenóis para resíduos sólidos obtidos de máquinas de despulpamento, resultado influenciado pela diferença na origem dos grãos (Juliastuti et al., 2017). Os fenóis são comumente observados nos subprodutos da cafeicultura, no entanto, valores superiores a 1.000 mg L⁻¹ podem causar toxicidade aos microrganismos fermentativos durante a produção de H₂ (Tai et al., 2010), motivo pelo qual, deve ser monitorado seu efeito deletério sobre o consórcio microbiano.

Para ambos os resíduos, verificou-se presença de nitrogênio e fósforo (Tabela 5.1 e 5.2). A relação DQO:N:P mínima de 350:5:1 é recomendada para a digestão anaeróbia (Speece, 1996). Por tanto, para a água residuária observou-se deficiências de 58% e 30% no conteúdo de nitrogênio e fósforo, respectivamente. O resíduo de polpa e casca era composto por 2,5% de nitrogênio e 1,6% de fósforo, teores elevados que podem dispensar da aplicação de nutrientes a partir de fontes exógenas.

Ferro, cobre, zinco, manganês, magnésio, cálcio e potássio, importantes elementos traços necessários para o crescimento microbiano, também foram observados em ambos os resíduos (entre 1,045 e 1.800 mg L⁻¹ na água residuária e 0,034 e 4,1% no resíduo de polpa e casca, Tabela 5.1 e 5.2). Especificamente o ferro é um dos micronutrientes necessários para a atividade e reprodução das bactérias produtoras de H₂, uma vez que as enzimas envolvidas na fermentação contêm ferro ou enxofre (Ruggeri et al., 2015).

O potássio foi abundante tanto no resíduo de polpa e casca (4,1%) quanto na água residuária (1.800 mg L⁻¹) (Tabela 5.1 e 5.2). Este nutriente pode ser decorrente dos fertilizantes aplicados nas plantações de café, uma vez que o setor agrícola utiliza adubos com alto teor de potássio para aumentar a produtividade (Sakar et al., 2009).

5.3. Avaliação do efeito do pré-tratamento hidrotérmico nas características físico-químicas do resíduo de polpa e casca de café (Hipóteses 2)

5.3.1. Caracterização das frações obtidas do pré-tratamento hidrotérmico do resíduo de polpa e casca

Frações sólidas e líquidas do resíduo de polpa e casca de café foram recuperadas após pré-tratamento hidrotérmico (Figura 5.2 e 5.3). Verificou-se diminuição do pH nas frações líquidas de 8,0 para 8,2, 8,3, 5,1, 4,9 e 6,7 com o aumento da severidade do pré-tratamento de 3,2 para 3,4, 3,5, 3,6, 3,9 e 4,2, respectivamente. Este resultado foi consequência da liberação de ácido acético proveniente do processo de despolimerização da hemicelulose, adicionalmente a hidrólise da celulose e lignina com a liberação de monômeros (Waldron, 2010; Ruiz et al., 2015).

O aumento na severidade do pré-tratamento influenciou as concentrações de matéria orgânica como DQO, ST e STV disponíveis nas frações líquidas (Figura 5.2a). Por exemplo, para valores menores de severidade (3,2) observou-se 3.509 mg L⁻¹ de DQO, 3.875 mg L⁻¹ de ST: e: 3.175 mg L⁻¹ de STV. Todavia, para maiores valores de severidade (4,2) observou-se valores maiores, respectivamente, de 7.425 mg L⁻¹, 6.560 mg L⁻¹ e 6.005 mg L⁻¹. Provavelmente isto foi consequência da solubilização dos resíduos da polpa e casca na água do sistema hidrotérmico, possibilitando liberação de monossacarídeos, proteínas, óleos, fenóis, furfural e 5-HMF nas frações líquidas (Ahmad et al., 2018a; Selvamurugan et al., 2010), o que consequentemente aumentou a concentração da matéria orgânica.

Figura 5.2. Caracterização das (a) Frações líquidas e (b) Resíduo de polpa e casca pré-tratado obtidas do reator hidrotérmico.

DQO demanda química de oxigênio, ST sólidos totais e STV sólidos voláteis.

Figura 5.3. Resíduo de polpa e casca *in natura* ou pré-tratado no reator hidrotérmico a diferentes severidades.

(a) Moído, (b) Severidade 3,2, (c) Severidade 3,4, (d) Severidade 3,5, (e) *In natura*, (f) Severidade 3,6, (g) Severidade 3,9, (h) Severidade 4,2.

Os mesmos argumentos explicam o aumento proporcional dos fenóis nas frações líquidas com a severidade do pré-tratamento, sendo de 598 mg L^{-1} , 741 mg L^{-1} e 2.032 mg L^{-1} para baixa (3,2), média (3,5) e alta severidade (4,2), respectivamente. Os compostos fenólicos podem causar inibição do crescimento microbiano e do processo fermentativo (Quéméneur et al., 2012; Nissilä et al., 2014), mas sua liberação para a fração líquida favorece teores inferiores nos resíduos sólidos. Portanto, pré-tratamentos intermediários podem abranger o duplo propósito de disponibilizar material adequado para a fermentação, sem as limitações ocasionadas pela presença de substâncias tóxicas como os fenóis.

Quéméneur et al. (2012) reportaram diminuição na produção de H_2 de $1367,7 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1}$ na ausência de fenol para $480,5 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1}$ com adição de 1 g L^{-1} de fenol em reatores em batelada alimentados com xilose a 37°C , pH 5,5 e inóculo lodo anaeróbio pré-tratado termicamente, pelo qual, altas severidade de pré-tratamento podem conduzir a reduções no potencial de produção de biogás a partir de frações líquidas do hidrotérmico.

Em relação aos carboidratos totais na fração líquida observou-se valor maior (1.447 mg L^{-1}) para maior severidade (3,6) e menor (357 mg L^{-1}) para severidade menor (Figura 5.2), como discutido anteriormente, causado pelo aumento de compostos não fermentáveis em função do tempo e temperatura de exposição do material lignocelulósico ao pré-tratamento. Os principais

carboidratos observados foram glicose (de inferior ao limite de detecção até 519 mg L⁻¹), galactose (de inferior ao limite de detecção até 502 mg L⁻¹) e arabinose (de 24 a 112 mg L⁻¹). Destaca-se que nas condições de pré-tratamento da polpa e casca com severidade 3,5 obteve-se maior solubilização de glicose (63 mg L⁻¹), galactose (500 mg L⁻¹) e arabinose (145 mg L⁻¹). Segundo Baêta et al. (2017), a solubilização de celulose e hemicelulose para a fração líquida não significa superior produção de biogás. Os autores pré-trataram casca de café mediante explosão a vapor em severidades entre 1,29 e 4,41 (1 - 60 min e 120 - 210 °C). Os autores observaram a maior solubilização de celulose e hemicelulose em severidade de 4,41 (remoção de 62% e 54%, respectivamente). No entanto, a alta concentração de furanos (> 100 mg L⁻¹) a alta severidade de pré-tratamento (4,41) conduziu a inferior produção de metano de 100,6 mL CH₄ g DQO⁻¹ quando comparado com baixa severidade (1,29) de 115,9 mL CH₄ g DQO⁻¹ (remoção de celulose 14% e hemicelulose 7,6%, concentração de furanos < 50 mg L⁻¹). Para isto, os autores operaram reatores em batelada a 35 °C, 180 rpm, pH 7,0, com substrato a fração líquida do pré-tratamento e inóculo de digestor anaeróbio para o tratamento de água residuária.

Para os resíduos da polpa e casca pré-tratados verificou-se maior porcentagem de celulose (glicana) a severidade de 4,2 (37,8%) e menor (19,1%) para severidade de 3,5. No caso da hemicelulose (xilana, galactana, arabinana e manana) os maiores teores foram para a polpa e casca pré-tratada a severidade 3,2 (8,3%, 0,8%, 5,0% e 2,6%, respectivamente) e os menores para severidade de 4,2 (5,7%, 0,6%, 1,0% e 2,9% respectivamente). Segundo Kim et al. (2014) para eficiente transformação da celulose em glicose altas severidades de pré-tratamento são necessárias. Enquanto, a hemicelulose é mais susceptível a hidrólise devido a sua estrutura amorfa, as condições com temperaturas baixas e longos tempos de pré-tratamento são mais adequados para sua solubilização. Os autores estudaram o pré-tratamento hidrotérmico de madeira de pino, uma vez que obtiveram madeira pré-tratada com composição de ~ 35% de glicana e ~ 7% de xilana a baixa severidade de 3,6 e e composição de ~ 35% de glicana e entre 0 - 5% de xilana a severidade alta de 4,8.

Teores de lignina Klason maiores foram observados nos resíduos de polpa e casca pré-tratados em reator hidrotérmico (entre 25% e 37%, Figura 5.2) quando comparado com resíduo *in*

natura (19%), enquanto os valores de lignina solúvel foram similares em todos os materiais lignocelulósicos de estudo (entre 4,3 e 6,5%, Figura 5.2). Maior teor de lignina Klason em altas temperaturas (máxima de 37% a severidade 3,6) foi relacionada a elevada desestruturação do material lignocelulósico e menor predominância de celulose e hemicelulose, nestas condições, os carboidratos foram solubilizados para a fase líquida, aumentando a porcentagem de lignina na polpa e casca. Este resultado pode ser comparado com Ahmad et al. (2018b) durante o pré-tratamento hidrotérmico de bagaço de cana em reator hidrotérmico com adição de H₂O₂ 4% (v/v), obtendo 19% de lignina Klason nas condições de pré-tratamento de 213 °C por 12 min e 12% de lignina Klason nas condições de a 146 °C por 12 min.

Segundo Menezes et al. (2014), o pré-tratamento deve permitir a desestruturação da hemicelulose e lignina, uma vez que são uma barreira física para a celulose. Nesse contexto, os autores observaram os melhores resultados durante o pré-tratamento de polpa de café com NaOH 4% por 25 min, obtendo polpa com 44,15% de hemicelulose e 25,19% de lignina remanescente. Para o resíduo de polpa e casca de café do presente projeto, verificou-se menor teor de lignina de 25% a severidade 3,5 com hemicelulose de 13%, resultados consequentes com as recomendações dos autores.

Para furfural e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) observou-se valores próximos a todas as severidades de pré-tratamento (0,53-0,91% e 0,18-0,31% respectivamente). Quando comparado com Saha et al. (2013) utilizando reator hidrotérmico no pré-tratamento de palha de milho, nessa pesquisa observaram aumento do furfural (de 0,48% para 2,1%) e 5-HMF (0,04% para e 0,32%) quando a severidade do pré-tratamento passou de 3,6 para 4,8, sem efeito negativo sobre a produção de etanol. Este resultado demonstrou a baixa produção de compostos inibitórios sob as condições de estudo do pré-tratamento da casca e polpa (inferior a 1%) em reator hidrotérmico a severidades entre 3,2 e 4,2.

Baêta et al. (2017) selecionaram como as condições mais adequadas de explosão a vapor de casca de café severidade de 2,4 (120°C por 60 min), uma vez que obtiveram em tais condições quantidade inferior de inibidores como furanos ou lignina solúvel (inferior a 100 mg L⁻¹). Este resultado assemelha-se ao presente estudo, no qual foi observado para severidades entre 3,2 e 3,5 baixa liberação de inibidores e maior teor de carboidratos na polpa e casca pré-tratada (máxima de lignina solúvel 2,6%, furfural 0,91%, 5-HMF 0,21%, celulose 19,8% e hemicelulose 14,1%) e

fração líquida do hidrotérmico (máxima de fenóis 741 mg L^{-1} , furfural inferior ao limite de detecção, 5-HMF inferior ao limite de detecção e carboidratos 447 mg L^{-1}), sendo por tanto as condições mais adequadas para o pré-tratamento da casca e polpa de café.

5.3.2. Considerações parciais

Por meio do pré-tratamento hidrotérmico obteve-se aumento de até 14% da lignina e 19% a celulose com diminuição de até 7% da hemicelulose, e concentrações de furfural e 5-HMF inferiores ao limite de detecção na fase líquida e máximo 1% na polpa e casca em todas as condições de estudo (severidades entre 3,2 e 4,2). Provavelmente, estas características facilitam o acesso das enzimas aos substratos e aumentam a quantidade de açúcares fermentáveis. Portanto, confirmou-se a hipótese de que *“Por meio da aplicação de pré-tratamento hidrotérmico tem-se modificação das características físico-químicas do resíduo de polpa e casca de café, por conseguinte é possível obter substratos com maior potencial para a produção de H_2 ”*.

5.4. Avaliação do efeito da co-digestão de resíduos de café brutos ou pré-tratados na produção de H_2 (Hipóteses 3)

5.4.1. Operação dos reatores em batelada com resíduos de café brutos

Parâmetros cinéticos (P : Potencial máximo de produção de H_2 , R_m : Velocidade máxima de produção de H_2 , λ : Tempo de início da fermentação) foram determinados nos diferentes reatores em batelada (Tabela 5.3) utilizando o modelo de Gompertz modificado para o ajuste dos dados de produção acumulada de H_2 (Figura 5.4). Carboidratos da fase líquida, carboidratos estruturais da polpa e casca, lignina Klason, fenóis, furfural, 5-HMF e sólidos suspensos totais (SST) foram quantificados no início e final da fermentação, com o intuito de ampliar o entendimento do processo biológico (Tabelas 5.3, 5.4, 5.5 e 5.6).

Figura 5.4. Cinéticas de produção de H_2 e ajuste ao modelo de Gompertz modificado dos reatores em batelada da fermentação de resíduos de café brutos ou pré-tratados.

A água residuária de café, *M* polpa e casca moída, *N* polpa e casca *in natura*, *AM* água residuária + polpa e casca moída, *AN* água residuária + polpa e casca *in natura*. *M* 3,2/ *M* 3,4/ *M* 3,5 polpa e casca moída e pré-tratada a severidades entre 3,2 e 3,5. *L* 3,2/ *L* 3,4/ *L* 3,5/ *L* 3,6/ *L* 3,9/ *L* 4,2 frações líquidas do reator hidrotérmico operado a severidades entre 3,2 e 4,2. *ML* 3,2/ *ML* 3,4/ *ML* 3,5 polpa e casca moída + frações líquidas do pré-tratamento a severidades entre 3,2 e 4,2. *AM* 3,2/ *AM* 3,4/ *AM* 3,5 água residuária + polpa e casca moída e pré-tratada a severidades entre 3,2 e 3,5. *AML* 3,2/ *AML* 3,4/ *AML* 3,5 água residuária de café + polpa e casca moída + fração líquida do pré-tratamento a severidades entre 3,2 e 3,5. *N* 3,6/ *N* 3,9/ *N* 4,2 polpa e casca *in natura* e pré-tratada a severidades entre 3,6 e 4,2. *NL* 3,6/ *NL* 3,9/ *NL* 4,2 polpa e casca *in natura* + frações líquidas do pré-tratamento a severidades entre 3,6 e 4,2. *AN* 3,6/ *AN* 3,9/ *AN* 4,2 água residuária + polpa e casca *in natura* e pré-tratada a severidades entre 3,9 e 4,2. *ANL* 3,6/ *ANL* 3,9/ *ANL* 4,2 água residuária de café + polpa e casca *in natura* + fração líquida do pré-tratamento a severidades entre 3,9 e 4,2. A potencial máxima de produção de H_2 , X_c Velocidade máxima de produção de H_2 , k Tempo de início da fermentação.

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

Tabela 5.3: Parâmetros cinéticos e carboidratos dos reatores em batelada da fermentação de resíduos de café brutos ou pré-tratados.

Reator	Parâmetros cinéticos			Carboidratos				
	<i>P</i>	<i>Rm</i>	λ	Água residuária			Resíduo de polpa e casca	
	(mL H ₂)	(mL H ₂ h ⁻¹)	(h)	Inicial (mg L ⁻¹)	Final (mg L ⁻¹)	Redução (%)	Inicial (%)	Final (%)
<i>A</i>	2,9	0,3	14,7	117	113	4	-	-
<i>M</i>	0,8	0,2	12,5	118	59	50	33	1
<i>AM</i>	3,0	0,6	10,5	591	105	82	33	46
<i>N</i>	1,2	0,1	16,9	206	90	56	33	4
<i>AN</i>	2,6	0,1	6,6	496	175	65	33	8
<i>M 3,2</i>	1,3	0,2	18,2	181	99	45	34	15
<i>L 3,2</i>	1,6	0,7	17,3	509	366	28	-	-
<i>ML 3,2</i>	2,3	0,3	11,4	620	563	9	34	19
<i>AM 3,2</i>	4,2	0,6	11,4	416	147	65	34	11
<i>AML 3,2</i>	2,9	0,4	14,6	349	205	41	34	14
<i>M 3,4</i>	1,9	0,1	11,6	253	212	16	33	16
<i>L 3,4</i>	1,4	0,2	13,4	552	229	46	-	-
<i>ML 3,4</i>	2,3	0,3	12,4	747	418	44	33	2
<i>AM 3,4</i>	5,1	0,8	15,6	428	182	57	33	36
<i>AML 3,4</i>	4,7	0,4	14,8	317	191	40	33	12
<i>M 3,5</i>	1,8	0,4	22,8	200	77	61	33	21
<i>L 3,5</i>	1,8	0,2	14,7	481	390	19	-	-
<i>ML 3,5</i>	2,2	0,3	9,4	546	361	34	33	3
<i>AM 3,5</i>	8,0	0,8	14,7	397	204	49	33	5
<i>AML 3,5</i>	3,8	0,6	17,0	302	151	50	33	13
<i>N 3,6</i>	1,2	0,1	15,0	256	140	46	43	17
<i>L 3,6</i>	2,3	0,1	74,5	838	423	50	-	-
<i>NL 3,6</i>	2,3	0,1	58,8	819	383	53	43	17
<i>AN 3,6</i>	4,9	0,7	16,2	515	209	59	43	13
<i>ANL 3,6</i>	3,4	0,3	19,8	360	193	46	43	31
<i>N 3,9</i>	1,1	0,1	17,6	275	131	52	44	39
<i>L 3,9</i>	2,1	0,2	48,3	868	472	46	-	-
<i>NL 3,9</i>	2,1	0,1	53,4	768	505	34	44	6
<i>AN 3,9</i>	2,7	0,4	22,1	370	163	56	44	24
<i>ANL 3,9</i>	3,8	0,3	18,8	343	143	58	44	20
<i>N 4,2</i>	1,0	0,1	22,1	210	100	52	45	41
<i>L 4,2</i>	1,8	0,4	48,3	739	342	54	-	-
<i>NL 4,2</i>	1,8	0,3	48,2	644	353	45	45	8
<i>AN 4,2</i>	3,2	0,3	22,9	185	197	0	45	39
<i>ANL 4,2</i>	3,2	0,3	23,2	333	147	56	45	36

P potencial máximo de produção de H₂, *Rm* Velocidade máxima de produção de H₂, λ Tempo de início da fermentação, *SST* sólidos suspensos totais. *A* água residuária de café, *M* polpa e casca moída, *N* polpa e casca *in natura*, *AM* água residuária + polpa e casca moída, *AN* água residuária + polpa e casca *in natura*. *M 3,2/ M 3,4/ M 3,5* polpa e casca moída e pré-tratada a severidades entre 3,2 e 3,5. *L 3,2/ L 3,4/ L 3,5/ L 3,6/ L 3,9/ L 4,2* frações líquidas do reator hidrotérmico operado a severidades entre 3,2 e 4,2. *ML 3,2/ ML 3,4/ ML 3,5* polpa e casca moída + frações líquidas do pré-tratamento a severidades entre 3,2 e 4,2. *AM 3,2/ AM 3,4/ AM 3,5* água residuária + polpa e casca moída e pré-tratada a severidades entre 3,2 e 3,5. *AML 3,2/ AML 3,4/ AML 3,5* água residuária de café + polpa e casca moída + fração líquida do pré-tratamento a severidades entre 3,2 e 3,5. *N 3,6/ N 3,9/ N 4,2* polpa e casca *in natura* e pré-tratada a severidades entre 3,6 e 4,2. *NL 3,6/ NL 3,9/ NL 4,2* polpa e casca *in natura* + frações líquidas do pré-tratamento a severidades entre 3,6 e 4,2. *AN 3,6/ AN 3,9/ AN 4,2* água residuária + polpa e casca *in natura* e pré-tratada a severidades entre 3,9 e 4,2. *ANL 3,6/ ANL 3,9/ ANL 4,2* água residuária de café + polpa e casca *in natura* + fração líquida do pré-tratamento a severidades entre 3,9 e 4,2.

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

Tabela 5.4: Carboidratos da fase líquida dos reatores em batelada da fermentação de resíduos de café brutos ou pré-tratados.

Reator	Glicose		Xilose		Galactose		Arabinose		Manose		Frutose	
	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F
<i>A</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	52	44	≤ LD	42	≤ LD	≤ LD
<i>M</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	36	≤ LD	44	≤ LD	≤ LD	≤ LD
<i>AM</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	4	4	77	46	79	52	≤ LD	≤ LD
<i>N</i>	27	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	32	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD
<i>AN</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	5	≤ LD	73	58	77	56	5	≤ LD
<i>M 3,2</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	29	29	≤ LD	≤ LD	32	30
<i>L 3,2</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	156	70	75	≤ LD	60	38
<i>ML 3,2</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD
<i>AM 3,2</i>	30	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	30	32	≤ LD	≤ LD	42	36
<i>AML 3,2</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	44	31	≤ LD	≤ LD	78	40
<i>M 3,4</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	36	85	≤ LD	≤ LD	39	127
<i>L 3,4</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	58	80	≤ LD	64	25	33
<i>ML 3,4</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD
<i>AM 3,4</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	50	33	≤ LD	≤ LD	86	35
<i>AML 3,4</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	28	26	≤ LD	≤ LD	34	20
<i>M 3,5</i>	8	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	77	≤ LD	≤ LD	≤ LD	115	≤ LD
<i>L 3,5</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD
<i>ML 3,5</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	20	20	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD
<i>AM 3,5</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	79	33	≤ LD	≤ LD	32	57
<i>AML 3,5</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	27	27	≤ LD	≤ LD	29	33
<i>N 3,6</i>	18	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	26	32	≤ LD	≤ LD	35	50
<i>L 3,6</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	118	137	68	71	≤ LD	≤ LD
<i>NL 3,6</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	205	218	82	84	≤ LD	≤ LD
<i>AN 3,6</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	21	41	≤ LD	≤ LD	≤ LD	69
<i>ANL 3,6</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	22	28	≤ LD	≤ LD	≤ LD	33
<i>N 3,9</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	26	28	≤ LD	≤ LD	29	35
<i>L 3,9</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	171	235	77	86	≤ LD	≤ LD
<i>NL 3,9</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	164	148	74	73	≤ LD	≤ LD
<i>AN 3,9</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	30	25	≤ LD	≤ LD	45	24
<i>ANL 3,9</i>	16	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	30	24	≤ LD	≤ LD	42	23
<i>N 4,2</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	25	30	≤ LD	≤ LD	23	41
<i>L 4,2</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	166	94	76	64	≤ LD	≤ LD
<i>NL 4,2</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	139	223	83	≤ LD	≤ LD	≤ LD
<i>AN 4,2</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	22	27	≤ LD	≤ LD	≤ LD	26
<i>ANL 4,2</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD	22	25	≤ LD	≤ LD	≤ LD	23

I Inicial, *F* Final, *>LD* Inferior ao limite de detecção. *A* água residuária de café, *M* polpa e casca moída, *N* polpa e casca *in natura*, *AM* água residuária + polpa e casca moída, *AN* água residuária + polpa e casca *in natura*. *M 3,2/ M 3,4/ M 3,5* polpa e casca moída e pré-tratada a severidades entre 3,2 e 3,5. *L 3,2/ L 3,4/ L 3,5/ L 3,6/ L 3,9/ L 4,2* frações líquidas do reator hidrotérmico operado a severidades entre 3,2 e 4,2. *ML 3,2/ ML 3,4/ ML 3,5* polpa e casca moída + frações líquidas do pré-tratamento a severidades entre 3,2 e 4,2. *AM 3,2/ AM 3,4/ AM 3,5* água residuária + polpa e casca moída e pré-tratada a severidades entre 3,2 e 3,5. *AML 3,2/ AML 3,4/ AML 3,5* água residuária de café + polpa e casca moída + fração líquida do pré-tratamento a severidades entre 3,2 e 3,5. *N 3,6/ N 3,9/ N 4,2* polpa e casca *in natura* e pré-tratada a severidades entre 3,6 e 4,2. *NL 3,6/ NL 3,9/ NL 4,2* polpa e casca *in natura* + frações líquidas do pré-tratamento a severidades entre 3,6 e 4,2. *AN 3,6/ AN 3,9/ AN 4,2* água residuária + polpa e casca *in natura* e pré-tratada a severidades entre 3,9 e 4,2. *ANL 3,6/ ANL 3,9/ ANL 4,2* água residuária de café + polpa e casca *in natura* + fração líquida do pré-tratamento a severidades entre 3,9 e 4,2.

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

Tabela 5.5: Carboidratos da fase sólida dos reatores em batelada da fermentação de resíduos de café brutos ou pré-tratados.

Reator	Glicana	Xilana	Galactana (%)	Arabinana	Manana
<i>M</i>	0,6	≤ LD	≤ LD	≤ LD	≤ LD
<i>AM</i>	43,1	≤ LD	1,0	1,4	≤ LD
<i>N</i>	2,2	≤ LD	≤ LD	1,7	≤ LD
<i>AN</i>	3,5	3,5	≤ LD	1,1	≤ LD
<i>M 3,2</i>	7,2	6,7	≤ LD	1,5	≤ LD
<i>ML 3,2</i>	11,2	≤ LD	1,0	7,1	≤ LD
<i>AM 3,2</i>	9,0	≤ LD	1,0	1,4	≤ LD
<i>AML 3,2</i>	7,6	3,9	0,7	1,7	≤ LD
<i>M 3,4</i>	7,1	3,9	≤ LD	1,5	3,3
<i>ML 3,4</i>	1,5	≤ LD	≤ LD	0,8	≤ LD
<i>AM 3,4</i>	33,9	≤ LD	1,0	1,3	≤ LD
<i>AML 3,4</i>	6,9	3,9	≤ LD	1,6	≤ LD
<i>M 3,5</i>	18,2	≤ LD	1,1	1,6	≤ LD
<i>ML 3,5</i>	1,5	0,7	≤ LD	1,1	≤ LD
<i>AM 3,5</i>	3,1	1,2	≤ LD	0,9	≤ LD
<i>AML 3,5</i>	10,8	≤ LD	1,1	1,4	≤ LD
<i>N 3,6</i>	13,6	2,2	≤ LD	1,0	≤ LD
<i>NL 3,6</i>	10,7	≤ LD	0,9	3,4	2,1
<i>AN 3,6</i>	11,4	1,1	≤ LD	0,8	≤ LD
<i>ANL 3,6</i>	29,7	≤ LD	≤ LD	0,8	≤ LD
<i>N 3,9</i>	36,5	≤ LD	2,4	≤ LD	≤ LD
<i>NL 3,9</i>	≤ LD	≤ LD	≤ LD	3,6	1,9
<i>AN 3,9</i>	22,7	≤ LD	0,8	0,7	≤ LD
<i>ANL 3,9</i>	15,8	≤ LD	1,7	0,7	2,2
<i>N 4,2</i>	34,9	≤ LD	2,4	≤ LD	3,3
<i>NL 4,2</i>	1,4	≤ LD	≤ LD	4,3	1,9
<i>AN 4,2</i>	38	≤ LD	0,8	≤ LD	≤ LD
<i>ANL 4,2</i>	28,4	≤ LD	1,0	≤ LD	6,5

≤ LD Inferior ao limite de detecção. *A* água residuária de café, *M* polpa e casca moída, *N* polpa e casca *in natura*, *AM* água residuária + polpa e casca moída, *AN* água residuária + polpa e casca *in natura*. *M 3,2/ M 3,4/ M 3,5* polpa e casca moída e pré-tratada a severidades entre 3,2 e 3,5. *L 3,2/ L 3,4/ L 3,5/ L 3,6/ L 3,9/ L 4,2* frações líquidas do reator hidrotérmico operado a severidades entre 3,2 e 4,2. *ML 3,2/ ML 3,4/ ML 3,5* polpa e casca moída + frações líquidas do pré-tratamento a severidades entre 3,2 e 4,2. *AM 3,2/ AM 3,4/ AM 3,5* água residuária + polpa e casca moída e pré-tratada a severidades entre 3,2 e 3,5. *AML 3,2/ AML 3,4/ AML 3,5* água residuária de café + polpa e casca moída + fração líquida do pré-tratamento a severidades entre 3,2 e 3,5. *N 3,6/ N 3,9/ N 4,2* polpa e casca *in natura* e pré-tratada a severidades entre 3,6 e 4,2. *NL 3,6/ NL 3,9/ NL 4,2* polpa e casca *in natura* + frações líquidas do pré-tratamento a severidades entre 3,6 e 4,2. *AN 3,6/ AN 3,9/ AN 4,2* água residuária + polpa e casca *in natura* e pré-tratada a severidades entre 3,9 e 4,2. *ANL 3,6/ ANL 3,9/ ANL 4,2* água residuária de café + polpa e casca *in natura* + fração líquida do pré-tratamento a severidades entre 3,9 e 4,2.

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

Tabela 5.6: Parâmetros físico-químicos dos reatores em batelada da fermentação de resíduos de café brutos ou pré-tratados.

Reator	SST		Fenóis		Furfural	Lignina Klason
	Inicial (mg L ⁻¹)	Final (mg L ⁻¹)	Inicial (mg L ⁻¹)	Final (mg L ⁻¹)	Final (mg L ⁻¹)	Final (%)
A	454	402	38	32	40	-
M	1653	1.811	39	53	45	36
AM	2.076	2.051	67	56	32	29
N	1.889	1.833	34	46	12	38
AN	2.338	2.189	49	62	33	34
<hr/>						
M 3,2	1.296	1.444	17	24	43	31
L 3,2	1.460	1.270	230	209	≤ LD	-
ML 3,2	3.330	3.060	220	213	≤ LD	33
AM 3,2	1.850	2.050	43	47	22	36
AML 3,2	2.168	2.212	99	105	≤ LD	31
<hr/>						
M 3,4	1.888	1.880	22	25	16	31
L 3,4	2.170	2.030	199	203	≤ LD	-
ML 3,4	3.060	3.020	210	185	≤ LD	35
AM 3,4	2.146	2.148	54	51	≤ LD	34
AML 3,4	2.238	2.172	84	85	≤ LD	32
<hr/>						
M 3,5	1.900	1.872	22	33	81	36
L 3,5	1.550	1.520	175	180	≤ LD	-
ML 3,5	3.730	3.240	199	176	≤ LD	34
AM 3,5	2.114	2.140	50	60	≤ LD	31
AML 3,5	2.112	2.118	84	102	≤ LD	32
<hr/>						
N 3,6	1.854	1.814	33	40	69	41
L 3,6	2.170	1.180	268	226	≤ LD	-
NL 3,6	3.070	3.270	260	316	4	26
AN 3,6	2.244	2.506	49	60	40	38
ANL 3,6	2.150	2.220	108	93	39	41
<hr/>						
N 3,9	1.778	1.972	41	49	61	37
L 3,9	1.340	1.160	257	267	26	-
NL 3,9	3.040	2.850	265	318	≤ LD	35
AN 3,9	2.110	2.220	50	67	10	42
ANL 3,9	2.162	2.152	103	176	52	38
<hr/>						
N 4,2	1.884	1.862	52	56	62	39
L 4,2	680	630	153	265	≤ LD	-
NL 4,2	2.640	2.420	300	321	≤ LD	38
AN 4,2	2.276	2.128	82	78	≤ LD	41
ANL 4,2	2.170	2.326	140	130	43	45

ST sólidos suspensos totais, >LD Inferior ao limite de detecção. A água residuária de café, M polpa e casca moída, N polpa e casca *in natura*, AM água residuária + polpa e casca moída, AN água residuária + polpa e casca *in natura*. M 3,2/ M 3,4/ M 3,5 polpa e casca moída e pré-tratada a severidades entre 3,2 e 3,5. L 3,2/ L 3,4/ L 3,5/ L 3,6/ L 3,9/ L 4,2 frações líquidas do reator hidrotérmico operado a severidades entre 3,2 e 4,2. ML 3,2/ ML 3,4/ ML 3,5 polpa e casca moída + frações líquidas do pré-tratamento a severidades entre 3,2 e 4,2. AM 3,2/ AM 3,4/ AM 3,5 água residuária + polpa e casca moída e pré-tratada a severidades entre 3,2 e 3,5. AML 3,2/ AML 3,4/ AML 3,5 água residuária de café + polpa e casca moída + fração líquida do pré-tratamento a severidades entre 3,2 e 3,5. N 3,6/ N 3,9/ N 4,2 polpa e casca *in natura* e pré-tratada a severidades entre 3,6 e 4,2. NL 3,6/ NL 3,9/ NL 4,2 polpa e casca *in natura* + frações líquidas do pré-tratamento a severidades entre 3,6 e 4,2. AN 3,6/ AN 3,9/ AN 4,2 água residuária + polpa e casca *in natura* e pré-tratada a severidades entre 3,9 e 4,2. ANL 3,6/ ANL 3,9/ ANL 4,2 água residuária de café + polpa e casca *in natura* + fração líquida do pré-tratamento a severidades entre 3,9 e 4,2.

Em relação aos resíduos brutos, água residuária (*A*), resíduo polpa e casca moído (*M*) ou in natura (*N*) e co-digestão de ambos (*AM* e *AN*), os maiores valores de *P* de 3,0 e 2,9 mL H₂ e *Rm* de 0,6 e 0,3 mL H₂ h⁻¹ foram observados na fermentação de *AM* e *A*, respectivamente (Tabela 5.3 e Figura 5.5), os quais foram muito semelhantes, por meio do qual, pode-se inferir que a água residuária foi a principal fonte de substrato para a fermentação.

Figura 5.5. Fenol, furfural, lignina e *P* dos reatores em batelada com resíduos de café brutos.

A água residuária de café, *M* polpa e casca moída, *N* polpa e casca in natura, *AM* água residuária + polpa e casca moída, *AN* água residuária + polpa e casca in natura, *P* potencial máximo de produção de H₂.

Observou-se os menores valores de carboidratos dissolvidos e seu consumo na água residuária (*A*), respectivamente de 117 mg L⁻¹ e 4%. A maior solubilidade dos açúcares na água residuária pode ter permitido o crescimento e síntese de enzimas necessárias para reações de produção de H₂, conduzindo aos maiores valores de *P* observados. Este resíduo foi coletado posterior ao despulpamento e desmucilagem dos frutos de café, contendo pectina, açúcares e água, componentes principais da mucilagem (Duarte et al., 2010).

Em contrapartida, quando o resíduo sólido (polpa e casca) foi utilizado individualmente (*M* e *N*), a produção de H₂ foi baixa (*P* de 0,8 e 1,2 mL H₂, respetivamente), pelo qual a mistura com água residuária teve efeito positivo para a fermentação (*P* de 3,0 mL H₂ em *AM* e 2,6 mL H₂

em AN). Maior disponibilidade de carboidratos pode explicar os resultados observados durante a co-digestão, uma vez que estavam presentes tanto na água residuária (2833 mg L⁻¹, Tabela 5.4) quanto no resíduo de polpa e casca (glicana 18,7%, galactana 1%, arabinana 4%, Tabela 5.2), levando a consumo dos mesmos na fase líquida (82% e 65% para AM e AN, respectivamente, Tabela 5.3) e na sólida (inicial e final para AM: 33% e 46% e em AN: 33% e 8%, respectivamente) para a produção de H₂.

Os principais carboidratos consumidos no resíduo de polpa e casca foram glicana (máximo 18% em M), xilana (máximo 8% em M) e arabinana (máximo 1,1% em M, N e AM) e na fase líquida foram a arabinose (máximo em M de 30 mg L⁻¹ para inferior ao limite de detecção) e manose (máximo em M de 44 mg L⁻¹ para inferior ao limite de detecção). Este resultado demonstrou a presença de enzimas celulase, xilanase, arabinase, e manase no consórcio microbiano, que potencializaram a transformação dos diferentes carboidratos em monossacarídeos (Jianzheng Li et al., 2009; Lynd et al., 2002; Van Dyk and Pletschke, 2012), que posteriormente foram utilizados para a produção de H₂.

A produção de H₂ com resíduos de café podem ser comparadas com o estudo de Sugitha et al. (2013), durante a avaliação da produção de CH₄ em reatores em batelada com resíduos de café sem pré-tratamento e microrganismos autóctones em pH 6,3 e 37 °C. Os autores observaram produção de CH₄ de 2,16, 1,24 e 3,65 L CH₄ em reatores alimentados com polpa de café, água residuária e polpa + água residuária, e verificaram efeito positivo da co-digestão de resíduos.

Maior capacidade de adaptação ao resíduo lignocelulósico foi verificada mediante a adição de água residuária, uma vez que para o resíduo de polpa e casca *in natura* (N) observou-se o maior λ de 16,9 h, enquanto para a co-digestão AN e AM foram observados os menores de 6,6 e 10,5 h, respectivamente. Sikora et al. (2013) mencionam que a mistura de ácido láctico e acético com os substratos estimulam a produção de H₂ e altera as rotas de fermentação para a produção de ácido butírico. Tais ácidos orgânicos foram observados na caracterização da água residuária e provavelmente favoreceram o processo fermentativo nessas condições (Tabela 5.1).

A moagem do resíduo de polpa e casca favoreceu a fermentação, uma vez que a diminuição do tamanho da partícula aumentou a área superficial disponível para a ação enzimática. Isto foi evidente diante de maior *Rm* (0,2 mL H₂ h⁻¹) e menor tempo de início da fermentação (λ de 12,5 h) em M, quando comparado com N (0,1 mL H₂ h⁻¹ e 16,9 h,

respectivamente) (Tabela 5.3). Yeh et al. (2010) estudaram o efeito do tamanho da partícula sobre a hidrólise enzimática da celulose de algodão, e verificaram maior velocidade de hidrólise para menor tamanho de partícula. Por exemplo, para tamanho de 25,5 e 0,78 μm obtiveram velocidades de hidrólise de 0,076 e 0,304 $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$, respectivamente. Para isto os autores realizaram ensaios em batelada com tamanhos de partícula entre 25,5 e 0,78 μm , enzima comercial celulase (20 mg) em tampão acetato de sódio, a 40 °C e 400 rpm.

O crescimento dos microrganismos foi avaliado através dos SST (Tabela 5.6), no entanto, não foi possível evidenciar tendência específica de aumento ou diminuição dos mesmos, observando-se valores muito próximos no início e final da fermentação, exceto para *M* (inicial de 1.653 e final de 1.811 mg L^{-1}). Ruggeri et al., (2015) relataram dificuldade para avaliar o crescimento microbiano em reatores anaeróbios com resíduos lignocelulósicos, uma vez que os sólidos referentes ao substrato mascararam o início do crescimento da biomassa.

Verificou-se maior valor inicial de fenóis em *AM* (67 mg L^{-1}), intermediário em *A* (38 mg L^{-1}) e menor em *N* (34 mg L^{-1}). Estes elementos não afetaram negativamente a fermentação, uma vez que para *AM* com máximo valor destes compostos obteve-se maior *P* de 3,0 mL H_2 e menor λ de 10,5 h. Possivelmente os fenóis não influenciaram a produção de H_2 devido as concentrações baixas observadas ($< 67 \text{ mg L}^{-1}$), uma vez que valores de fenóis acima de 1,5 g L^{-1} foram reportadas como inibitórios para as bactérias anaeróbias (Chapleur et al., 2013). Chapleur et al. (2013) operaram reatores em batelada alimentados com celulose (2,7 g L^{-1}) e fenol entre 0 e 4 g L^{-1} , a 35 °C e lodo anaeróbio de digestor de lixo doméstico como inóculo. Os autores observaram ausência da produção de CH_4 a partir de 1,5 g L^{-1} , como consequência da inibição das bactérias fermentativas e arqueais metanogênicas.

Ao final da fermentação, observou-se aumento de fenóis nos reatores *M*, *N* e *AN* (41 ± 7 para $54 \pm 8 \text{ mg L}^{-1}$, Tabela 5.6 e Figura 5.5). Isto foi consequência do processo de hidrólise com solubilização de lignina do resíduo de polpa e casca para a fase líquida. Quando a hemicelulose e celulose são degradadas, ocorre despolimerização da lignina com aumento do conteúdo de elementos fenólicos livres mediante a ruptura das ligações $\beta\text{-O-4}$ (Waldron, 2010). Consequentemente, observou-se aumento da lignina de 19% no resíduo *in natura* para 26% no

final da fermentação (Figura 5.5), confirmando atividade hidrolítica dos microrganismos no resíduo de polpa e casca.

Para os reatores *M* e *AM* verificou-se redução dos fenóis (de 52 ± 20 e final de 44 ± 2 mg L⁻¹), possivelmente decorrente da sua degradação para a produção de H₂ (Equação 5.1), principalmente no reator *A*, no qual o consumo de carboidratos totais dissolvidos foi de apenas 4%.

A reação da equação 5.1 é termodinamicamente desfavorável ($\Delta G^{\circ'} = +5,5$), no entanto, a continuidade do processo pode ter sido favorecida em função da baixa pressão parcial de H₂ (correspondente a produção baixa de no máximo 3,0 mL H₂) e a potencialização da degradação de fenol devido as relações sintróficas de cooperação por consórcio microbiano constituído por bactérias e fungos (Stams, 1994).

Furfural foi analisado nas amostras iniciais e finais de todos os reatores em batelada. No início da fermentação observou-se valores inferiores ao limite de detecção do método, com exceção do reator *A* (44 mg L⁻¹ de furfural). No final da fermentação observou-se valores entre 12 e 45 mg L⁻¹ (Tabela 5.6 e Figura 5.5). A determinação de furfural nos reatores *A*, *M*, *AM*, *N* e *AN* não era esperado, uma vez que o furfural é um produto da degradação de carboidratos, como a xilose, glicose e arabinose durante o pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos a altas temperaturas e pressão (Ahmad et al., 2018a; Behera et al., 2014), e estes reatores foram alimentados com substratos sem pré-tratamento.

Verificou-se concentração de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) inferior ao limite de detecção para todos os reatores em batelada no início e final da fermentação (com exceção de *M*, inicial 0,3 mg L⁻¹ e final inferior ao limite de detecção). Baêta et al. (2018) observaram entre ~ 40 e 600 mg L⁻¹ de 5-HMF durante o pré-tratamento de casca de café por explosão a vapor a severidades entre 1,29 e 4,41. A natureza dos substratos lignocelulósicos ou baixa concentração de 5-HMF podem justificar as diferenças nos resultados do presente estudo quando comparado com a literatura.

5.4.2. Operação dos reatores em batelada com polpa e casca pré-tratada

Para os reatores fermentativos com resíduos de polpa e casca obtidos do reator hidrotérmico (*M 3,2*, *M 3,4*, *M 3,5*, *N 3,6*, *N 3,9* e *N 4,2*, Tabela 5.3 e Figura 5.6), observou-se *Rm* similares (entre 0,1 e 0,2 mL H₂ h⁻¹) exceto para *M 3,5* de 0,4 mL H₂ h⁻¹. Adicionalmente, verificou-se *P* mínima em *N 4,2* (1,0 mL H₂), intermediária em *M 3,2* (1,3 mL H₂) e máximas em *M 3,4* e *M 3,5* (1,9 e 1,8 mL H₂). Para *M 3,5* verificou-se alta *Rm* e *P* com concentrações maiores de arabinose e frutose na fase líquida (77 e 115 mg L⁻¹, respectivamente), facilitando maior consumo de carboidratos de 61% para a produção de H₂ (Tabela 5.3). Similarmente, em *M 3,4* com a maior *P* (1,9 mL H₂) observou-se redução de 12% em glicana, 4% em xilana, 1% em galactana e 4% em arabinana da polpa e casca, enquanto em *N 4,2* com a menor *P* (1,0 mL H₂) obteve-se somente redução de 3% em glicana, 6% em xilana e 1% em arabinana (Tabela 5.5). Assim, em todos os reatores verificou-se diminuição dos carboidratos constitucionais da polpa e casca, que estiveram na faixa de 36% - 48% no início e 15% - 40% no final da fermentação, o que foi consequência da transformação em produtos líquidos e gasosos desde a celulose e hemicelulose.

Figura 5.6. Fenol, furfural, lignina e *P* dos reatores em batelada com polpa e casca pré-tratada.

M 3,2/ *M 3,4*/ *M 3,5* polpa e casca moída e pré-tratada a severidades entre 3,2 e 3,5, *N 3,6*/ *N 3,9*/ *N 4,2* polpa e casca in natura e pré-tratada a severidades entre 3,6 e 4,2, *P* potencial máximo de produção de H₂.

A utilização de resíduo moído e pré-tratado no sistema hidrotérmico proporcionou *P* duas vezes superior (1,8 mL H₂ em *M* 3,5) ao obtido com resíduo bruto (0,8 mL H₂ em *M*). Isto demonstrou os benefícios do pré-tratamento na fermentação, em relação ao material bruto (sem pré-tratamento), disponibilizando mais açúcares, modificando a estrutura da polpa e casca e facilitando a atuação de enzimas hidrolíticas sobre os carboidratos (Ahmad et al., 2018a). Resultados similares foram observados por Ahmand et al. (2018a), com aumento da produção de CH₄ de 148 para 323 mL CH₄ g SVT⁻¹ utilizando bagaço de cana bruto e pré-tratado em sistema hidrotérmico a 180 °C, 12 min e adição de H₂O₂ de 3,36%. Os autores operaram reatores em batelada com bagaço de cana (1 g L⁻¹), a 37 °C, meio sintético Zinder e inóculo de reator UASB para o tratamento de águas residuárias de abatedouro de aves.

Tempo de início da fermentação (λ) entre 11,6 e 22,8 h foram observados em todos os reatores com resíduo de polpa e casca pré-tratado, portanto, o aumento no tempo (de 10 para 30 min) e temperatura (de 160 para 210 °C) do pré-tratamento não afetou o tempo de início da fermentação dos substratos. Ahmad et al. (2018a), verificaram aumento de 0,5 para 88,4 h no tempo de início da produção de metano (λ), a partir de bagaço de cana pré-tratado em reator hidrotérmico nas condições de 160 °C, 5 min e 6% de H₂O₂ (v/v) e 200 °C, 19 min e 2 % de H₂O₂ (v/v), respectivamente. Possivelmente, as condições de pré-tratamento, operação dos reatores e características dos substratos podem ter conduzido a diferenças nos resultados com bagaço de cana de açúcar e resíduos de café.

Observou-se ligeira diminuição dos SST nos reatores *M* 3,4, *M* 3,5, *N* 3,6 e 4,2 diminuíram de 1.881 ± 19 para 1.857 ± 29 mg L⁻¹, possivelmente mediante processos de hidrólise dos sólidos para sua transformação em matéria orgânica dissolvida, correspondentes aos processos de deslignificação dos resíduos de polpa e casca. No entanto, o crescimento celular superou a hidrólise da polpa e casca em *M* 3,2 e *N* 3,9, confirmado pelo aumento dos SST de 1.537 ± 341 para 1.708 ± 373 mg L⁻¹. Não se verificou relação entre os SST e a produção de H₂, uma vez que obteve-se, tanto aumento (inicial e final de 1.778 e 1.972 mg L⁻¹, respectivamente em *N* 4,2), como diminuição dos SST (inicial e final de 1.884 e 1.862 mg L⁻¹, respectivamente em *N* 3,9) em reatores com *P* (1 mL H₂) e *Rm* iguais (0,1 mL H₂ h⁻¹). Este resultado não era esperado, uma vez que segundo Juliastuti et al. (2017) os sólidos totais diminuem como consequência da sua conversão em CH₄, H₂, CO₂ e ácidos orgânicos. Os autores verificaram

diminuição dos ST de 100% para ~ 25% no final do processo biológico, com produção de 44% de CH₄ e ~ 300 ppm de ácido acético, utilizando reatores em batelada com polpa de café pré-tratada (etanol/água 50:50 v/v) e esterco de vaca a 35-45 °C, pH 6,8-7,2 e rumem como inóculo.

Verificou-se baixa concentração inicial de compostos fenólicos em *M* 3,2 (17 mg L⁻¹) e aumento proporcional a partir da severidade do pré-tratamento cujo valor máximo foi observado em *N* 4,2 (52 mg L⁻¹), com aumento da concentração de fenóis ao final da fermentação de 31 ± 13 para 38 ± 13 mg L⁻¹ em todos os reatores com polpa e casca pré-tratada (*M* 3,2, *M* 3,4., *M* 3,5, *N* 3,6, *N* 3,9 e *N* 4,2). Não se verificou relação entre os compostos fenólicos e a produção de H₂, uma vez que para reatores com baixa (17 mg L⁻¹ em *M* 3,2) e alta concentração inicial de fenóis (33 mg L⁻¹ em *N* 3,6) obteve-se *P* (1,3 e 1,2 mL de H₂ em *M* 3,2 e *N* 3,6, respectivamente) e *Rm* semelhantes (0,2 e 0,1 mL H₂ h⁻¹ em *M* 3,2 e *N* 3,6, respectivamente). Não se observou efeito dos compostos fenólicos na produção de H₂ devido as concentrações baixas iniciais de fenóis (entre 17 e 52 mg L⁻¹), uma vez que o efeito deletério destes compostos na fermentação pode ser observada a partir de concentrações >1.000 mg L⁻¹ (Tai et al., 2010). Tai et al. (2010) avaliaram a concentração de fenois iniciais entre 200 e 1.500 mg L⁻¹, verificando produção de H₂ de 1,4 mol H₂ mol glicose⁻¹ para fenol entre 0 e 400 mg L⁻¹, e diminuição para valores inferiores a 0,6 mol H₂ mol glicose⁻¹ para fenol entre 1.000 e 1.500 mg L⁻¹. Os autores operaram reatores em batelada com meio sintético contendo glicose (5 g L⁻¹) a 37 °C, pH 6,5 e cultura pura de *Clostridium butyricum*.

Observou-se furfural inferior ao limite de detecção no início e entre 16 e 81 mg L⁻¹ no final da fermentação para os reatores com resíduo de polpa e casca pré-tratado (reatores *M* 3,2, *M* 3,4, *M* 3,5, *N* 3,6, *N* 3,9 e *N* 4,2, Tabela 5.6 e Figura 5.6), observando valores similares para resíduos *in natura* (69 mg L⁻¹ em *N* 3,6) e moído (81 mg L⁻¹ em *M* 3,5). Não se verificou efeito negativo do furfural, uma vez que obteve-se *P* de 1,8 mL H₂ em reatores com menor (16 mg L⁻¹ em *M* 3,4) e maior concentração de furfural (81 mg L⁻¹ em *M* 3,5). Provavelmente, a concentração de furfural foi baixa para afetar a fermentação. Por exemplo, González et al. (2014) observaram produção de CH₄ de 214 e 253 mL CH₄ g⁻¹ SV⁻¹ a ~300 e 1.210 mg L⁻¹ de furfural, respectivamente. Os autores concluíram que as concentrações deste composto não causaram

inibição aos microrganismos. Para isto, operaram reatores em batelada com bagaço de cana de açúcar pré-tratado em reator hidrotérmico (severidade de 3,6 e 4,35) a 37 °C, pH 7,3 – 7,8 e inóculo de lodo anaeróbio de planta de tratamento de esterco suíno.

Em relação à lignina para os reatores *M 3,2*, *M 3,4*, *M 3,5*, *N 3,6*, *N 3,9* e *N 4,2*, observou-se entre 25 e 37% no início e entre 31 e 41% no final da fermentação (Tabela 5.6 e Figura 5.4). Não se verificou diferenças no aumento da lignina Klason com a alimentação dos reatores com resíduo *in natura* ou moído, uma vez que observou-se aumento da lignina de ~ 4% para *M 3,5* (de 26 para 31%) e *N 4,2* (de 36 para 39%). Este resultado não era esperado, uma vez que como observado com os resíduos brutos, inferior tamanho de partícula possibilita aumento da hidrólise enzimática (Yeh et al., 2010).

Observou-se relação entre a produção de H₂ e a lignina Klason da polpa e casca, uma vez que obteve-se alto *P* com menores teores iniciais de lignina (1,9 mL H₂ e 26%, respectivamente em *M 3,4*) e baixas *P* com maiores teores de lignina (1,0 mL H₂ e 36%, respectivamente, em *N 4,2*). Este resultado foi diferente de Ahring et al. (2015) durante a produção de CH₄ em reatores de mistura completa com esterco pré-tratado mediante explosão úmida (170 °C, 25 min, 4 bar de O₂) a 55 °C, pH 7,7 e inóculo de lodo de digestor anaeróbio com esterco. Os autores verificaram maior produção de CH₄ com superior teor de lignina, sendo de 70 e 310 L CH₄ kg SV⁻¹ d⁻¹ com lignina 74% e 82%, respectivamente. Substratos ricos em lignina são altamente recalcitrantes e possuem baixa degradabilidade anaeróbia (Ahring et al., 2015). Desta forma, diferenças nos resultados podem estar associadas as condições de pré-tratamento dos resíduos.

5.4.3. Operação dos reatores em batelada com frações líquidas do reator hidrotérmico

Durante a fermentação das frações líquidas obtidas do pré-tratamento da casca e polpa (*L 3,2*, *L 3,4*, *L 3,5*, *L 3,6*, *L 3,9* e *L 4,2*, Tabela 5.3 e Figura 5.7) verificou-se aumento do *P* com a concentração inicial de carboidratos dissolvidos, sendo de 1,6 e 2,3 mL H₂ para 509 e 838 mg L⁻¹ de carboidratos, respectivamente. Os carboidratos observados foram arabinose, manose e frutose, com maior concentração para severidade de pré-tratamento entre 3,9 e 4,2 (de 76 a 171 mg L⁻¹). Este resultado foi similar ao observado por Muri et al. (2016) durante a operação de reatores em batelada alimentados com mono (frutose, galactose, glicose, ribose e xilose) e dissacarídeos (lactose e sacarose) a 37 °C, pH 5,7 e inóculo de lodo de estação de tratamento de águas

residuais municipais. Os autores observaram aumento da produção de H_2 de 0,4 para 1,4 mol H_2 mol $glicose^{-1}$ com o aumento nos carboidratos de 1 para 5 g L^{-1} , respectivamente.

A maior velocidade de produção de H_2 foi observada em frações líquidas do pré-tratamento de polpa e casca a baixa severidade ($L 3,2$ com 0,7 mL $H_2 h^{-1}$) e a mínima a alta severidade ($L 3,6$ em 0,7 mL $H_2 h^{-1}$). Resultados similares foram observados por Ahmad et al. (2018b) durante a produção de CH_4 com bagaço de cana pré-tratado em reator hidrotérmico, obtendo velocidade de 0,12 e 0,04 mmol $CH_4 g SVT^{-1} h^{-1}$ para pré-tratamento a baixa (160 °C, 19 min, 6% H_2O_2 % v/v) e alta severidade (214 °C, 12 min, 12% H_2O_2 % v/v), respectivamente. Inferiores severidades de pré-tratamento permitem maiores velocidades de produção de biogás devido a baixa produção de compostos inibidores do processo biológicos (Ahmad et al., 2018b).

Figura 5.7. Fenol, furfural, lignina e P dos reatores em batelada com frações líquidas do reator hidrotérmico.

$L 3,2/L 3,4/L 3,5/L 3,6/L 3,9/L 4,2$ frações líquidas do reator hidrotérmico operado a severidades entre 3,2 e 4,2, P potencial máximo de produção de H_2 .

Os SST diminuíram para o final da fermentação em todos os reatores com fração líquida do hidrotérmico, de 1.562 ± 532 para 1.298 ± 325 mg L^{-1} (reatores $L 3,2$, $L 3,4$, $L 3,5$, $L 3,6$, $L 3,9$ e $L 4,2$, Tabela 5.6), não sendo observada relação com a produção de H_2 , uma vez que obteve-se P de 1,7 mL H_2 para reatores com alta (de 1460 para 1270 mg L^{-1} em $L 3,2$) e baixa redução de

SST (de 1.550 para 1.520 mg L⁻¹ em *L 3,5*). Como verificado com os resíduos brutos, a diminuição dos sólidos é consequência da transformação em produtos gasosos e líquidos (Sugitha et al., 2013). Sendo assim, os SST dos reatores com fração líquida do hidrotérmico foram hidrolisados para a produção de ácidos orgânicos e álcoois.

Não verificou-se aumentos dos fenóis iniciais com a severidade do pré-tratamento para os reatores com a fração líquida do hidrotérmico (*L 3,2*, *L 3,4*, *L 3,5*, *L 3,6*, *L 3,9* e *L 4,2*, Tabela 5.6 e Figura 5.7), sendo observado 230 mg L⁻¹ para severidade 3,2 e 153 mg L⁻¹ a severidade 4,2. Esses valores foram maiores em relação aqueles observados para resíduo sem pré-tratamento (entre 34 e 67 mg L⁻¹, reatores *A*, *M*, *AM*, *N* e *AN*) ou polpa e casca pré-tratada (entre 17 e 52 mg L⁻¹, reatores *M 3,2*, *M 3,4*, *M 3,5*, *N 3,6*, *N 3,9* e *N 4,2*), devido a composição das frações líquidas do sistema hidrotérmico com altas concentrações de fenóis entre 598 e 2.032 mg L⁻¹ (Figura 5.2). Não verificou-se relação entre o fenol e o *P*, uma vez que observou-se produções de H₂ maiores (2,3 mL H₂ em *L 3,6*) e menores (1,6 mL H₂ em *L 3,2*) para concentração de fenol de 249 ± 27 mg L⁻¹. No entanto, altas concentrações de compostos fenólicos aumentaram o tempo de início da fermentação, com λ de 13,4 e 74,5 h para concentrações de fenol de 199 (*L 3,4*) e 268 mg L⁻¹ (*L 3,6*), respectivamente. Cao et al. (2010) avaliou o efeito da concentração de compostos fenólicos como siringaldeído sobre a produção de H₂, observando aumento do tempo de início da fermentação de ~2,5 para ~ 20 h com 0,06 e 0,35 g L⁻¹ de siringaldeído, respectivamente. Os autores reportaram que mesmo em concentrações baixas, os compostos fenólicos considerados não inibitórios, tem efeito sinérgico com outros inibidores como furfural e pode potencializar a toxicidade dos fenóis. Para isto os autores operaram reatores em batelada com hidrolisado do pré-tratamento ácido de palha de milho e *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16 em pH 7,0 e 60 °C.

Outro inibidor como o furfural não foi observado (inferior ao limite de detecção) durante a fermentação com frações líquidas do hidrotérmico (*L 3,2*, *L 3,4*, *L 3,5*, *L 3,6*, *L 3,9* e *L 4,2*), exceto para *L 3,9* com 26 mg L⁻¹ no final da fermentação (Tabela 5.6 e Figura 5.7), desta forma, não foi possível relacionar este composto com a produção de H₂. As frações líquidas podem não ser tão interessantes para a produção de H₂, uma vez que a maioria do material de interesse (a celulose) está presente na polpa e casca de café. Embora, com o objetivo de aproveitar todos os

açúcares fermentáveis disponíveis, a mistura de frações líquidas com polpa e casca pré-tratada poderia aumentar a quantidade de substratos disponíveis para o consórcio microbiano.

5.4.4. Operação dos reatores em batelada com polpa e casca pré-tratada e frações líquidas do reator hidrotérmico

Para os reatores contendo ambos os materiais recuperados do sistema hidrotérmico (fração líquida e polpa e casca pré-tratada, reatores *ML 3,2*, *ML 3,4*, *ML 3,5*, *NL 3,6*, *NL 3,9* e *NL 4,2*) observou-se maiores *P* (2,3 mL H₂ para *ML 3,2* e *ML 3,4*) e *R_m* (0,3 mL H₂ h⁻¹ para *ML 3,2* e *ML 3,6*) em baixas severidades de pré-tratamento (Tabela 5.3 e Figura 5.8). Por outro lado, na maioria dos casos o *P* foi maior para a co-digestão (entre 1,8 e 2,3 mL H₂, reatores *ML 3,2*, *ML 3,4*, *ML 3,5*, *NL 3,6*, *NL 3,9* e *NL 4,2*) quando comparado com resíduos individuais, seja fração líquida (entre 1,4 e 2,3 mL H₂, reatores *L 3,2*, *L 3,4*, *L 3,5*, *L 3,6*, *L 3,9* e *L 4,2*) ou polpa e casca pré-tratados (entre 1,0 e 1,9 mL H₂, reatores *M 3,2*, *M 3,4*, *M 3,5*, *N 3,6*, *N 3,9* e *N 4,2*). Isto foi consequência da maior concentração inicial de carboidratos dissolvidos (entre 546 e 819 mg L⁻¹) e consumo dos mesmos (entre 9 e 53%). Para alguns dos reatores com co-digestão das frações do sistema hidrotérmico não foi observado carboidratos durante a especiação dos mesmos (*ML 3,2*, *ML 3,4* e *ML 3,5*), ainda diante de evidências da presença de carboidratos totais, pelo qual, maiores esforços para aprimorar esta metodologia devem ser realizados.

Em relação aos carboidratos da polpa e casca (Tabela 5.5), obteve-se a alta redução para *NL 4,2* (glicana 36%, xilana 6% e galactana 1% e manana 1%) com produção inferior de H₂ (1,8 mL H₂), possivelmente devido a utilização para a produção de metabólitos solúveis como etanol (34%), ácido propiônico (7%) e butírico (16%).

Observou-se aumento dos SST somente no reator *NL 3,6* (inicial 3070 e final 3270 mg L⁻¹, Tabela 5.6 e Figura 5.7). Nos outros reatores (*ML 3,2*, *ML 3,4*, *ML 3,5*, *NL 3,9* e *NL 4,2*), observou-se predominância da hidrólise de material lignocelulósico sobre crescimento celular, com diminuição dos SST de 3.160 ± 403 para 2.918 ± 311 mg L⁻¹, como explicado por Juliastuti et al. (2017), devido a sua transformação e compostos gasosos (H₂ e CH₄) ou solúveis (ácidos orgânicos e álcoois).

Figura 5.8. Fenol, furfural, lignina e *P* dos reatores em batelada com polpa e casca pré-tratada e frações líquidas do reator hidrotérmico.

ML 3,2/ ML 3,4/ ML 3,5 polpa e casca moída + frações líquidas do pré-tratamento a severidades entre 3,2 e 4,2, NL 3,6/ NL 3,9/ NL 4,2 polpa e casca in natura + frações líquidas do pré-tratamento a severidades entre 3,6 e 4,2, *P* potencial máximo de produção de H₂.

Verificou-se acúmulo de fenol inicial a partir da mistura das frações do reator hidrotérmico, sendo de $31 \pm 13 \text{ mg L}^{-1}$ para polpa e casca pré-tratada (reatores *M* 3,2, *M* 3,4, *M* 3,5, *N* 3,6, *N* 3,9 e *N* 4,2, Tabela 5.6), $214 \pm 46 \text{ mg L}^{-1}$ para fração líquida (reatores *L* 3,2, *L* 3,4, *L* 3,5, *L* 3,6, *L* 3,9 e *L* 4,2) e $242 \pm 39 \text{ mg L}^{-1}$ da co-digestão de ambos (reatores *ML* 3,2, *ML* 3,4, *ML* 3,5, *NL* 3,6, *NL* 3,9 e *NL* 4,2), correspondente ao aumento de fontes destes compostos. Similarmente, verificou-se aumentou com a severidade de pré-tratamento, sendo de 220 mg L^{-1} para *ML* 3,2 e 300 mg L^{-1} para *NL* 4,2. No entanto, maior concentração de fenóis não exerceu efeito inibitório sobre a fermentação, uma vez que o tempo de início observado foi entre 9,4 e 53,4 h, igual ou menor ao observado com somente um substrato, sendo entre 11,6 e 22,8 h para casca e polpa pré-tratada (reatores *M* 3,2, *M* 3,4, *M* 3,5, *N* 3,6, *N* 3,9 e *N* 4,2) e entre 13,4 e 74,5 h para frações líquidas (reatores *L* 3,2, *L* 3,4, *L* 3,5, *L* 3,6, *L* 3,9 e *L* 4,2).

Hernandez e Edyvean (2008) reportaram que a polaridade, nível de auto-oxidação, tipo e número de substituições dos compostos fenólicos estão relacionados com a sua degradabilidade, verificando 21%, 35%, 31% e 31% de degradabilidade para fenol, catecol, tirosol e ácido cafeico, respectivamente. Estes testes de degradabilidade (APHA/AWWA/WEF, 2012) foram realizados

com 1 mg L^{-1} de cada composto fenólico a 35°C e pH 6,6. Neste contexto, o λ no presente estudo pode estar relacionado ao tipo de compostos fenólicos e não a sua concentração nos reatores.

Observou-se redução na concentração de fenol nos reatores *ML 3,2*, *ML 3,4*, *ML 3,5* de 210 ± 10 para $191 \pm 19 \text{ mg L}^{-1}$ no final da fermentação (Tabela 5.6 e Figura 5.8), possivelmente foi usado para a produção de H_2 (Equação 5.1), explicando valores maiores de P , entre 2,2 e 2,3 mL H_2 observados nestes reatores. Como citado anteriormente, microrganismos como *Clostridium butyricum* produzem H_2 a partir de fenol (Tai et al., 2010), bactéria com morfologia similar ao observado no consórcio microbiano (Figura 5.1).

A lignina da polpa e casca não foi relacionada com a produção de H_2 , uma vez que obteve-se a mesmo P de 2,3 mL H_2 para menores (26% em *ML 3,4*) e maiores teores de lignina (37% em *NL 3,6*, Tabela 5.6 e Figura 5.8). Inferiores concentrações de lignina nos resíduos lignocelulósicos estão associadas a maior produção de biogás, devido ao aumento na acessibilidade à celulose e hemicelulose (Ahmad et al., 2018b). Por exemplo, Ahmad et al. (2018b) obtiveram produção de CH_4 de 293 e 125 mL g SVT^{-1} com lignina Klason de 9,6% e 23,2%, respectivamente durante a operação de reatores em batelada com bagaço de cana pré-tratado em sistema hidrotérmico ($160 - 200^\circ\text{C}$, 5 – 19 min e 2 – 6% v/v de H_2O_2).

Furfural foi observado somente em *NL 3,6* em concentrações muito baixas (4 mg L^{-1} , Tabela 5.6 e Figura 5.8), pelo qual, não foi fonte importante de inibidores a ser discutida.

5.4.5. Operação dos reatores em batelada com polpa e casca pré-tratada e água residuária

Para os reatores com co-digestão de resíduo sólido pré-tratado e água residuária (*AM 3,2*, *AM 3,4*, *AM 3,5*, *AN 3,6*, *AN 3,9* e *AN 4,2*, Tabela 5.3 e Figura 5.9) observou-se maior concentração inicial de carboidratos dissolvidos (entre 185 e 515 mg L^{-1} , Tabela 5.4) quando comparado com reatores contendo somente de resíduo de polpa e casca pré-tratado (entre 181 e 275 mg L^{-1}). Elevada disponibilidade de carboidratos pode ter contribuído para a obtenção das maiores P (entre 2,7 e 8,0 mL H_2) e R_m (entre 0,3 e 0,8 mL $\text{H}_2 \text{ h}^{-1}$) de todas as condições selecionadas. Muri et al. (2016), observaram para substratos como mono e dissacarídeos, maior produção de H_2 , com rendimento de $4 - 2 \text{ mol H}_2 \text{ mol hexose}^{-1}$ a partir de hexoses e de $3,33 - 1,67$

mol H₂ mol pentose⁻¹ a partir de pentoses. A presença dos mencionados açúcares simples foi verificada mediante a identificação de carboidratos nos reatores, observando 47 ± 23 mg L⁻¹ de hexoses (glicose e frutose) e 39 ± 8 mg L⁻¹ de pentoses (arabinose) no início da fermentação.

Figura 5.9. Fenol, furfural, lignina e *P* dos reatores em batelada com polpa e casca pré-tratada e água residuária.

AM 3,2/ AM 3,4/ AM 3,5 água residuária + polpa e casca moída e pré-tratada a severidades entre 3,2 e 3,5, AN 3,6/ AN 3,9/ AN 4,2 água residuária + polpa e casca in natura e pré-tratada a severidades entre 3,9 e 4,2, *P* potencial máximo de produção de H₂.

Por meio da aplicação da polpa e casca observou-se a disponibilização de açúcares poliméricos no início da fermentação, como glicana ($27 \pm 9\%$), xilana ($7 \pm 1\%$), galactana ($1 \pm 0,1\%$), arabinana ($4 \pm 2\%$), e manana ($3 \pm 1\%$), os quais diminuíram ao final do processo de produção de H₂, como consequência da sua hidrólise (glicana ~20%, xilana 0,4%, galactana 0,6%, arabinana 0,9% e manana inferior ao limite de detecção). Verificou-se maior redução da hemicelulose (redução de ~13% para xilana + galactana + arabinana + manana) quando comparado com a celulose (glicana ~ 7%). Este resultado foi consequência da inferior acessibilidade a celulose, uma vez que a lignina e hemicelulose são barreiras físicas para ação das celulasas (Malgas et al., 2015). No entanto, este resultado difere do obtido por Sugitha et al. (2013) durante a produção de CH₄ em reatores em batelada com resíduos de café, observando maior redução de celulose (20%) e menor de hemicelulose (8%) em reatores com polpa + água

residuária. Origem dos substratos, pré-tratamento dos resíduos e condições de operação dos reatores podem ter conduzido as diferenças observadas entre os resultados dessa pesquisa e aqueles de Sugitha et al. (2013).

Maior consumo de carboidratos na polpa e casca (30%) foi observado no reator *AM 3,5*, reduzindo um 20% a glicana, 6% a xilana, 1% a galactana, 3% a arabinana e 3% a manana, o qual explica que a alta produção de H_2 observada neste reator (8 mL H_2) foi consequência da hidrólise e fermentação dos carboidratos encontrados neste resíduo.

Observou-se λ menor em reatores com resíduo de polpa e casca moída ($14,1 \pm 2$ h nos reatores *AM 3,2*, *AM 3,4* e *AM 3,5*, Tabela 5.3) quando comparado com *in natura* ($20,5 \pm 4$ h nos reatores *AN 3,6*, *NA 3,9* e *NA 4,2*). Este resultado foi consequência da redução no tamanho do resíduo lignocelulósico, o qual aumenta a afinidade entre a celulose e as enzimas, e consequentemente, a adaptação dos microrganismos aos substratos (Yeh et al., 2010).

Observou-se *Rm* 5 vezes maior nos reatores com adição de água residuária ($0,6 \pm 0,2$ mL H_2 h⁻¹, reatores *AM 3,2*, *AM 3,4*, *AM 3,5*, *AN 3,6*, *AN 3,9* e *AN 4,2*) quando comparado com resíduo de polpa e casca pré-tratado individual ($0,2 \pm 0,1$ mL H_2 h⁻¹, reatores *M 3,2*, *M 3,4*, *M 3,5*, *N 3,6*, *N 3,9* e *N 4,2*), possivelmente pelo aumento de compostos adequados para a fermentação, como carboidratos dissolvidos de 229 ± 37 mg L⁻¹ (reatores *M 3,2* – *3,5*/*N 3,6* – *4,2*) para 385 ± 110 mg L⁻¹ (reatores *AM 3,2* – *3,5*/*AN 3,6* – *4,2*). Como discutido com os reatores alimentados com resíduos brutos, novamente foi verificado efeito positivo da co-digestão de resíduos de café sobre a produção de H_2 .

Observou-se aumento nos SST em 4 dos 6 sistemas com resíduo de polpa e casca pré-tratado e água residuária (inicial 1.080 ± 151 e final 2.229 ± 160 mg L⁻¹, reatores *AM 3,2*, *AM 3,5*, *AN 3,6* e *AN 3,9*, Tabela 5.6 e Figura 5.9). Enquanto, Sugitha et al. (2013) verificaram redução dos sólidos totais de 13,8% durante a co-digestão de polpa e água residuária de café, consequência da hidrólise da celulose e hemicelulose na polpa (redução de 20,7% e 16,8%, respectivamente). Portanto, a redução nos SST na presente pesquisa pode significar que o crescimento celular sobrepôs à hidrólise do resíduo de polpa e casca.

Não se verificou relação entre os compostos fenólicos e a produção de H_2 , uma vez que observou-se aumento de 50 para 60 mg L^{-1} de fenóis do início ao final da fermentação, em reatores com P maior (8 mL H_2 em *AM 3,5*) e menor (4,9 mL H_2 em *NA 3,6*). Desta forma, os fenóis não foram utilizados como substrato para a produção de H_2 . Na pesquisa de Chapleur et al. (2013) com reatores em batelada alimentados com celulose (2,7 g L^{-1}) e fenol entre 0 e 1 g L^{-1} , os autores obtiveram ~ 85 mg CH_4 em todos as concentrações de fenol, verificando que a produção de CH_4 se dividiu em 2 etapas: i) degradação de celulose e ii) degradação do fenol (após 40 d de incubação). Segundo esta informação, provavelmente, ocorreu degradação preferencial de carboidratos nos sistemas alimentados com água residuária + polpa e casca pré-tratada.

Observou-se P de 8 e 2,7 mL H_2 com menor (25% em *AM 3,5*) e maior (37% em *AN 3,9*) teor de lignina na polpa e casca. Como inferido com os reatores alimentados somente com polpa e casca (*M 3,2*, *M 3,4*, *M 3,5*, *N 3,6*, *N 3,9* e *N 4,2*), a lignina limitou a transformação da celulose e hemicelulose em biogás (Malgas et al., 2015), verificando-se relação inversa entre o teor de lignina no resíduo lignocelulósico e a produção de H_2 .

Não foi verificado efeito do furfural sobre a produção de H_2 , obtendo-se P de 5 mL H_2 para 40 mg L^{-1} de furfural (*AN 3,6*) ou inferiores ao limite de detecção (*AM 3,4*). Resultados similares foram observados por Badshah et al. (2012), com produção de CH_4 de 352, 345, 338 mL CH_4 g SV^{-1} e furfural de 0, 1 e 4 g L^{-1} , respectivamente. Desta forma, os autores reportaram a ausência de efeito deletério destes compostos sobre a produção de biogás ao operar reatores em batelada com celulose (12 g L^{-1}) e furfural (0 – 5 g L^{-1}), a 37 °C e lodo anaeróbio de estação de tratamento de água residuária.

5.4.6. Operação dos reatores em batelada com água residuária, polpa e casca pré-tratada e frações líquidas do reator hidrotérmico

Utilizando-se três substratos como água residuária, polpa e casca pré-tratada e fração líquida do reator hidrotérmico (*AML 3,2*, *AML 3,4*, *AML 3,5*, *ANL 3,6*, *ANL 3,9* e *ANL 4,2*, Tabela 5.3 e Figura 5.10), os maiores valores de P e R_m foram observados para reatores com resíduo de polpa e casca moído ($3,8 \pm 0,9$ mL H_2 e $0,5 \pm 0,1$ mL H_2 h^{-1} , respectivamente, reatores *AML 3,2*, *AML 3,4* e *AML 3,5*) e os menores com resíduo *in natura* ($3,5 \pm 0,3$ mL H_2 e 0,3 mL H_2 h^{-1} , respectivamente, reatores *ANL 3,6*, *ANL 3,9* e *ANL 4,2*). O efeito do tamanho da palha de

arroz foi avaliado por Chen et al. (2012), observando rendimento H_2 de 2 e 6,4 mL H_2 g ST^{-1} para tamanhos de partícula > 10 e $< 0,3$ mm, respectivamente. Isto ocorre devido ao aumento da disponibilidade de substrato para a hidrólise e fermentação. Os autores operaram reatores em batelada a 55 °C, pH 6,5, 30 g L^{-1} de substrato e lodo de estação municipal de tratamento de água residuária.

Figura 5.10. Fenol, furfural, lignina e P dos reatores em batelada com água residuária, polpa e casca pré-tratada e frações líquidas do reator hidrotérmico.

AML 3,2/ AML 3,4/ AML 3,5 água residuária de café + polpa e casca moída + fração líquida do pré-tratamento a severidades entre 3,2 e 3,5, ANL 3,6/ ANL 3,9/ ANL 4,2 água residuária de café + polpa e casca in natura + fração líquida do pré-tratamento a severidades entre 3,9 e 4,2, P potencial máximo de produção de H_2 .

O tempo de início da fermentação foi similar (18 ± 3 h) em todos os reatores alimentados com água residuária + polpa e casca + fração líquida do hidrotérmico (AML 3,2, AML 3,4, AML 3,5, ANL 3,6, ANL 3,9 e ANL 4,2). Como discutido anteriormente, este resultado não era esperado, uma vez que Ahmad et al. (2018a) reportaram maior tempo de início da produção de CH_4 com o aumento da severidade, devido a produção de compostos inibitórios. Portanto, foi possível inferir ausência de efeito deletério dos compostos inibitórios produzidos nas diferentes severidades de pré-tratamento em reatores alimentados com os 3 resíduos de café.

A redução de carboidratos dissolvidos não foi relacionada com a produção de H_2 , verificando-se 40% de redução para P maior (4,7 mL H_2 em AML 3,4) e menor (2,9 mL H_2 em

AML 3,2). Os principais carboidratos observados foram glicose, arabinose e frutose, diminuindo do início (3 ± 7 , 29 ± 8 , e 31 ± 29 mg L⁻¹, respectivamente) para o final da fermentação (inferior ao limite de detecção, 27 ± 2 , e 29 ± 8 mg L⁻¹, respectivamente). Estes resultados são similares aos observados por Sugitha et al. (2013); ou seja, a mesma redução de 12% de açúcares redutores para produção de 2,16 e 3,65 L de CH₄ em reatores com polpa de café e polpa + água residuária, respectivamente. Valores mais elevados de transformação de compostos fermentáveis com polpa + água residuária (21% de redução de celulose) favoreceram produção de CH₄ mais alta, quando comparado com o reator contendo somente polpa de café (14% de redução de celulose).

Redução similar de 22% de carboidratos foi observada para polpa e casca em reatores com maior (4,7 mL H₂ em AML 3,4) e menor produção de H₂ (3,8 mL H₂ em ANL 3,9). Para a celulose e hemicelulose observou-se $10,2 \pm 5,3\%$ (de $27 \pm 8,6\%$ para $8,5 \pm 2,1\%$) e $11 \pm 1,2\%$ (de $11,7 \pm 2,7\%$ para $4,5 \pm 1,5\%$) de redução, respectivamente. Por outro lado, Sugitha et al. (2013) observaram, maiores reduções de celulose associadas a maior produção de biogás. Portanto, a análise da transformação de outros compostos presentes nos reatores (como fenóis) em H₂, ou a síntese de ácidos orgânicos e álcoois podem ter influenciado este resultado.

O *P* e *Rm* da co-digestão de polpa e casca pré-tratada com água residuária ($4,7 \pm 1,9$ mL H₂ e $0,6 \pm 0,2$ mL H₂ L⁻¹, respectivamente, reatores AM 3,2, AM 3,4, AM 3,5, AN 3,6, AN 3,9 e AN 4,2, Tabela 5.3 e Figura 5.10) foi maior quando comparado com 3 resíduos ($3,6 \pm 0,6$ mL H₂ e $0,4 \pm 0,1$ mL H₂ L⁻¹, respectivamente, reatores AML 3,2, AML 3,4, AML 3,5, ANL 3,6, ANL 3,9 e ANL 4,2). Como inferido em reatores L 3,2 – L 4,2, alta concentração de fenóis nas frações líquidas do sistema hidrotérmico, podem ter prejudicado a produção de H₂ nos reatores contendo 3 resíduos de café.

A produção de H₂ não foi relacionada com os SST, uma vez que observou-se *P* de 3,8 mL H₂ em reatores com aumento (de 2.112 para 2.118 mg L⁻¹ em AML 3,5) e redução dos SST (de 2.162 para 2.152 mg L⁻¹ em ANL 3,9). Como discutido para as condições dos reatores AM 3,2 – 3,5/AN 3,6 – 4,2, os processos de crescimento celular e hidrólise da lignocelulose afetam o conteúdo de SST, não sendo possível relacionar este parâmetro com a produção de H₂ nos reatores com os 3 resíduos de café.

Em relação aos fenóis, não verificou-se efeito da concentração inicial de compostos fenólicos na produção de H₂, uma vez que obteve-se *P* de ~ 3,6 mL H₂ com menores (84 mg L⁻¹

em *AML 3,5*) e maiores concentrações de fenóis (140 mg L^{-1} em *ANL 4,2*). Novamente, pode ser inferido que os fenóis não afetaram a produção de H_2 nos reatores *AML 3,2 – 3,5/ANL 3,6 – 4,2* devido as baixas contrações observadas nos reatores ($< 140 \text{ mg L}^{-1}$).

O conteúdo inicial de fenóis foi superior nos reatores com 3 substratos ($103 \pm 21 \text{ mg L}^{-1}$, reatores *AML 3,2*, *AML 3,4*, *AML 3,5*, *ANL 3,6*, *ANL 3,9* e *ANL 4,2* Tabela 5.6 e Figura 5.10) quando comparados com a mistura de polpa e casca pré-tratada com água residuária ($55 \pm 14 \text{ mg L}^{-1}$, reatores *AM 3,2*, *AM 3,4*, *AM 3,5*, *AN 3,6*, *AN 3,9* e *AN 4,2*). Os fenóis podem ser oriundos dos mesmos resíduos do processamento do café na forma de ácido clorogênico, caféico, taninos, entre outros (Bonilla, 2014). Como a polpa e casca também contém fenóis, as concentrações foram superiores quando eram misturados vários resíduos de café.

No final da fermentação foi verificado aumento da concentração dos fenóis na maioria dos reatores (inicial 93 ± 10 e final $117 \pm 40 \text{ mg L}^{-1}$ nos reatores *AML 3,2*, *AML 3,4*, *AML 3,5*, e *ANL 3,9*, Tabela 5.6 e Figura 5.9). Este resultado pode ser explicado porque em reatores contendo carboidratos e fenol, ocorre degradação preferencial dos carboidratos (Chapleur et al., 2013). Deste modo, os fenóis podem ter aumentado devido a hidrólise da lignocelulose (Chapleur et al., 2013; Waldron, 2010).

A lignina não afetou a produção de H_2 , observando-se P de $3,8 \text{ mL H}_2$ em reatores com polpa e casca com maior (37% em *ANL 3,9*) e menor teor de lignina (25% em *AML 3,5*). Este resultado não era esperado, uma vez que como discutido anteriormente, a lignina dificulta a transformação de celulose e hemicelulose em biogás (Ahmad et al., 2018b). Diferenças operacionais quando comparado com outras pesquisas devem ser consideradas, como são o efeito da co-digestão, consórcio microbiano, ou pré-tratamento dos substratos.

Observou-se furfural no final da fermentação dos reatores com polpa e casca pré-tratada a alta severidade (de inferior ao limite de detecção para $45 \pm 7 \text{ mg L}^{-1}$, reatores *ANL 3,6*, *ANL 3,9* e *ANL 4,2*, Tabela 5.6 e Figura 5.10). No entanto, a produção de H_2 não afetou-se pelo furfural, uma vez que obteve-se P de $3,8 \text{ mL H}_2$ em reatores com menor (inferior ao limite de detecção em *AML 3,5*) e maior concentração de furfural (52 mg L^{-1} em *ANL 3,9*) no final da fermentação. Este resultado foi consequência das concentrações baixas de furfural nos reatores. Badshah et al.

(2012) verificaram efeito deletério do furfural a concentrações superiores ao 4 g L^{-1} , a partir da qual o furfural causou inibição da produção de CH_4 .

5.4.7. Comparação de resultados

Os resultados das cinéticas de produção de H_2 foram consideradas para a seleção dos substratos mais adequados para a produção de H_2 . Segundo a análise de variância de Kruskal Wallis a produção máxima de H_2 foi diferente em pelo menos 1 dos reatores ($\alpha = 0,05$). Os intervalos de confiança de diferença honestamente significativa (HSD) (Figura 5.11) mostraram que *AM 3,5* obteve P estatisticamente igual ao reator *AM 3,4* ($\alpha = 0,05$). Contudo, como a produção de *AM 3,5* (8 mL H_2) foi maior ($5,1 \text{ mL H}_2$ para *AM 3,4*), as condições de pré-tratamento e substratos utilizados neste sistema podem permitir melhorar os resultados em próximas etapas experimentais.

A máxima produção de H_2 no presente estudo de $0,02 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (cálculo baseado em R_m $0,8 \text{ mL H}_2 \text{ h}^{-1}$ para *AM 3,5*) foi inferior a observado durante a co-digestão de mucilagem e dejetos de suinocultura de $0,32 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Hernández et al., 2014). Utilizando água residuária de café na alimentação de reatores contínuos ou em batelada, Jung et al., 2012, 2011b e 2010 obtiveram valores maiores entre $0,31$ e $2,76 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Tabela 3.2). No entanto, o rendimento deste estudo ($1,4 \text{ mol H}_2 \text{ mol}_{\text{hexose}}^{-1}$) estava dentro da faixa dos rendimentos reportados pelos autores (entre $0,3$ e $2,6 \text{ mol H}_2 \text{ mol}_{\text{hexose}}^{-1}$). Para a produção de H_2 com fração líquida do pré-tratamento com ozônio de casca de café (dos Santos et al., 2018), o rendimento de $48,5 \text{ mL H}_2 \text{ g DQO}^{-1}$ foi superior quando comparado com $2,2 \text{ mL H}_2 \text{ g DQO}^{-1}$ no presente estudo.

Maiores concentrações de substratos durante as pesquisas citadas podem explicar as diferenças nos resultados, sendo de 20 g DQO L^{-1} para água residuária de café (Jung et al., 2012, 2011b, 2010), $9,8 \text{ g DQO L}^{-1}$ para mucilagem + dejetos de suinocultura (Hernández et al., 2014) e $39,5 \text{ g DQO L}^{-1}$ de fração líquida do pré-tratamento de café, pelo qual, o aprimoramento do processo com aumento no aproveitamento dos resíduos pode ser considerado em próximas pesquisas.

Figura 5.11. Produção de H₂ dos reatores em batelada da fermentação de resíduos de café brutos ou pré- tratados.

Teste de diferença honestamente significativa (HSD) de Tukey: Intervalos com sobreposição são estatisticamente iguais (95% de confiança). Reatores) A água residuária de café, M polpa e casca moída, N polpa e casca *in natura*, AM água residuária + polpa e casca moída, AN água residuária + polpa e casca *in natura*. M 3,2/ M 3,4/ M 3,5 polpa e casca moída e pré-tratada a severidades entre 3,2 e 3,5. L 3,2/ L 3,4/ L 3,5/ L 3,6/ L 3,9/ L 4,2 frações líquidas do reator hidrotérmico operado a severidades entre 3,2 e 4,2. ML 3,2/ ML 3,4/ ML 3,5 polpa e casca moída + frações líquidas do pré-tratamento a severidades entre 3,2 e 4,2. AM 3,2/ AM 3,4/ AM 3,5 água residuária + polpa e casca moída e pré-tratada a severidades entre 3,2 e 3,5. AML 3,2/ AML 3,4/ AML 3,5 água residuária de café + polpa e casca moída + fração líquida do pré-tratamento a severidades entre 3,2 e 3,5. N 3,6/ N 3,9/ N 4,2 polpa e casca *in natura* e pré-tratada a severidades entre 3,6 e 4,2. NL 3,6/ NL 3,9/ NL 4,2 polpa e casca *in natura* + frações líquidas do pré-tratamento a severidades entre 3,6 e 4,2. AN 3,6/ AN 3,9/ AN 4,2 água residuária + polpa e casca *in natura* e pré-tratada a severidades entre 3,9 e 4,2. ANL 3,6/ ANL 3,9/ ANL 4,2 água residuária de café + polpa e casca *in natura* + fração líquida do pré-tratamento a severidades entre 3,9 e 4,2.

5.4.8. Ácidos orgânicos, álcoois e pH

Determinaram-se o pH e concentração de metabólitos solúveis (como ácidos orgânicos e etanol, Tabela 5.7 e Figura 5.12) com o intuito de identificar as rotas e produtos metabólicos solúveis sintetizados nos reatores alimentados com diferentes resíduos de café. Os valores do ácido cítrico, málico, succínico, valérico e capróico além do n-butanol foram inferiores ao limite de detecção, e não foram considerados durante esta discussão.

Com relação ao pH, os meios líquidos utilizados como substratos foram ajustados em pH 6,0, embora, a adição de consórcio microbiano e resíduo de polpa e casca pré-tratado diminuiu o pH inicial para valores entre 4,3 e 6,0 (Tabela 5.7, exceto para *AM* e *ML* 3,5). Ao final da fermentação, o pH aumentou para valores entre 5,5 e 6,3 (exceto para *AM* diminuindo para 5,8 e *ML* 3,5 para 5,9), resultado não esperado pois a produção de ácidos orgânicos nos reatores (máxima de 39% em todos os reatores), leva à queda na capacidade tampão do meio e consequentemente do pH (Khanal et al., 2004). Khanal et al. (2004) verificaram esta hipótese mediante a produção de H_2 a partir da sacarose e amido e observaram diminuição do pH de 6,0 para $< 5,2$ devido a síntese de ácidos acético (~ 500 e 100 mg L^{-1} , respectivamente), butírico (~ 3.000 e 1200 mg L^{-1} , respectivamente) e propiônico (~ 1.500 e 3000 mg L^{-1} , respectivamente). Os autores operaram reatores em batelada a 37°C , 10 g L^{-1} de sacarose ou 150 g L^{-1} de amido e material de compostagem pré-tratado termicamente (105°C por 2 h) como inóculo.

Para os resíduos brutos (*A*, *M*, *AM*, *N* e *AN*) foram quantificados ácidos como láctico, acético, propiônico, isobutírico, butírico e isovalérico e etanol no início da fermentação (entre 2 e 32%, Tabela 5.7). Como discutido anteriormente, estes compostos foram originados de pré-acidificação da água residuária ocorrida na lagoa de armazenamento e durante a secagem ao sol do resíduo de polpa e casca. Especificamente, ácido láctico entre 4 e 14% nos substratos pode implicar a presença de bactérias lácticas. Estas bactérias também foram observadas durante a auto-fermentação de água residuária de café (20 g DQO L^{-1}) em sistemas em batelada, a 35°C e relatadas por Jung et al. (2010), conduzindo a teor de ácido láctico de 73% no final da fermentação.

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

Tabela 5.7: Produção de metabólitos solúveis e balanço de massa dos reatores em batelada da fermentação de resíduos de café brutos ou pré-tratados.

Reator	pH		EtOH (%)		HLa (%)		HFor (%)		HAc (%)		HPr (%)		HIsobu (%)		HBu (%)		HIsova (%)		DQO (mg L ⁻¹)		Somatória* (%)	
	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F
A	5,7	5,8	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	12	12	6	6	4	4	32	30	5	3	3.655	3.849	63	59
M	5,6	6,2	6	5	11	2	≤LD	2	5	15	13	14	25	13	4	13	≤LD	11	1.766	1.498	70	79
AM	6,0	5,8	≤LD	≤LD	8	1	≤LD	≤LD	2	12	3	2	7	3	5	26	≤LD	3	4.200	4.264	39	51
N	5,1	6,0	≤LD	≤LD	4	1	≤LD	≤LD	2	8	11	8	15	7	2	6	≤LD	5	1.246	1.297	55	43
AN	5,6	5,7	≤LD	≤LD	14	1	≤LD	≤LD	3	11	5	3	10	4	7	27	≤LD	3	4.516	3.909	51	54
M 3,2	5,1	5,9	≤LD	≤LD	6	3	≤LD	≤LD	3	16	18	21	25	10	4	16	≤LD	12	1.376	1.278	70	88
L 3,2	5,6	5,8	≤LD	≤LD	6	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	11	19	16	24	10	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	2.084	1.788	77	94
ML 3,2	5,8	6,0	≤LD	≤LD	4	≤LD	1	1	≤LD	6	13	11	13	≤LD	≤LD	13	≤LD	≤LD	2.876	2.936	56	52
AM 3,2	5,6	5,9	≤LD	≤LD	17	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	14	6	3	7	3	8	27	≤LD	≤LD	3.925	3.782	53	53
AML 3,2	5,5	6,2	≤LD	≤LD	12	≤LD	1	≤LD	≤LD	6	13	12	16	≤LD	≤LD	22	≤LD	≤LD	2.548	2.574	61	50
M 3,4	5,2	5,9	≤LD	≤LD	7	1	≤LD	≤LD	3	8	20	12	31	7	7	10	≤LD	8	1.215	1.335	92	54
L 3,4	5,7	5,8	≤LD	≤LD	4	≤LD	1	≤LD	3	11	12	13	14	≤LD	≤LD	15	≤LD	≤LD	2.168	1.839	62	58
ML 3,4	5,8	5,9	≤LD	≤LD	5	≤LD	1	≤LD	7	7	14	12	13	≤LD	≤LD	13	≤LD	≤LD	2.901	2.783	69	48
AM 3,4	5,6	6,1	≤LD	≤LD	17	2	≤LD	≤LD	3	6	8	9	9	3	8	29	≤LD	≤LD	4.108	3.779	56	54
AML 3,4	5,5	6,0	≤LD	≤LD	10	3	≤LD	≤LD	2	9	12	13	13	≤LD	≤LD	23	≤LD	≤LD	2.539	2.244	51	57
M 3,5	5,3	6,0	≤LD	3	6	2	≤LD	≤LD	2	19	18	19	24	10	4	16	≤LD	12	1.339	1.298	69	87
L 3,5	5,6	6,0	≤LD	≤LD	4	≤LD	1	≤LD	3	12	14	16	15	≤LD	≤LD	17	≤LD	≤LD	1.881	1.662	66	70
ML 3,5	6,0	5,9	≤LD	≤LD	6	≤LD	2	≤LD	8	12	≤LD	11	14	≤LD	≤LD	13	≤LD	≤LD	2.556	2.708	55	55
AM 3,5	5,6	6,2	10	2	16	1	≤LD	≤LD	4	7	8	9	8	5	9	30	≤LD	8	4.150	3.855	66	69
AML 3,5	5,5	6,2	5	20	10	2	≤LD	1	3	10	12	14	14	≤LD	≤LD	25	≤LD	≤LD	2.640	2.269	57	80
N 3,6	5,1	5,5	≤LD	2	7	1	≤LD	≤LD	2	14	20	14	27	5	4	12	≤LD	8	1.180	1.905	85	64
L 3,6	5,5	5,8	≤LD	≤LD	3	1	1	≤LD	16	6	9	11	12	20	≤LD	6	≤LD	≤LD	4.725	3.460	62	59
NL 3,6	5,7	5,7	≤LD	≤LD	4	≤LD	1	≤LD	22	13	14	6	17	6	≤LD	11	≤LD	8	3.160	2.633	91	61
AN 3,6	5,6	5,8	1	2	18	2	≤LD	≤LD	3	13	7	3	9	5	9	36	2	3	4.240	3.590	62	71
ANL 3,6	5,3	5,6	3	2	8	1	≤LD	≤LD	9	11	8	9	12	3	4	16	≤LD	5	2.860	2.777	59	55

Continua.

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

Continuação Tabela 5.7.

Reator	pH		EtOH (%)		HLa (%)		HFor (%)		HAc (%)		HPr (%)		HIsobu (%)		HBu (%)		HIsova (%)		DQO (mg L ⁻¹)		Somatória* (%)	
	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F
N 3,9	5,1	6,3	≤LD	4	8	1	≤LD	≤LD	12	24	21	31	28	11	4	25	≤LD	18	1.050	830	104	132
L 3,9	5,4	5,6	≤LD	7	4	2	1	≤LD	32	10	15	16	23	6	≤LD	13	≤LD	8	2.786	2.420	113	87
NL 3,9	5,4	5,7	≤LD	≤LD	5	≤LD	1	≤LD	46	13	25	19	26	≤LD	≤LD	19	≤LD	≤LD	2.150	2.247	149	80
AN 3,9	5,6	5,9	≤LD	≤LD	14	≤LD	1	≤LD	3	10	5	5	8	4	7	23	≤LD	≤LD	4.673	4.520	47	46
ANL 3,9	5,3	5,7	2	2	8	1	≤LD	≤LD	13	13	10	12	14	5	4	19	≤LD	6	2.845	2.513	67	65
N 4,2	5,0	5,7	2	5	5	1	≤LD	≤LD	3	17	17	20	20	7	4	16	≤LD	11	1.392	1.300	70	85
L 4,2	4,3	5,7	≤LD	≤LD	4	≤LD	1	≤LD	34	13	21	14	20	≤LD	≤LD	16	≤LD	≤LD	2.766	2.727	115	60
NL 4,2	5,3	5,6	≤LD	34	3	≤LD	1	≤LD	19	12	10	17	10	≤LD	≤LD	16	≤LD	≤LD	5.375	2.774	58	96
AN 4,2	5,6	5,9	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	≤LD	1	13	6	4	4	4	3	24	25	≤LD	≤LD	4.317	4.217	49	45
ANL 4,2	5,3	5,8	≤LD	1	8	1	≤LD	≤LD	17	9	9	10	12	4	4	15	2	5	3.107	2.990	66	55

*Incluindo ácidos orgânicos e carboidratos dissolvidos. EtOH etanol, HLa ácido lático, HFor ácido fórmico, HAc ácido acético, HPr ácido propiônico, HIsobu ácido isobutírico, Hbu ácido butírico, HIsova ácido isovalérico, DQO demanda química de oxigênio, ≤ LD Inferior ao limite de detecção. Ensaios) A água residuária de café, M polpa e casca moída, N polpa e casca *in natura*, AM água residuária + polpa e casca moída, AN água residuária + polpa e casca *in natura*. M 3,2/ M 3,4/ M 3,5 polpa e casca moída e pré-tratada a severidades entre 3,2 e 3,5. L 3,2/ L 3,4/ L 3,5/ L 3,6/ L 3,9/ L 4,2 frações líquidas do reator hidrotérmico operado a severidades entre 3,2 e 4,2. ML 3,2/ ML 3,4/ ML 3,5 polpa e casca moída + frações líquidas do pré-tratamento a severidades entre 3,2 e 4,2. AM 3,2/ AM 3,4/ AM 3,5 água residuária + polpa e casca moída e pré-tratada a severidades entre 3,2 e 3,5. AML 3,2/ AML 3,4/ AML 3,5 água residuária de café + polpa e casca moída + fração líquida do pré-tratamento a severidades entre 3,2 e 3,5. N 3,6/ N 3,9/ N 4,2 polpa e casca *in natura* e pré-tratada a severidades entre 3,6 e 4,2. NL 3,6/ NL 3,9/ NL 4,2 polpa e casca *in natura* + frações líquidas do pré-tratamento a severidades entre 3,6 e 4,2. AN 3,6/ AN 3,9/ AN 4,2 água residuária + polpa e casca *in natura* e pré-tratada a severidades entre 3,9 e 4,2. ANL 3,6/ ANL 3,9/ ANL 4,2 água residuária de café + polpa e casca *in natura* + fração líquida do pré-tratamento a severidades entre 3,9 e 4,2.

Figura 5.12a. Metabólitos solúveis e pH dos reatores em batelada da fermentação de resíduos de café brutos ou pré-tratados.

EtOH etanol, *HLa* ácido lático, *HFor* ácido fórmico, *HAc* ácido acético, *HPr* ácido propiônico, *HIsobu* ácido isobutírico, *Hbu* ácido butírico, *HIsoba* ácido isovalérico, *DQO* demanda química de oxigênio, $\leq$ LD Inferior ao limite de detecção. Ensaios) *A* água residuária de café, *M* polpa e casca moída, *N* polpa e casca *in natura*, *AM* água residuária + polpa e casca moída, *AN* água residuária + polpa e casca *in natura*. *M 3,2/ M 3,4/ M 3,5* polpa e casca moída e pré-tratada a severidades entre 3,2 e 3,5. *L 3,2/ L 3,4/ L 3,5* frações líquidas do reator hidrotérmico operado a severidades entre 3,2 e 3,5. *ML 3,2/ ML 3,4/ ML 3,5* polpa e casca moída + frações líquidas do pré-tratamento a severidades entre 3,2 e 3,5. *AM 3,2/ AM 3,4/ AM 3,5* água residuária + polpa e casca moída e pré-tratada a severidades entre 3,2 e 3,5. *AML 3,2/ AML 3,4/ AML 3,5* água residuária de café + polpa e casca moída + fração líquida do pré-tratamento a severidades entre 3,2 e 3,5.

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

Figura 5.12b. Metabólitos solúveis e pH dos reatores em batelada da fermentação de resíduos de café brutos ou pré-tratados.

EtOH etanol, *HLa* ácido láctico, *HFor* ácido fórmico, *HAce* ácido acético, *HPr* ácido propiônico, *Hisobu* ácido isobutírico, *Hbu* ácido butírico, *Hisoba* ácido isovalérico, *DQO* demanda química de oxigênio, $\leq$ LD Inferior ao limite de detecção. Ensaios). *L 3,6/L 3,9/L 4,2* frações líquidas do reator hidrotérmico operado a severidades entre 3,6 e 4,2. *N 3,6/N 3,9/N 4,2* polpa e casca in natura e pré-tratada a severidades entre 3,6 e 4,2. *NL 3,6/NL 3,9/NL 4,2* polpa e casca in natura + frações líquidas do pré-tratamento a severidades entre 3,6 e 4,2. *AN 3,6/ AN 3,9/ AN 4,2* água residuária + polpa e casca in natura e pré-tratada a severidades entre 3,9 e 4,2. *ANL 3,6/ ANL 3,9/ ANL 4,2* água residuária de café + polpa e casca in natura + fração líquida do pré-tratamento a severidades entre 3,9 e 4,2.

Evidenciou-se baixa produção de etanol em *M 3,5*, *N 3,6*, *N 3,9* e *N 4,2* (inicial inferior ao limite de detecção e final $4 \pm 1\%$), embora, em *L 3,2* (não detectado no início e 34% no final), *AML 3,5* (inicial 5 e final 20%) e *NL 4,2* (não detectado no início e 34% no final) o aumento deste álcool foi de, no mínimo, 15% no final da fermentação. Possivelmente, devido ao consumo de carboidratos ($42 \pm 11\%$ na fração líquida) sem a co-produção de H_2 (Equação 5.2), reação não interessante para os objetivos desta pesquisa.

Na maioria dos reatores foi observada redução da concentração do ácido lático (até 16% em todos os reatores a exceção de *A* e *AN 4,2*), etanol (até 8% nos reatores *M*, *N*, *AM 3,5* e *ANL 3,6*) e ácido propiônico (até 8% nos reatores *AM*, *N*, *AN*, *L 3,2*, *ML 3,2*, *AM 3,2*, *AML 3,2*, *M 3,4*, *ML 3,4*, *N 3,6*, *NL 3,6*, *AN 3,6*, *NL 3,9* e *L 4,2*) no final da fermentação, possivelmente para a conversão em H_2 e ácido acético (Equações 5.3 a 5.5). Estas reações levaram a aumento no conteúdo do ácido acético (entre 2 e 16%), principalmente em reatores de um substrato com resíduo de polpa e casca tratada (10% em *AN 3,6*). Similarmente, a síntese de bicarbonato através do consumo de ácido lático e propiônico (Equações 5.3 e 5.5) pode explicar o aumento do pH observado na maioria dos reatores.

A conversão de ácidos orgânicos ou etanol em ácido acético são rotas que precisam de associações com as arqueias metanogênicas ou com as bactérias consumidoras de H_2 , uma vez que a sintrofia permite a constante remoção dos produtos, permitindo que a reação seja termodinamicamente possível (a exceção da produção de ácido lático) (Stams, 1994). No entanto, na ausência de arqueias metanogênicas, essas conversões podem ser viáveis mediante baixas pressões parciais de hidrogênio (Dionisi and Silva, 2016), observadas nos reatores anteriormente descritos com *P* entre 0,8 e 8,0 mL H_2 (*A*, *M*, *AM*, *N*, *AN*, , *L 3,2*, *ML 3,2*, *AM 3,2*, *AML 3,2*, *M 3,4*, *ML 3,4*, *AM 3,5*, *N 3,6*, *NL 3,6*, *AN 3,6*, *ANL 3,6*, *NL 3,9* e *L 4,2*, Tabela 5.3).

Aumento nas concentrações de ácido acético pode ser devido a degradação da glicose ou outras hexoses (Equação 5.6). Isto pode ter ocorrido principalmente nos reatores utilizando somente resíduo de polpa e casca pré-tratado, já que evidenciaram as maiores produções de ácido acético entre 5 e 17% com consumo de carboidratos dissolvidos entre 16 e 61% (reatores *M 3,2*, *M 3,4*, *M 3,5*, *N 3,9*, *N 3,9* e *N 4,2*). A produção de H₂ a partir de carboidratos é favorável para a fermentação, pois permite maiores rendimentos (4 mols de H₂ por cada reação). Isto também confirma que o resíduo de polpa e casca pré-tratado pode ser um substrato adequado para a produção de H₂, principalmente *M 3,5*, onde observou-se um aumento do 17% no teor de ácido acético.

Nos reatores *AM*, *L 3,2*, *ML 3,2*, *AM 3,4*, *ML 3,5*, *L 3,5* e *ANL 3,6*, a produção de H₂ a partir de compostos aromáticos (Equação 5.1) pode ter contribuído com o aumento do ácido acético (entre 2 e 10%), uma vez que foi observada diminuição da concentração de fenóis de 150 ± 73 para 140 ± 71 mg L⁻¹ no final da fermentação. Este processo de degradação do fenol tem sido relatado para espécies de *Clostridium* sp. (Tai et al., 2010), bactérias com morfologia similar ao observado no consórcio microbiano (Figura 5.1). Tai et al. (2010) verificaram degradação do fenol (inicial 200 – 400 mg L⁻¹ e final ~ 50 - 250 mg L⁻¹) e produção de 1,2 – 1,3 mol H₂ mol⁻¹ glicose e ácido acético de 82 - 92 mg L⁻¹, durante a operação de reatores em batelada com cultura pura de *Clostridium butyricum* e glicose (5 g L⁻¹) e fenol (200 – 400 mg L⁻¹) como substratos, a 37 °C e pH 6,5.

O consumo do ácido láctico (inicial 8 ± 5% e final 1 ± 1%, Tabela 5.7) e síntese de butírico (inicial 4 ± 5% e final 18 ± 7%) com co-produção de H₂ (Equações 5.7 e 5.8) pode ter acontecido em todos os reatores (exceto em *A* e *L 3,2*), diante da evidente alta disponibilidade de ácido láctico na água residuária (7.256 mg L⁻¹, Tabela 5.1). Alguns estudos relatam que as bactérias lácticas e butíricas (como *Clostridium* sp.) podem associar-se para possibilitar estas reações (Sikora et al., 2013). Por exemplo, Chojnacka et al. (2011) observaram produção de 2,8 – 5,43 mol H₂ mol⁻¹ sacarose e 4.331 – 7.641 mg L⁻¹ de ácido butírico mediante comunidade microbiana com abundância relativa de 9% para Clostridiaceae e 25% para Leuconostocaceae. Os autores operaram reator de leite empacotado com sacarose (~40 g DQO L⁻¹), COV de 54 g DQO L⁻¹, TDH de 10 – 18 h e pH 5,0.

Produção de ácido fórmico não foi verificada na maioria dos reatores estudados (exceto em *M*, *ML* 3,5, *AML* 3,5, e *NA* 4,2, com máximo 2%) independentemente do tipo de substrato e pré-tratamento, por tanto, não foi objeto de discussão no presente trabalho.

O ácido propiônico aumentou em alguns reatores (entre 1 e 11%, reatores *M*, *M* 3,2, *L* 3,4, *AM* 3,4, *AML* 3,4, *M* 3,5, *L* 3,5, *ML* 3,5, *AM* 3,5, *AML* 3,5, *L* 3,6, *ANL* 3,6, *N* 3,9, *L* 3,9, *ANL* 3,9, *N* 4,2 e *AN* 4,2), mas com síntese significativa em *ML* 3,5 de 11% e *N* 3,9 de 10%. Este ácido orgânico pode não ser favorável para a fermentação uma vez que consome H_2 (Equação 5.9), explicando a baixo *P* de 2,2 e 1,1 mL H_2 em *ML* 3,5 e *N* 3,9, respectivamente, ainda com evidências de consumo de carboidratos superior ao 34%.

O ácido isobutírico diminuiu em todas os reatores estudados (inicial $15 \pm 7\%$ e final $5 \pm 3\%$), exceto em *A* (permaneceu em 4%) e *L* 3,6 (inicial 12 e final 20%). Alguns autores referenciam microrganismos com capacidade de isomerização do isobutirato a butirato, para sua posterior degradação a acetato (Wu et al., 1996), o que pode ter contribuído com a redução deste ácido orgânico com aumento do ácido acético ou butírico (entre 1 e 27%). Wu et al. (1996) observaram diminuição do ácido isobutírico de 5,2 para 2 mM e aumento do ácido butírico de 1,3 para 2 mM devido a isomerização de ácido isobutírico em butírico. Os autores operaram reatores em batelada com meio sintético contendo ácido butírico ou isobutírico e consórcio microbiano, em pH 7,0 e 37 °C.

Verificou-se concentrações superiores entre o 1 e 27% de ácido butírico no final da fermentação da maioria dos reatores (exceto para *A* e *L* 3,2 aonde as concentrações foram ~31% e inferior ao limite de detecção no início e final). Este metabólito dissolvido pode aumentar com a co-produção de H_2 (Equação 5.10), explicando as altas *P* observadas nos reatores com dois e três substratos (entre 1,1 e 8,0 mL H_2 , reatores *AM*, *AML* 3,2, *AM* 3,4, *AML* 3,4, *AM* 3,5, *AML* 3,5, *AN* 3,6 e *N* 3,9), aonde a síntese mínima de ácido butírico foi 20%. Esta reação é

termodinamicamente favorável, sendo fonte de energia para o consórcio microbiano que poderia justificar a acetogênese das equações 5.3, 5.4 e 5.5.

O ácido isovalérico aumento entre 1 e 18% em alguns reatores (reatores *M*, *AM*, *N*, *AN*, *M 3,2*, *M 3,4*, *M 3,5*, *AM 3,5*, *N 3,6*, *NL 3,6*, *AN 3,6*, *ANL 3,6*, *N 3,9*, *L 3,9*, *ANL 3,9*, *N 4,2* *ANL 4,2*). Durante a produção deste ácido (semelhante ao do valérico) tem sido relatado o consumo de H_2 (Saady, 2013), o que pode justificar *P* menores (entre 1,1 e 1,9 mL H_2) mas com produções maiores a 12% de ácido isovalérico em reatores somente com resíduo de polpa e casca bruto ou pré-tratado (*M 3,2*, *M 3,5* e *N 3,9*).

A DQO dissolvida diminuiu no final da fermentação da maioria dos reatores em de 2.991 ± 1.200 para $2744 \pm 1.009 \text{ mg L}^{-1}$ (exceto para *M*, *AM*, *AN*, *M 3,2*, *L 3,2*, *AM 3,2*, *AML 3,4*, *M 3,5*, *L 3,5*, *ML 3,5*, *AM 3,5*, *AML 3,5*, *AN 3,6*, *N 3,9*, *N 4,2* e *NL 4,2*), evidenciando consumo de matéria orgânica, principalmente na forma de carboidratos dissolvidos (consumo entre 4 e 82%). O balanço de massa esteve entre o 43 e 96%, pelo qual, compostos diferentes aos metabólitos solúveis determinados foram liberados durante a hidrólise do material lignocelulósico, decorrente da natureza complexa dos substratos utilizados.

Quando comparados todos os substratos, não foi possível constatar relação direta entre a produção de metabólitos solúveis e a severidade de pré-tratamento do resíduo de polpa e casca. No entanto, os metabólitos solúveis produzidos em maior proporção foram o ácido acético (máxima 17% em *M 3,5*) e butírico (máxima 27% em *AN 3,6*), ambos relacionados com a co-geração de H_2 , evidenciando o potencial destes substratos para o metabolismo das bactérias produtoras de H_2 .

Este resultado foi comparável ao observado em reatores UASB alimentados com água residuária de café (Jung et al., 2010), onde altas concentrações de ácido butírico (27%) e capróico (21%) conduziram a elevada a produção de H_2 ($62,2 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) mediante a aplicação de TDH 6 h, 35 °C, 20 g DQO L^{-1} na água residuária e microrganismos autóctones.

5.4.9. Considerações parciais

A co-digestão de água residuária e resíduo de polpa e casca pré-tratado a severidade 3,5 conduziu a maior produção de H_2 quando comparado com resíduos individuais, devido ao

aumento de concentração (na forma dissolvida ou como material polimérico) e diversidade de fontes de carboidratos (como glicose, arabinose, manose e frutose), com menor teor de inibidores como fenóis e furfural. Aspectos favorecidos pela co-digestão de resíduos de café foram a diminuição no tempo de início da fermentação, aumento na velocidade de produção de H_2 , síntese de biomassa e co-produção de ácido butírico e acético relacionados com rotas de alto rendimento H_2 . Estes resultados confirmam a possibilidade de utilizar ambos os resíduos da fazenda, obtendo-se vantagens como a diminuição de resíduos agrícolas, maior transferência de massa através da fermentação em sólido-líquido, disponibilidade de substrato para o consumo imediato e síntese de enzimas (carboidratos dissolvidos) e principalmente aumento do potencial de produção de bioenergia.

A fração líquida do reator hidrotérmico não mostrou-se favorável para a co-digestão, uma vez que aumentou o conteúdo de materiais potencialmente inibitório como fenóis, levando a longos tempos de início da fermentação e inferiores produções de H_2 .

Conforme os resultados destacados, confirmou-se a hipótese de que “*Por meio da co-digestão de resíduos de café tem-se maior produção de H_2* ”.

5.5. Avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H_2 , ácidos orgânicos e álcoois e caracterizar a comunidade microbiana (Hipóteses 4)

5.5.1. Parâmetros cinéticos

A co-digestão de água residuária, polpa e casca de café foi estudada como possibilidade alternativa para a obtenção de energia para o sector cafeicultor. Para isto, foram analisados os efeitos do pH inicial, temperatura, volume de *headspace*, velocidade de agitação, bio-aumentação, polpa e casca, água residuária e extrato de levedura em relação ao potencial máximo de produção de H_2 (P), velocidade máxima de produção de H_2 (R_m), e tempo de início da fermentação (λ , Tabela 5.8), mediante o ajuste dos dados de produção de H_2 acumulada (Figura 5.13). A ausência de produção de H_2 em alguns ensaios (3, 5, 7, 8, 9, 11 e 12) conduziu a valores maiores de desvios padrão para os dados relacionados a cinética de produção de H_2 (P , R_m e λ) entre ensaios nas mesmas condições operacionais para um fator específico.

Figura 5.13. Cinéticas de produção de H_2 acumulado e ajuste ao modelo de Gompertz modificado dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H_2 , ácidos orgânicos e álcoois.

Ensaio 1) pH 7,0, 30°C, 180 rpm, *headspace* 50%, sem inóculo, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 2) pH 7,0, 50°C, sem agitação, *headspace* 70%, sem inóculo, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 4) pH 7,0, 30°C, 180 rpm, *headspace* 70%, sem inóculo, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura; 6) pH 7,0, 50°C, 180 rpm, *headspace* 50%, inóculo 20%, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 10) pH 7,0, 30°C, sem agitação, *headspace* 50%, inóculo 20%, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura; 13, 14 e 15) pH 5,5, 40°C, 90 rpm, *headspace* 60%, inóculo 10%, polpa e casca 4 g L⁻¹, água 18,5 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 1 g L⁻¹.

A variação da concentração de polpa e casca não foram significativas para a produção de H_2 ($\alpha=0,05$, Tabela 5.8 e Figura 5.14). Sob tais condições observou-se P e Rm próximas para de 2 g L⁻¹ destes resíduos (14 ± 37 mL H_2 e 1 ± 2 mL H_2 h⁻¹, para os ensaios 1, 2, 3, 5, 8 e 12), 4 g L⁻¹ (26 ± 2 mL H_2 e 3 ± 1 mL H_2 h⁻¹, para os ensaios 13, 14 e 15) e 6 g L⁻¹ (9 ± 16 mL H_2 e 1 ± 1 mL H_2 h⁻¹, para os ensaios 4, 6, 7, 9, 10 e 11). Estes resultados diferem daqueles obtidos por Ratti et al. (2015), uma vez que os autores constataram que o aumento P está associado a maior concentração de substrato. Os autores verificaram em seus ensaios em batelada com bagaço de cana pré-tratado, aumento em P de 2,9 para 7,04 mmol H_2 e Rm de 0,21 para 0,61 mmol H_2 h⁻¹ para 0,5 a 2,0 g L⁻¹ de bagaço de cana, respectivamente. Os autores operaram reator em batelada com bagaço de cana pré-tratado mediante explosão a vapor (200 °C por 7 min) e tratamento

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

alcalino (NaOH 1% m/v, 121 °C, 30 min) em pH 7,0, 55 °C e bagaço *in natura* como fonte de inóculo. Portanto, as características dos substratos, inóculo, condições operacionais e de pré-tratamento dos resíduos podem ter conduzido as diferenças observadas nos resultados no presente estudo.

Tabela 5.8: Parâmetros cinéticos e físico-químicos dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H₂, ácidos orgânicos e álcoois.

Ensaio	Parâmetros cinéticos			Parâmetros físico-químicos			
	<i>P</i>	<i>Rm</i>	λ	Carboidratos dissolvidos		SST	
	(mL H ₂)	(mL H ₂ h ⁻¹)	(h)	Inicial (mg L ⁻¹)	Final (mg L ⁻¹)	Inicial (mg L ⁻¹)	Final (mg L ⁻¹)
1	82	4	32,6	2.617	234	334	966
2	3	0,1	37	657	327	116	212
3	0	0	0	507	479	112	115
4	8	1	25,8	613	136	130	239
5	0	0	0	2.667	1.118	538	328
6	3	1	36	767	416	112	322
7	0	0	0	1.983	2.539	410	266
8	0	0	0	2.600	639	402	172
9	0	0	0	693	290	174	250
10	40	1	16,1	1.700	387	396	460
11	0	0	0	2.300	2.136	346	380
12	0	0	0	420	268	98	153
13 PC	26	2	42,4	1.267	600	184	506
14 PC	25	3	39,7	1.267	466	184	482
15 PC	28	4	43	1.267	566	184	320

P potencial máximo de produção de H₂, *Rm* Velocidade máxima de produção de H₂, λ Tempo de início da fermentação, *SST* Sólidos suspensos totais. Ensaios 1) pH 7,0, 30°C, 180 rpm, *headspace* 50%, sem bio-aumentação, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 2) pH 7,0, 50°C, sem agitação, *headspace* 70%, sem bio-aumentação, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 3) pH 4,0, 50°C, 180 rpm, *headspace* 50%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura; 4) pH 7,0, 30°C, 180 rpm, *headspace* 70%, sem bio-aumentação, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura; 5) pH 7,0, 50°C, sem agitação, *headspace* 70%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura; 6) pH 7,0, 50°C, 180 rpm, *headspace* 50%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 7) pH 4,0, 50°C, 180 rpm, *headspace* 70%, sem bio-aumentação, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura; 8) pH 4,0, 30°C, 180 rpm, *headspace* 70%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 9) pH 4,0, 30°C, sem agitação, *headspace* 70%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 10) pH 7,0, 30°C, sem agitação, *headspace* 50%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura; 11) pH 4,0, 50°C, sem agitação, *headspace* 50%, sem bio-aumentação, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 12) pH 4,0, 30°C, sem agitação, *headspace* 50%, sem bio-aumentação, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura; 13, 14 e 15) pH 5,5, 40°C, 90 rpm, *headspace* 60%, bio-aumentação 10%, polpa e casca 4 g L⁻¹, água 18,5 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 1 g L⁻¹.

Figura 5.14. Efeito dos fatores da fermentação ($\alpha = 0,1$) sobre (a) Potencial máximo de produção de H_2 (P) (b) Velocidade máxima de produção de H_2 (R_m) e (c) Tempo de início da fermentação (λ).

(a)

(b)

(c)

Em relação ao tempo de início da fermentação (λ), nos ensaios com 6 g L⁻¹ de polpa e casca foram observados, tanto períodos longos (36 h, ensaio 6), quanto curtos (16,1 h, ensaio 10). Provavelmente, isso ocorreu devido à natureza da polpa e casca, uma vez que os principais componentes dos resíduos de café são celulose e hemicelulose, e, portanto, sua degradação mediante reações hidrolíticas pode ser incompleta e lenta (Battista et al., 2016). Tal situação dificulta a disponibilidade de açúcares simples em altas concentrações de material celulolítico, e limita o crescimento de algumas populações de microrganismos. Soares et al. (2018) observaram para 5 g L⁻¹ de bagaço de cana pré-tratado (200 °C, 10 min), tempo de início da produção de CH₄ de 90 e 133 h em reatores em batelada em pH 6,0, 37 °C e inóculo de resíduo de compostagem. Isto foi devido a baixa eficiência de bioconversão do substrato lignocelulósico.

Como o objetivo desta pesquisa foi maximizar o aproveitamento dos resíduos da indústria de café, optou-se por aumentar o intervalo relacionado a concentração de polpa e casca de café nos reatores nas demais fases experimentais.

O pH foi o fator que mais afetou a produção de H₂ ($\alpha=0,1$, Figura 5.14), sendo os maiores valores de P , R_m e λ observados em pH 7,0 (Ensaio 1: 82 mL, 4 mL H₂ h⁻¹ e 32,6 h, respectivamente), valores intermediários em pH 5,5 (Ensaio 15: 28 mL, 4 mL H₂ h⁻¹, e 43 h, respectivamente) e ausência de H₂ em pH 4,0. Estes resultados são consistentes com os relatados por Abreu et al. (2009) a partir fermentação da arabinose em reatores batelada com inóculo de lodo anaeróbio tratado termicamente. Os autores obtiveram maior produção de H₂ em pH entre 7,5 e 8,0 de 137 mL H₂. Em pH 4,0 (ensaios 3, 7, 8, 9, 11 e 12, Tabela 5.8) não foi observada produção de H₂. Wang et al. (2009) também relataram ausência de produção de H₂ a partir de glicose (5 g L⁻¹ d⁻¹) em reator semi-contínuo (3 dias de tempo de detenção hidráulica, TDH) a 35 °C e pH < 4,0, devido a inibição da atividade de todos os microrganismos. No caso específico com polpa e casca de café (diversidade de carboidratos) observou-se maior produção em pH 7,0.

Observou-se diminuição de P e R_m de 44 ± 37 mL H₂ e 2 ± 2 mL H₂ h⁻¹ para 3 mL H₂ e 1 ± 1 mL H₂ h⁻¹, respectivamente, para condição de temperatura de 50 °C (ensaios 2 e 6, Tabela 5.8) e 30 °C (ensaio 1, 4 e 10). Similarmente, obteve-se superior λ a 50 °C de $35,9 \pm 21,1$ h (ensaios 2,

6 e 11) quando comparado a 30 °C de $28,4 \pm 8,3$ h (ensaios 1, 4 e 10). Provavelmente a obtenção do consórcio microbiano a 37 °C pode ter contribuído, uma vez que, ocorreu seleção de populações favoráveis em temperatura mesofílica (de Sá et al., 2014).

Modificações no volume do *headspace* foram aplicadas para avaliar o efeito da pressão parcial de H_2 (pH_2) na fermentação, porque quando o volume de *headspace* é menor em relação ao líquido, pode ocorrer maior pressão do biogás em função das condições experimentais (Kraemer and Bagley, 2007). Verificou-se que menor volume de *headspace* favoreceu aumento significativo do P e Rm ($\alpha=0,5$, Figura 5.14), porque maiores valores foram observados com 50% (P : 82 mL H_2 e Rm : 4 mL H_2 h⁻¹ no ensaio 1), seguido de 60% (P : 26 ± 2 mL H_2 e Rm : 3 ± 1 mL H_2 h⁻¹ nos ensaios 13, 14 e 15) e finalmente 70% de *headspace* (P : 3 mL H_2 e Rm : 0,1 mL H_2 h⁻¹ no ensaio 2). Do mesmo modo, λ de $41,7 \pm 1,8$ h e $25,8 \pm 16,6$ h foram obtidos com 60% e 70% de *headspace*, respectivamente, enquanto a 50% de *headspace* foi de $16,1 \pm 16,9$ h. Sigurbjornsdottir e Orlygsson (2012) observaram resultados opostos quando avaliaram a fermentação de biomassa lignocelulósica com bactérias semelhantes a *Thermoanaerobacterium* sp. , ou seja, nos reatores com maior volume de *headspace* (relação volume líquido/gás de 0,04 ou 96% de *headspace*) foi obtido maior rendimento na produção de H_2 (1,8 mol H_2 mol glicose⁻¹). Ciranna et al. (2014), também avaliaram a fermentação em reator em batelada, com glicose como substrato, *Caloramator cele* como inóculo em pH_2 baixa (mediante a aplicação de N_2 gasoso para a continua remoção do H_2) e alta (permitindo acúmulo de H_2 com *headspace* de 33%). Os autores relataram que maior pH_2 no meio não exerceu efeito negativo no crescimento da biomassa, uma vez que este microrganismo resiste a altas pressões. Provavelmente, a maior produção de H_2 em maior pH_2 (50% de *headspace*) observada nesta pesquisa pode ser consequência da presença de populações de microrganismos adaptados a maior pressão do biogás no consórcio microbiano, ou a produção inferior necessária para influenciar negativamente a termodinâmica das reações envolvidas.

Máximas P e Rm de 82 mL H_2 e 4 mL H_2 h⁻¹ foram obtidas com 30 g DQO L⁻¹ de água residuária do processamento do café (ensaio 1). Notou-se ainda, a diminuição destes parâmetros para 18,5 g DQO L⁻¹ (P : 26 ± 2 mL H_2 e Rm : 3 ± 1 mL H_2 h⁻¹ nos ensaios 13, 14 e 15) e 7 g DQO L⁻¹ (P : 8 mL H_2 e Rm : 1 mL H_2 h⁻¹ no ensaio 4). Observou-se também diminuição do λ de forma significativa de $41,7 \pm 1,8$ h (ensaios 13, 14 e 15) para 16,1 h (ensaio 10), para 18,5 e 30 g DQO

L⁻¹, respectivamente. Provavelmente, na condição de maior concentração de matéria orgânica ocorreu favorecimento do crescimento de bactérias fermentativas, como, por exemplo, para o ensaio 1 com 30 g DQO L⁻¹, 2.617 mg L⁻¹ carboidratos inicial e aumento de SST de 334 para 966 mg L⁻¹. Efeito significativo da concentração de substrato em relação ao P e Rm também foi observado por Chong et al. (2009), utilizando efluente de moagem de palma. Os autores verificaram aumento de P de 206 e 298 mL H₂ g carboidrato⁻¹ e Rm de 230 e 780 mL H₂ h⁻¹ para 60 e 80 g DQO L⁻¹, respectivamente, utilizando reatores em batelada com cultura pura de *Clostridium butyricum* EB6 em pH 5,3 – 6,0, 37 – 42 °C.

A adição de extrato de levedura não foi significativa para a produção de H₂ ($\alpha=0,5$, Figura 5.14) mediante co-digestão de resíduos do processamento de café, uma vez que, em tais resíduos provavelmente, estejam incluídas vitaminas, cofatores e coenzimas. Por exemplo, no ensaio 4 sem extrato de levedura, observou-se P 8 mL H₂ e no ensaio 6 com 2 g L⁻¹ de extrato de levedura, observou-se valor menor 3 mL H₂. Para os dois ensaios observou-se o mesmo valor de Rm de 1 mL H₂ h⁻¹. Islam et al., (2015) observaram maior produção de H₂ (45 mL) com 2 g L⁻¹ extrato de levedura na fermentação de celulose em reatores em batelada a 60 °C com *Clostridium thermocellum* DSM 1237. De acordo com os autores, a disponibilidade de metais como ferro, zinco e cobre, podem ter influenciado a atividade enzimática e crescimento celular. No caso da co-digestão de resíduos de café, o extrato de levedura somente estimulou em tempos mais curtos de início da fermentação. Por exemplo, sem a adição de extrato de levedura esse período foi de 16,1 h (ensaio 10), quando comparado com o ensaio com 2 g L⁻¹ de extrato de levedura cujo valor foi praticamente o dobro (32,6 h, ensaio 1).

Nesta pesquisa, não foi observado efeito significativo da agitação na produção de H₂ ($\alpha=0,1$, Figura 5.14), uma vez que maiores valores de P e Rm foram obtidos com e sem agitação. Por exemplo, o maior valor de P foi obtido no ensaio 1 (82 mL H₂) com 180 rpm, no entanto, a segunda maior produção de H₂ foi obtida no ensaio 10 (40 mL H₂) na ausência de agitação. Ainda, a produção obtida no ensaio 10 (sem agitação) foi superior ao observado nos ensaios 13, 14 e 15 a 90 rpm (26 ± 2 mL H₂). Possivelmente, como o substrato principal (resíduo de polpa e

casca de café) encontrava-se na forma sólida com tendência a sedimentação, o estado estático pode ter facilitado o contato e penetração das hifas no interior do material.

Verificou-se influência significativa da agitação em relação a λ ($\alpha=0,1$, Figura 5.14), uma vez que, para maiores velocidades de agitação ocorreram diminuições do tempo médio de início da fermentação de $41,7 \pm 1,8$ h a 90 rpm (ensaios 13, 14 e 15) para $31,4 \pm 5,2$ h a 180 rpm (ensaios 1, 4 e 6). De acordo com Ri et al., (2017) a agitação nos sistemas biológicos favorece maior uniformidade no reator. No caso específico dessa pesquisa, maior acesso aos nutrientes pode ter conduzido ao rápido crescimento inicial dos microrganismos, e consequentemente, tempo reduzido de início da fermentação.

A bio-aumentação não teve efeito significativo sobre P e Rm ($\alpha=0,1$, Figura 5.14), ou seja, alta produção e velocidade de produção de H_2 foram obtidas com 20% de bio-aumentação (P : 40 mL H_2 e Rm : 1 mL H_2 h⁻¹, ensaio 10), 10% de bio-aumentação (P : 26 ± 2 mL H_2 e Rm : 3 ± 1 mL H_2 h⁻¹, ensaios 13, 14 e 15) e sem bio-aumentação (P : 82 mL H_2 e Rm : 4 mL H_2 h⁻¹, ensaio 1). No entanto, verificou-se para maior porcentagem de bio-aumentação diminuição significativa ($\alpha=0,1$) de λ de $41,7 \pm 1,8$ h com 10% (ensaios 13, 14 e 15) para $26 \pm 14,1$ h com 20% (ensaios 6 e 10). Foi observada produção de H_2 nos ensaios 1, 2 e 4 na ausência de bio-aumentação, confirmando a presença de bactérias e fungos fermentativos e celulolíticos autóctones dos resíduos de café, provenientes do processo de pós-colheita de café (Vilela et al., 2010). Desse modo, bio-aumentação desta microbiota nativa nos reatores em batelada permite a rápida fermentação, aumenta a capacidade metabólica e torna o processo mais estável à altas concentrações de substrato (Ri et al., 2017).

5.5.2. Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físico-químicos foram avaliados visando estabelecer qual condição experimental proporcionou maior crescimento da biomassa (avaliado através do aumento dos sólidos suspensos totais, SST) e maiores rendimentos H_2 mediante consumo dos substratos para produção de biogás (determinado pela redução de carboidratos dissolvidos) (Tabela 5.8, Figuras 5.15 e 5.16).

Figura 5.15. Redução de carboidratos, sólidos suspensos totais (SST) e potencial máximo de produção de H_2 (P) dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H_2 , ácidos orgânicos e álcoois.

Ensaio 1) pH 7,0, 30°C, 180 rpm, *headspace* 50%, sem bio-aumentação, polpa e casca 2 g L^{-1} , água 30 g DQO L^{-1} , extrato de levedura 2 g L^{-1} ; 2) pH 7,0, 50°C, sem agitação, *headspace* 70%, sem bio-aumentação, polpa e casca 2 g L^{-1} , água 7 g DQO L^{-1} , extrato de levedura 2 g L^{-1} ; 3) pH 4,0, 50°C, 180 rpm, *headspace* 50%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 2 g L^{-1} , água 7 g DQO L^{-1} , sem extrato e levedura; 4) pH 7,0, 30°C, 180 rpm, *headspace* 70%, sem bio-aumentação, polpa e casca 6 g L^{-1} , água 7 g DQO L^{-1} , sem extrato de levedura; 5) pH 7,0, 50°C, sem agitação, *headspace* 70%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 2 g L^{-1} , água 30 g DQO L^{-1} , sem extrato de levedura; 6) pH 7,0, 50°C, 180 rpm, *headspace* 50%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 6 g L^{-1} , água 7 g DQO L^{-1} , extrato de levedura 2 g L^{-1} ; 7) pH 4,0, 50°C, 180 rpm, *headspace* 70%, sem bio-aumentação, polpa e casca 6 g L^{-1} , água 30 g DQO L^{-1} , sem extrato de levedura; 8) pH 4,0, 30°C, 180 rpm, *headspace* 70%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 2 g L^{-1} , água 30 g DQO L^{-1} , extrato de levedura 2 g L^{-1} ; 9) pH 4,0, 30°C, sem agitação, *headspace* 70%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 6 g L^{-1} , água 7 g DQO L^{-1} , extrato de levedura 2 g L^{-1} ; 10) pH 7,0, 30°C, sem agitação, *headspace* 50%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 6 g L^{-1} , água 30 g DQO L^{-1} , sem extrato de levedura; 11) pH 4,0, 50°C, sem agitação, *headspace* 50%, sem bio-aumentação, polpa e casca 6 g L^{-1} , água 30 g DQO L^{-1} , extrato de levedura 2 g L^{-1} ; 12) pH 4,0, 30°C, sem agitação, *headspace* 50%, sem bio-aumentação, polpa e casca 2 g L^{-1} , água 7 g DQO L^{-1} , sem extrato de levedura; 13, 14 e 15) pH 5,5, 40°C, 90 rpm, *headspace* 60%, bio-aumentação 10%, polpa e casca 4 g L^{-1} , água 18,5 g DQO L^{-1} , extrato de levedura 1 g L^{-1} .

Figura 5.16. Efeito dos fatores da fermentação ($\alpha = 0,1$) sobre (a) Redução de carboidratos e (b) Aumento dos sólidos suspensos totais (SST).

Nos ensaios 7 e 3 (Figura 5.15) não foi observada produção de H_2 , crescimento celular reduzido ou ausente e sem redução de carboidratos. No ensaio 7 não foi observado aumento de SST e redução de carboidratos, provavelmente decorrente das condições desfavoráveis, como por exemplo, a acidez do meio (pH 4,0), temperatura termofílica (50 °C), excesso de agitação (180 rpm), maior volume de *headspace* (70%), ausência de bio-aumentação e sem extrato de levedura, além de maiores teores de substratos (6 g L⁻¹ de polpa e casca e 30 g DQO L⁻¹ de água residuária), influenciando negativamente a atividade fermentativa. Este resultado foi similar ao observado por Abreu et al. (2009), obtendo em pH 4,5 e 8,0 consumo de arabinose entre 20% e 98% e *P* de 0 (sem produção) e 137 mL H_2 , respectivamente. Os autores inferiram que a mudança

no pH diminuiu a eficiência do processo. Para este estudo foram operados reatores em batelada com arabinose (30 g DQO L^{-1}) e lodo de reator alimentado com monossacarídeos (glicose e arabinose) a 37°C .

O aumento da concentração de SST foi superior em meio com pH neutro; ou seja de $632 \text{ mg SST L}^{-1}$ em pH 7,0 (ensaio 1, com inicial de $334 \text{ mg SST L}^{-1}$). Em pH 5,5 os SST foi de $252 \pm 101 \text{ mg L}^{-1}$ (ensaios 13, 14 e 15, inicial de $184 \text{ mg SST L}^{-1}$). Todavia, em pH 4,0 observou-se valor máximo de $109 \text{ mg SST L}^{-1}$ (ensaio 4, com inicial de $130 \text{ mg SST L}^{-1}$) e de $322 \text{ mg SST L}^{-1}$ em pH 5,5 (ensaio 13, com inicial de 184 mg L^{-1}). Resultados diferentes foram observados por Beckers et al. (2015), em reatores em batelada sequencial com glicose e cultura pura de *Clostridium butyricum*, a 30°C e 400 rpm. Os autores observaram crescimento de biomassa mediante a determinação da densidade ótica (OD) a 600 nm, verificando aumento de 0,5 para 2,4 e 4,5 em pH inicial de 7,3 e 5,2, respectivamente. Maior crescimento em meio com pH ácido foi consequência de condição ótimo para o crescimento de *Clostridium butyricum* (pH de 5,2). Portanto, é possível inferir a partir dos dados obtidos, que a faixa de pH próximo ao neutro (7,0) foi próxima do pH ótimo para o consórcio autóctone destes resíduos.

A maior redução de carboidratos (91%) foi observada no ensaio 1, aonde obteve-se maior P (82 mL H_2) e R_m ($4 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1}$). Redução de $57 \pm 5\%$ nos ensaios 13, 14 e 15 com P de $26 \pm 2 \text{ mL H}_2$. No ensaio 7 não foi observada redução de carboidratos (inicial 1.983 e final 2.539 mg L^{-1}) nem produção de H_2 . No caso do ensaio 7, verificou-se aumento de carboidratos devido a hidrólise da polpa e casca, o qual levou a redução nos SST (inicial 410 e final 266 mg L^{-1}). Resultados diferentes foram observados por Massanet-Nicolau et al. (2016) durante a operação de digestor anaeróbico contínuo (TDH 24 h) com sacarose (10 g L^{-1}), operado a 35°C e pH 5,5, e inoculado com efluente de digestor anaeróbico de esgoto. Os autores verificaram produção de H_2 148% superior com aumento de somente 13% no consumo de carboidratos, pelo qual, outros mecanismos podem ter contribuído na síntese de biogás.

A agitação não foi significativa para a redução de carboidratos e aumento de SST ($\alpha=0,1$, Figura 5.16). No ensaio 1 obteve-se redução de carboidratos de 91% (concentração inicial de 2617 mg L^{-1} , Figura 5.15) e aumento de 632 mg L^{-1} de SST (concentração inicial de 334 mg L^{-1}),

e no ensaio 7 não houve redução de carboidratos e aumento de SST (concentrações iniciais de 1.983 mg L^{-1} e $410 \text{ mg SST L}^{-1}$, respectivamente), ambos os ensaios (1 e 7) foram agitados a 180 rpm. Beckers et al. (2015) verificaram maior crescimento celular e redução da glicose diante de aumento na velocidade de agitação, passando de DO (600 nm) de 2,14 para 2,94, e de 10,9% para 14,4% no consumo de glicose a velocidades de 0 e 400 rpm, respectivamente. Segundo os autores, maiores transferências de massa e menor H_2 dissolvido no líquido estimularam a duplicação celular e consumo de substratos. Pode ser inferido que a operação dos reatores com consórcio microbiano de fungos e bactérias e substratos lignocelulósicos (polpa e casca de café) no presente estudo, conduziram a resultados diferentes dos reportados pela literatura.

Em relação ao volume de *headspace* observou-se efeito significativo na redução de carboidratos ($\alpha=0,1$, Figura 5.15). Nas condições de menor *headspace* de 50% a redução de carboidratos máxima foi de 91% (concentração inicial de 2.617 mg L^{-1} , ensaio 1, Figura 5.15), sendo de 55% para *headspace* de 60% (concentração inicial 1.267 mg L^{-1} , ensaio 15) e de 78% com *headspace* 70% (concentração inicial de 613 mg L^{-1} , ensaio 4). Segundo Sakar et al. (2017) a conversão da glicose em produtos gasosos e/ou líquidos ocorrem a partir de reações espontâneas e geralmente não são afetadas pelo aumento da pressão de H_2 . Todavia, sob altas pH_2 pode ocorrer alterações das rotas metabólicas e produção de ácidos carboxílicos. Este fato explica o maior consumo de carboidratos observados nos ensaios com 50% de *headspace*, condição no qual o gás H_2 exerceu maior pressão.

Em contrapartida, o *headspace* não exerceu influência no aumento de SST (Figura 5.16). Verificou-se superior aumento na concentração de SST nos ensaios 1 (334 a 966 mg L^{-1} , Tabela 5.8), ensaio 13 (184 a 506 mg L^{-1}) e ensaio 4 (130 a 239 mg L^{-1}) correspondendo à 50%, 60% e 70% do volume de *headspace*, respectivamente. Portanto, o aumento da pH_2 nos reatores em batelada decorrente da diminuição do *headspace* de 70 para 50% não afetou o crescimento da biomassa. Segundo Ciranna et al. (2014) as altas pH_2 influenciam a produção de H_2 , sem afetar diretamente a velocidade de crescimento da biomassa.

A bio-aumentação não afetou o crescimento celular (aumento de SST), mas foi significativo para a redução de carboidratos ($\alpha=0,05$, Figura 5.16). Aumento de SST foi observado na ausência de bio-aumentação do consórcio microbiano (ensaio 1: 334 a 966 mg L^{-1} , Figura 5.15), com adição de 10% (ensaio 13: 184 a 506 mg L^{-1}) e 20% (ensaio 6: 112 a 322 mg L^{-1}).

¹). Portanto, para o crescimento da biomassa a bio-aumentação não foi relevante, uma vez que os substratos (água residuária, casca e polpa) também podem aportar microrganismos necessários para a fermentação.

Observou-se maior redução de carboidratos ($53 \pm 26\%$, Figura 5.15) nos ensaios 3, 5, 6, 8, 9 e 10 com bio-aumentação de 20% (concentração inicial entre 507 e 2.667 mg L⁻¹). Redução inferior ($42 \pm 33\%$, para concentração inicial entre 420 e 2.617 mg L⁻¹) foram obtidas nos ensaios 1, 2, 4, 7, 1 e 12, sem bio-aumentação, ou seja, a própria biomassa autóctone dos resíduos foi favorecida nas condições experimentais. O aumento significativo na redução de carboidratos através da bio-aumentação ($\alpha=0,1$, Figura 5.16) pode ser decorrente por meio disponibilidade e diversidade de microrganismos que consomem carboidratos para a produção de H₂ ou de outros produtos metabólicos (Vasconcelos et al., 2016).

Verificou-se incremento de SST independente da concentração de polpa e casca adicionada (Tabela 5.8 e Figura 5.15). Houve aumento de SST de 334 para 966 mg L⁻¹ no ensaio 1 utilizando-se 2 g L⁻¹ de polpa e casca. No entanto, para esta mesma concentração obteve-se valores muito baixos, de 112 para 115 mg SST L⁻¹ no ensaio 3. Portanto, não foi observado efeito significativo do teor de polpa e casca no crescimento celular (Figura 5.16), possivelmente devido ao processo de hidrólise do material lignocelulósico que é lento, conduzindo ao menor crescimento celular (Lynd et al., 2002). Do mesmo modo, diferenças operacionais entre os ensaios 1 (pH 7,0, 30°C, 180 rpm, *headspace* 50%, sem bio-aumentação, água 30 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹) e 3 (pH 4,0, 50°C, 180 rpm, *headspace* 50%, bio-aumentação 20%, água 7 g DQO L⁻¹, sem extrato e levedura) influenciaram no crescimento de biomassa.

Verificou-se diminuição significativa do consumo de carboidratos a alta concentração de polpa e casca ($\alpha=0,1$, Figura 5.16), obtendo-se valores médios de redução de $51 \pm 30\%$ (ensaios 1, 2, 3, 5, 8 e 12; concentração inicial entre 420 e 2.667 mg L⁻¹, Figura 5.15) e $44 \pm 29\%$ (ensaios 4, 6, 7, 9, 10 e 11; concentração inicial entre 613 e 2.300 mg L⁻¹) para 2 e 6 g L⁻¹, respectivamente. Ratti et al. (2013) observaram consumo de celulose de 41% e 28% para 2,5 e 5 g L⁻¹ de celulose, respectivamente, durante a operação de reatores em batelada em pH 7,0, 37 °C, adição de celulasas (entre 1,5 e 30 mL), e lixiviado de aterro sanitário como inóculo. Segundo os

autores, a redução no pH de 7,0 para 4,0 – 4,3 devido a produção de ácidos orgânicos nos reatores, levou a desnaturação das enzimas celulolíticas, com consequente inibição da hidrólise e consumo da celulose quando esta era adicionada em altas concentrações.

Diferentemente, o aumento da concentração de água residuária resultou em maior eficiência de redução de carboidratos, sendo estatisticamente significativo ($\alpha=0,1$, Figura 5.16). Redução de $44 \pm 24\%$ (ensaios 2, 3, 4, 6, 9, e 12; concentração inicial entre 420 e 767 mg L⁻¹, Figura 5.15) e $51 \pm 33\%$ (1, 5, 7, 8, 10 e 11; concentração inicial entre 1.700 e 2.667 mg L⁻¹) foram obtidos utilizando 7 e 30 g DQO L⁻¹, respectivamente, sendo assim, redução superior foi observada nos ensaios com alta concentração de DQO do substrato. Os principais componentes da água residuária do processamento de café são açúcares e pectina (Woldesenbet et al., 2014), ambos sacarídeos de rápida degradação pelos microrganismos, portanto, maiores concentrações de DQO da água de café pressupõe em elevada disponibilidade dos mesmos para bio-conversão em metabólitos de interesse.

O extrato de levedura não favoreceu aumento significativo do crescimento celular ($\alpha=0,1$, Figura 5.16), visto que, em altas concentrações de 2 g L⁻¹ proporcionou aumento de SST de até 632 mg L⁻¹ (de 334 a 966 mg L⁻¹ no ensaio 1, Figura 5.15), assim como, ausência de crescimento (de 402 a 402 mg L⁻¹ no ensaio 8). Como descrito anteriormente, a presença de extrato de levedura não foi estatisticamente significativa, uma vez que a água residuária também pode disponibilizar nutrientes necessários para o crescimento celular.

Por outro lado, altas concentrações de extrato de levedura favoreceram significativamente a redução de carboidratos ($\alpha=0,1$, Figura 5.16), obtendo-se $53 \pm 29\%$ de redução nos ensaios 1, 2, 6, 8, 9 e 11 (concentração inicial entre 657 e 2.617 mg L⁻¹) e $42 \pm 31\%$ de redução nos ensaios 3, 4, 5, 7, 10 e 12 (concentração inicial entre 420 e 2.667 mg L⁻¹) utilizando-se 2 g L⁻¹ e sem adição de extrato de levedura, respectivamente. O aumento da eficiência de redução de carboidratos pode ser consequente da maior atividade enzimática na presença de extrato de levedura (Islam et al., 2015), não necessariamente para a produção de biomassa, mas como fonte de cofatores, coenzimas e vitaminas para a síntese de enzimas e consequente degradação dos carboidratos.

5.5.3. Ácidos orgânicos, álcoois e pH

Metabólitos dissolvidos, como ácidos orgânicos e álcoois, foram analisados no início, fase exponencial (~30 h de fermentação) e final da produção de H_2 (Tabela 5.9 e Figura 5.17), avaliando a evolução do processo biológico e as rotas de fermentação. Alguns compostos, como isobutanol, *n*-butanol, ácido isobutírico, ácido valérico, ácido isovalérico e ácido capróico foram quantificados, porém em concentrações inferiores ao limite de detecção do método cromatográfico.

Verificou-se aumento da concentração de ácido acético, láctico e etanol, pelo qual suas produções sob efeito do pH, temperatura, agitação, *headspace*, concentração de bio-aumentação, polpa e casca, água residuária e extrato de levedura foram estudados através de planejamentos estatísticos e os resultados são apresentados na Figura 5.18.

Sob condições de meio com pH neutro e temperatura mesofílicas ($\alpha=0,1$) verificou-se aumento significativo de ácido acético. A maior produção de ácido acético foi observada no ensaio 1 (281 mg L⁻¹ na fase exponencial e 1.956 mg L⁻¹ no final da fermentação) em pH 7,0 e 30 °C, enquanto a menor produção foi observada nos ensaios 7 e 11 (diminuição da concentração de 889 ± 73 para 689 ± 83 mg L⁻¹) em pH 4,0 e 50 °C. No ensaio 1, a rota de formação de ácido acético foi favorável para a produção de H_2 , uma vez que possibilitou maiores rendimentos de H_2 em comparação com outros produtos metabólicos (produção de 4 mol de H_2 para cada 1 mol de glicose removida, Equação 5.6), explicando a alto *P* de 82 mL observada no ensaio 1.

A produção de complexos enzimáticos e reações catabólicas dependem das condições ambientais, principalmente do pH (Ruggeri et al., 2015). Desta maneira, pode-se considerar que pH 7,0 e temperatura de 30 °C foram condições ambientais favoráveis e, portanto, maior produção de H_2 e ácido acético foram observados a partir da água residuária e resíduo de polpa e casca de café.

Figura 5.17. Balanço de massa e pH dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H_2 , ácidos orgânicos e álcoois.

Ensaio 1) pH 7,0, 30°C, 180 rpm, *headspace* 50%, sem bio-aumentação, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 2) pH 7,0, 50°C, sem agitação, *headspace* 70%, sem bio-aumentação, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 3) pH 4,0, 50°C, 180 rpm, *headspace* 50%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura; 4) pH 7,0, 30°C, 180 rpm, *headspace* 70%, sem bio-aumentação, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura; 5) pH 7,0, 50°C, sem agitação, *headspace* 70%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura; 6) pH 7,0, 50°C, 180 rpm, *headspace* 50%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 7) pH 4,0, 50°C, 180 rpm, *headspace* 70%, sem bio-aumentação, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura; 8) pH 4,0, 30°C, 180 rpm, *headspace* 70%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 9) pH 4,0, 30°C, sem agitação, *headspace* 70%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 10) pH 7,0, 30°C, sem agitação, *headspace* 50%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura; 11) pH 4,0, 50°C, sem agitação, *headspace* 50%, sem bio-aumentação, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura; 13, 14 e 15) pH 5,5, 40°C, 90 rpm, *headspace* 60%, bio-aumentação 10%, polpa e casca 4 g L⁻¹, água 18,5 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 1 g L⁻¹.

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

Tabela 5.9: Ácidos orgânicos, álcoois e pH dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H₂, ácidos orgânicos e álcoois.

Ensaio	Fase	pH	Metanol	Etanol	Ácido Acético	Ácido Propiônico	Ácido Butírico	Ácido Lático
1	Inicial	7,0	110	2.514	1.041	145	≤ LD	9.733
	Exponencial		141	3.059	1.322	≤ LD	≤ LD	9.833
	Final	5,9	0	2.183	2.997	≤ LD	≤ LD	4.333
2	Inicial	7,0	46	833	271	≤ LD	356	1.927
	Exponencial		54	845	487	≤ LD	≤ LD	1.980
	Final	5,9	0	614	494	≤ LD	≤ LD	1.639
3	Inicial	4,0	48	864	198	≤ LD	≤ LD	1.913
	Final	4,2	49	726	311	≤ LD	≤ LD	1.933
4	Inicial	4,0	42	774	216	≤ LD	≤ LD	2.113
	Exponencial		51	771	356	≤ LD	≤ LD	1.911
	Final	5,4	55	362	1.213	≤ LD	≤ LD	110
5	Inicial	7,0	161	2.803	949	≤ LD	≤ LD	13.319
	Final	5,2	283	3.532	1.449	≤ LD	≤ LD	14.105
6	Inicial	7,0	55	853	167	≤ LD	≤ LD	5.081
	Exponencial		63	894	599	152	≤ LD	8.643
	Final	6,1	53	756	827	390	≤ LD	1.999
7	Inicial	4,0	139	2.658	889	≤ LD	≤ LD	10.138
	Final	4,2	115	2.180	689	≤ LD	≤ LD	9.750
8	Inicial	4,0	82	2.448	1.005	≤ LD	≤ LD	14.228
	Final	3,9	139	2.447	1.080	≤ LD	≤ LD	12.298
9	Inicial	4,0	48	858	210	≤ LD	≤ LD	1.989
	Final	4,2	57	592	561	≤ LD	≤ LD	2.133
10	Inicial	7,0	107	2.242	909	76	≤ LD	10.235
	Exponencial		185	3.604	1028	98	≤ LD	9.947
	Final	5,9	341	1.849	1.899	29	≤ LD	4.268
11	Inicial	4,0	173	3.372	992	≤ LD	≤ LD	10.228
	Final	4,0	147	3.128	807	90	≤ LD	10.051
12	Inicial	4,0	0	709	204	≤ LD	≤ LD	2.037
	Final	4,1	30	538	283	14	≤ LD	2.077
13 PC	Inicial	5,5	102	2.363	537	22	6	5.268
	Exponencial		132	866	544	13	9	8.718
	Final	7,5	222	3.933	1843	≤ LD	≤ LD	180

Continua.

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

Continuação da Tabela 5.9

Ensaio	Fase	pH	Metanol	Etanol	Ácido Acético	Ácido	Ácido	Ácido
						Propiônico	Butírico	Lático
mg L ⁻¹								
14 PC	Exponencial		48	691	610	≤ LD	≤ LD	9.173
	Final	6,4	210	3.774	1.599	≤ LD	≤ LD	185
15 PC	Exponencial		38	872	650	≤ LD	≤ LD	9.569
	Final	6,6	258	4.180	1.685	≤ LD	≤ LD	184

≤ LD Inferior ao limite de detecção. Ensaios 1) pH 7,0, 30°C, 180 rpm, *headspace* 50%, sem bio-aumentação, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 2) pH 7,0, 50°C, sem agitação, *headspace* 70%, sem bio-aumentação, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 3) pH 4,0, 50°C, 180 rpm, *headspace* 50%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura; 4) pH 7,0, 30°C, 180 rpm, *headspace* 70%, sem bio-aumentação, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura; 5) pH 7,0, 50°C, sem agitação, *headspace* 70%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura; 6) pH 7,0, 50°C, 180 rpm, *headspace* 50%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 7) pH 4,0, 50°C, 180 rpm, *headspace* 70%, sem bio-aumentação, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura; 8) pH 4,0, 30°C, 180 rpm, *headspace* 70%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 9) pH 4,0, 30°C, sem agitação, *headspace* 70%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 10) pH 7,0, 30°C, sem agitação, *headspace* 50%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura; 11) pH 4,0, 50°C, sem agitação, *headspace* 50%, sem bio-aumentação, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 12) pH 4,0, 30°C, sem agitação, *headspace* 50%, sem bio-aumentação, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura; 13, 14 e 15) pH 5,5, 40°C, 90 rpm, *headspace* 60%, bio-aumentação 10%, polpa e casca 4 g L⁻¹, água 18,5 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 1 g L⁻¹.

Em 13 ensaios (ensaios 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 14 e 15) observou-se aumento do ácido acético e diminuição da concentração de outros ácidos orgânicos e álcoois no final da fermentação. Por exemplo, no ensaio 10 (pH 7,0, 30 °C, sem agitação, *headspace* 50%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura) verificou-se diminuição da concentração de etanol de 2.242 mg/L no início para 1.849 mg L⁻¹ no final da fermentação. Possivelmente, ocorreu a formação de etanol sem produção de H₂ (Equação 5.2) sendo esta reação termodinamicamente favorável ($\Delta G^{\circ} = -164,8$). No entanto, no final do processo os microrganismos transformaram o etanol em ácido acético e H₂ via acetogênese (Equação 5.4), devido as altas concentrações deste ácido no final da fermentação.

Figura 5.18. Efeito dos fatores da fermentação ($\alpha = 0,1$) sobre (a) Produção de ácido acético (b) Produção de ácido lático e (c) Produção de etanol.

Do mesmo modo, nos ensaios 1, 2 e 6 observou-se valores de ácido láctico superiores após 20-30 h de operação (fase exponencial), mas, em todos os casos verificou-se diminuição ao final da fermentação (início de $5.580 \pm 3.927 \text{ mg L}^{-1}$, fase exponencial de $6.819 \pm 4.232 \text{ mg L}^{-1}$ e final da fermentação de $2.657 \pm 1.463 \text{ mg L}^{-1}$). Face a tais resultados, pressupõe a presença de bactérias ácido lácticas na água residuária de café (Jung et al., 2010) e a ocorrência da rota ácido láctica nestes reatores (ensaio 1, 2 e 6). No entanto, durante a fermentação dos resíduos de café, o metabolismo predominante (via láctica) modificou-se para a rota acetogênica (Saady, 2013) (Equação 5.3), levando conversão do ácido láctico em ácido acético e H_2 no final da fermentação.

O segundo ácido orgânico com maior produção foi o ácido láctico (entre 20 e 786 mg L^{-1} , ensaios 3, 5, 9 e 12), principalmente em ensaios com pH inicial 4,0. A produção de ácido láctico nos ensaios 3, 9 e 12 pode ser consequência do meio com pH ácido, uma vez que nesta condição a produção de compostos mais reduzidos é favorecida, não ocorrendo nesta rota a formação de H_2 (Antonopoulou et al., 2016). No entanto, por meio da análise estatística (Figura 5.18) da produção de ácidos orgânicos e álcoois verificou-se que nenhum dos fatores teve efeito significativo sobre produção de ácido láctico.

As maiores concentrações de ácido láctico de 786 e 144 mg L^{-1} foram observadas nos ensaios 5 (pH 7,0, 50°C , sem agitação, *headspace* 70%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 2 g L^{-1} , água 30 g DQO L^{-1} , sem extrato de levedura) e 9 (pH 4,0, 30°C , sem agitação, *headspace* 70%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 6 g L^{-1} , água 7 g DQO L^{-1} , extrato de levedura 2 g L^{-1}), respectivamente. Estes resultados foram distintos em relação aos obtidos por Jung; Kim; Shin (2010a), que reportaram sensibilidade das bactérias ácido lácticas ao aumento da temperatura quando comparadas com as bactérias produtoras de H_2 . Os autores operaram reator de mistura completa com água residuária de café ($20 \text{ g Carboidratos DQO L}^{-1}$) e microrganismos autóctones deste resíduo, e observaram 70% de ácido láctico em relação ao total de ácidos orgânicos. Todavia, quando a biomassa crescida no reator de mistura completa foi submetida a $60 - 90^\circ\text{C}$ durante 30 min, e posteriormente foi utilizada como inóculo de reator UASB operado sob condição mesofílica (35°C), pH 5,5, água residuária do processamento de café (20 g DQO L^{-1}) e TDH 12 h verificaram diminuição no teor de ácido láctico para 11%.

No ensaio 5 (pH 7,0, 50°C , sem agitação, *headspace* 70%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 2 g L^{-1} , água residuária com 30 g DQO L^{-1} , sem extrato de levedura) verificou-se valores

equivalentes de ácido acético, láctico e etanol (0,01, 0,01 e 0,02 mol L⁻¹, respectivamente), além de CO₂ no *headspace*. Este resultado corresponde à via de fermentação heteroláctica, onde hexoses e pentoses são convertidas em bio-produtos (como ácido láctico, ácido acético, etanol, diacetil, formiato e CO₂) por microrganismos como *Leuconostoc* sp., *Oenococcus* sp., e alguns *Lactobacillus* sp. (Abdel-Rahman et al., 2013; Martinez et al., 2013) (Equações 5.11 e 5.12).

Nos ensaios 9 (pH 4,0, 30 °C, sem agitação, *headspace* 70%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 6 g L⁻¹, água residuária com 7 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹) e 12 (pH 4,0, 30 °C, sem agitação, *headspace* 50%, sem bio-aumentação, polpa e casca 2 g L⁻¹, água residuária com 7 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura) observaram-se entre 40 e 144 mg L⁻¹ de ácido láctico e entre 84 e 375 mg L⁻¹ de ácido acético (Tabela 5.9), e reduzida quantidade de CO₂ no biogás. Portanto, a via fermentativa heteroláctica pode ter ocorrido, mas também a homoláctica (Equação 5.13), na qual o principal produto é o ácido láctico a partir de glicose sem produção de CO₂ (Abdel-Rahman et al., 2013; Martinez et al., 2013).

No ensaio 3 (pH 4,0, 50 °C, 180 rpm, *headspace* 50%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 2 g L⁻¹, água residuária com 7 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura) observou-se menor concentração de ácido láctico (20 mg L⁻¹) e ácido acético (120 mg L⁻¹). Do mesmo modo, no ensaio 7 (pH 4,0, 50 °C, 180 rpm, *headspace* 70%, sem bio-aumentação, polpa e casca 6 g L⁻¹, água residuária com 30 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura), não houve crescimento de biomassa, uma vez que, verificou-se diminuição da concentração de SST de 410 para 266 mg L⁻¹ no final da fermentação, sem remoção de carboidratos (1.983 mg L⁻¹ no início e 2.539 mg L⁻¹ no final da fermentação). A baixa e/ou nenhuma atividade fermentativa nos ensaios 3 e 7, resultou na ausência de biogás e compostos intermediários no meio líquido. Portanto, essas condições foram inibitórias para a fermentação e crescimento celular, e provavelmente relacionadas com pH 4,0 e temperatura de 50 °C.

Por meio da análise estatística verificou-se que nenhum dos fatores (pH, temperatura, agitação, volume de *headspace*, porcentagem de bio-aumentação, concentração de polpa e casca, água residuária e extrato de levedura) teve efeito significativo sobre a produção de ácido láctico ($\alpha=0,1$, Figura 5.18). Isto possivelmente consequência da produção deste ácido nos ensaios 3, 5, 9 e 12, sobre condições de fermentação diversas, tais como pH entre 4,0 e 7,0, temperatura entre 30 e 50 °C, 180 rpm e sem agitação, *headspace* entre 50 e 70%, 20% e sem bio-aumentação, contração de polpa e casca entre 2 e 6 g L⁻¹, concentração de água residuária entre 7 e 30 g DQO L⁻¹, 2 g L⁻¹ e sem extrato de levedura. Produção de ácido láctico a diferentes condições operacionais pode ser consequência de bactérias lácticas no consórcio microbiano ou substratos (água residuária, polpa e casca de café). Carvalho et al. (2018) reportaram a predominância de bactérias como *Lactobacillus* sp., *Pediococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Leuconostoc* sp. e *Lactococcus* sp. com produção de 0,32 g L⁻¹ de ácido láctico na comunidade microbiana associada ao processamento úmido de café.

Etanol somente foi observado nos ensaios 13, 14 e 15 (entre 1.411 e 1.816 mg L⁻¹) cujas características comuns eram pH 5,5, 40 °C, 90 rpm, *headspace* 60%, bio-aumentação 10%, polpa e casca 4 g L⁻¹, água residuária com 18,5 g DQO L⁻¹ e extrato de levedura 1 g L⁻¹. Portanto, nenhum dos níveis dos fatores estudados foi significativo para a produção de etanol ($\alpha=0,1$, Figura 5.18). Dionisi e Silva (2016) afirmaram que a produção de etanol é favorecida em pH superior a 6,0. Desse modo, embora se tenha iniciado a fermentação em pH 5,5 no final da operação dos ensaios 13, 14 e 15 observou-se pH 7,5; 6,4 e 6,6, respectivamente, condições essas favoráveis para rota de produção de etanol.

Nos ensaios 13, 14 e 15 obteve-se produção concomitante de etanol e H₂ (Equação 5.14) (Jianzheng Li et al., 2009). De acordo com a equação 5.14 tem-se a formação de bicarbonato, o que justifica o aumento no valor de pH de 5,5 para 7,5; 6,4 e 6,6 no final da fermentação dos ensaios 13, 14 e 15, respectivamente.

Contribuição de alcalinidade mediante a transformação de ácido láctico em acético (Equação 5.3) também pode ser considerada, uma vez que foi observada diminuição da

concentração de ácido láctico nos ensaios 13, 14 e 15 (5.268 mg L^{-1} no início e $183 \pm 3 \text{ mg L}^{-1}$ no final da fermentação).

Verificou-se aumento da concentração de metanol nos ensaios 10 (107 para 341 mg L^{-1}) e 13, 14 e 15 (de 102 mg L^{-1} para $230 \pm 25 \text{ mg L}^{-1}$). Schink e Zeikus (1980) observaram que metanol pode ser produzido durante a digestão anaeróbia de frutas e vegetais a partir da pectina contida nestes resíduos por enzimas pectinolíticas de bactérias como *Clostridium* sp. ou *Pseudomonas* sp. (Schink and Zeikus, 1980).

Nos ensaios 11 e 12 observou-se baixa concentração de ácido propiônico (inferior ao limite de detecção do método cromatográfico, no início e no final de 90 e 14 mg L^{-1} , respectivamente). Ácido láctico observado em ambos os ensaios (10.228 e 2.037 mg L^{-1} nos ensaios 11 e 12, respectivamente) pode ter sido o substrato mais provável para a produção de ácido propiônico, uma vez que esta reação permite maior ganho de energia (Saady, 2013), explicando o aumento da concentração deste ácido nos reatores sem a produção de H_2 .

O balanço de massa (Figura 5.17) esteve entre 41 e 115%, pelo qual, matéria orgânica diferente de ácidos orgânicos, álcoois e carboidratos podem estar presentes nos reatores, na forma de lignina, fenóis, biomassa microbiana entre outros. Em geral, observou-se diminuição no teor total de ácidos orgânicos e álcoois de $88 \pm 13\%$ para $82 \pm 19\%$ no final da fermentação (a exceção dos ensaios 5, 8, 9 e 10), como consequência de reações acetogênicas para sua transformação em ácido acético e H_2 . Isso foi provavelmente devido a diminuição da DQO dissolvida na maioria dos reatores (a exceção dos ensaios 3, 11 e 12), demonstrando transformação de parte da matéria orgânica em H_2 .

Devido à produção de H_2 no ensaio 1 (82 mL H_2), ácido láctico e acético no ensaio 9 (144 e 351 mg L^{-1} , respectivamente), etanol e ácido acético nos ensaios 13, 14 e 15 (1.599 ± 204 e $1.172 \pm 123 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente) foram selecionados para a identificação dos carboidratos no início e final da fermentação. No ensaio 1 verificou-se completa redução da celobiose (inicial 57 mg L^{-1} e final inferior ao limite de detecção) e aumento de arabinose (inicial 186 mg L^{-1} e final 233 mg L^{-1}). Por meio dessa quantificação pode-se inferir a provável atividade das enzimas celulase e arabinase na polpa e casca, uma vez que endo- β -1,4-D-glucanase convertem a celulose

em celobiose, para posteriormente ser transformada em glicose mediante a β -glicosidase (Cheng et al., 2011b). Do mesmo modo, as enzimas arabinofuranosidase e endo-arabinase podem hidrolisar polímeros de arabinana da lignocelulose (Van Dyk and Pletschke, 2012).

Resultados similares foram observados no ensaio 9, com redução da celobiose (inicial 15 mg L⁻¹ e final inferior ao limite de detecção) e aumento na xilose (inicial inferior ao limite de detecção e final 49 mg L⁻¹) e arabinose (inicial 37 mg L⁻¹ e final 66 mg L⁻¹). Atividade adicional da celulase, arabinase e xilanases pode ser inferida neste ensaio, uma vez que estas enzimas degradam polissacarídeos com β -1,4-xilana em xilose presente na hemicelulose, devido a atuação de bactérias semelhantes a *Clostridium* sp. (Cheng et al., 2011b), desse modo justifica-se o aumento da concentração de xilose observado no final da fermentação.

Do mesmo modo, para os ensaios 13, 14 e 15, obteve-se redução de carboidratos como celobiose (inicial 8 mg L⁻¹ e final inferior ao limite de detecção) e arabinose (inicial 75 mg L⁻¹ e final 71 mg L⁻¹). Inferior atividade hidrolítica foi observada neste ensaio, uma vez que, não se observou aumento da concentração dos carboidratos anteriormente citados, indicador da ausência de transformação de material polimérico em monossacarídeos.

5.5.4. Caracterização taxonômica e funcional da comunidade microbiana

A caracterização microbiana dos ensaios submetidos às diferentes condições de fermentação foi analisada a partir do coeficiente de similaridade (Correlação de Pearson, Figura 5.19), índices de diversidade (Shannon_H, Figura 5.20) e estimador de riqueza (Chao-1, Figura 5.20) para bactérias e fungos.

Figura 5.19. Perfil de bandas do DGGE para (a) Bactérias e (b) Fungos dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H_2 , ácidos orgânicos e álcoois.

Ensaio 1) pH 7,0, 30°C, 180 rpm, *headspace* 50%, sem bio-aumentação, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 2) pH 7,0, 50°C, sem agitação, *headspace* 70%, sem bio-aumentação, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 3) pH 4,0, 50°C, 180 rpm, *headspace* 50%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura; 4) pH 7,0, 30°C, 180 rpm, *headspace* 70%, sem bio-aumentação, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura; 5) pH 7,0, 50°C, sem agitação, *headspace* 70%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura; 6) pH 7,0, 50°C, 180 rpm, *headspace* 50%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 7) pH 4,0, 50°C, 180 rpm, *headspace* 70%, sem bio-aumentação, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura; 8) pH 4,0, 30°C, 180 rpm, *headspace* 70%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 9) pH 4,0, 30°C, sem agitação, *headspace* 70%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 10) pH 7,0, 30°C, sem agitação, *headspace* 50%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura; 11) pH 4,0, 50°C, sem agitação, *headspace* 50%, sem bio-aumentação, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 12) pH 4,0, 30°C, sem agitação, *headspace* 50%, sem bio-aumentação, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura; 13, 14 e 15) pH 5,5, 40°C, 90 rpm, *headspace* 60%, bio-aumentação 10%, polpa e casca 4 g L⁻¹, água 18,5 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 1 g L⁻¹.

Por meio do dendograma do domínio Bactéria obteve-se dois grupos principais: (i) ensaios 1, 4, 10, 13 e consórcio microbiano (Similaridade de Pearson de 35%) com produção de H_2 entre 8 a 82 mL de H_2 e (ii) ensaios 2, 5, 6, 8, 9 e 12 (Similaridade de Pearson de 10%) com reduzida ou ausência de produção de H_2 (máxima de 3 mL de H_2). A partir disso, pode-se inferir que maior produção de H_2 nos ensaios 1, 4, 10 e 13 foram consequência de populações microbianas diferentes. Ratti et al. (2013) observaram resultados diferentes daqueles dos ensaios 1, 4, 10, 13, cujo coeficiente de similaridade de 88% foi obtido para a comunidade bacteriana de reatores com produção de H_2 próxima (19,9 e 21,2 mmol H_2) mas concentração de substrato diferente (2,5 e 5 g L^{-1} de celulose, respectivamente) em reatores em batelada com celulose como substrato, lixiviado de aterro sanitário como inóculo mantidos a 37 °C e pH 7,0. No caso específico dessa pesquisa, provavelmente devido as diferentes proporções de água residuária, casca e polpa, além da bio-aumentação foram favoráveis para obtenção de menor similaridade entre as populações das condições experimentais, acrescido do fato da constituição do consórcio microbiano por fungos e bactérias.

Maior similaridade de 84% foi observada para as populações de bactérias entre os ensaios 1, 4 e 10, (Figura 5.19), provavelmente devido as condições de operação em pH 7,0 e 30 °C (Tabela 4.3). Independentemente da produção de H_2 no ensaio 4 ter sido menor (8 mL H_2 com 7 g DQO L^{-1} de água residuária) em relação aos ensaios 1 e 10 (82 e 40 mL H_2 , respectivamente, com 30 g DQO L^{-1} de água residuária), valor elevado de similaridade foi observado, provavelmente relacionado com populações de bactérias envolvidas em outras vias do metabolismo celulolítico e fermentativo. Por exemplo, Wu et al. (2016) observaram em reator semi-contínuo com resíduo de alimentos e lodo de tanque de sedimentação que a atividade fermentativa foi consequência de populações bacterianas próximas, cuja dominância foi de representantes semelhantes a Bacteroidetes, quando ácido acético e propiônico eram produzidos.

Baixa similaridade (48%) foi observada para as populações bacterianas dos ensaios 8 e 9 (Figura 5.19), quando submetidos as condições de pH 4,0, 30 °C e 20% de bio-aumentação (Tabela 4.3). Baixa similaridade deveu-se possivelmente ao aumento da adição de resíduo de casca e polpa de 2 (ensaio 8) para 6 g L^{-1} no ensaio 9, o que conduziu ao acréscimo das bactérias nativas dos resíduos. Isto porque durante a fermentação para a obtenção do consórcio microbiano, confirmou-se por microscopia a presença de bactérias autóctones aos resíduos de café. Estes

argumentos também explicam similaridade de apenas 10% na comparação das populações dos ensaios 8 e 9 (20% de bio-aumentação) com aquelas do ensaio 12 (sem bio-aumentação), indicando que a bio-aumentação foi importante para o estabelecimento da comunidade bacteriana.

O coeficiente de similaridade das populações de bactérias dos ensaios 2 e 6 foi de 74%, nas condições de fermentação de 50 °C, pH 7,0 e água residuária de 7 g DQO L⁻¹ (Tabela 4.3). No entanto, quando comparados aos ensaios 2, 6 e 5 a similaridade foi de 28%, devido a maior concentração de água residuária neste último ensaio (30 g DQO L⁻¹). Jung et al. (2012) confirmaram a presença de microrganismos semelhantes a *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Clostridium thermoamylolyticum* e *Klebsiella* sp. durante a fermentação de água residuária de café sem adição externa de inóculo em reator UASB a 55 °C e pH 5,5. Provavelmente, quando a água residuária foi adicionada, os microrganismos autóctones deste resíduo alteraram a estrutura da comunidade microbiana.

Para os fungos, ensaios sob condições de meio ácido (entre 4,0 e 5,5) e temperatura mesofílica (entre 30 e 40 °C) foi observado 74% de similaridade entre as populações dos ensaios 9, 12, 13 e consórcio microbiano (pH de obtenção do consórcio de 4,9 e 37 °C).

Os mesmos resultados foram observados em pH inicial 7,0 e 50 °C verificando-se populações fúngicas com 85% de similaridade para os ensaios 2 e 6, e 30% entre aquelas dos ensaios 2, 5 e 6. Embora, todos os ensaios tenham sido submetidos às mesmas condições de pH e temperatura, no ensaio 5 ocorreu alteração da população de fungos devido a concentração de água residuária (30 g DQO L⁻¹), e presença de bactérias fermentativas e fungos autóctones.

Do mesmo modo, verificou-se 90% de similaridade quando o pH foi 7,0 e temperatura de 30 °C entre os ensaios 1 e 4 (sem bio-aumentação), diminuindo para 30% entre as populações dos ensaios 1, 4 e 10. No ensaio 10, provavelmente ocorreu alteração da população de fungos devido a condição de bio-aumentação de 20%, o qual alterou a estrutura microbiana.

Como observado, iguais condições de pH e temperatura foram os fatores mais importante que afetaram as comunidades bacterianas e fúngicas. Boboescu et al. (2014) verificaram que mudanças no pH inicial modificam as populações dominantes, por exemplo com superioridade de

Lactobacillus sp. em pH 4,5 e *Clostridium* sp. em pH 6,5. Para isto os autores operaram reatores em batelada a 31 °C, com água residuária industrial e inóculo de planta de tratamento de esgoto. Para populações de fungos, Young et al. (2018) verificaram em condição de pH de 6,6 favoreceu o crescimento fungos semelhantes a *Neocallimastigomycetes* em fermentador ácido de estação de biogás alimentada com esterco de vaca (Young et al., 2018).

Em relação a temperatura, Karadag e Puhakka (2010) também observaram diferenças nas comunidade microbiana durante a produção de H₂ a partir de glicose a diferentes temperaturas (37 – 65 °C), utilizando reator de mistura completa enriquecido com consórcio microbiano de fonte termal. Nesta pesquisa *Clostridium* sp. predominou a 37 – 45 °C, *Bacillus coagulans* a 50 – 55 °C e *Thermoanaerobacterium* sp. a 60 °C. Do mesmo modo, Londero et al. (2012) reportaram mudança na população associada a fermentação de soro de leite com cultivo kefir a 20 - 37 °C, com predominância de bactérias lácticas como *Lactobacillus* sp. e *Lactococcus* sp. a 30 °C, e de leveduras como *Kluyveromyces* sp. e *Saccharomyces* sp. a 20 °C.

Os outros fatores da fermentação não conduziram a mudanças significativas na comunidade microbiana. Por exemplo, alta similaridade de 74% para as populações de bactérias e 85% para as populações de fungos foram observadas entre os ensaios 2 (ausência de agitação, *headspace* de 70%, ausência de bio-aumentação, polpa e casca 2 g L⁻¹) e 6 (180 rpm, *headspace* de 50%, bio-aumentação de 20%, polpa e casca 6 g L⁻¹) sob diferentes condições de fermentação.

Nos ensaios 3, 7, 11 na condição de pH 4,0 e temperatura 50 °C e outras variáveis (Tabela 4.3) não foi possível obter produto da amplificação a partir dos genes do RNAr 16S para bactéria e ITS (Espaçador Interno Transcrito) para fungos. Nesses ensaios verificou-se a ausência de produção de H₂ e menor crescimento microbiano (SST inicial e final de 112 e 115 mg L⁻¹ no ensaio 3, 410 e 266 mg L⁻¹ no ensaio 7, e 346 e 389 mg L⁻¹ no ensaio 11, respectivamente, Tabela 5.8). Portanto, sem a presença de biomassa microbiana ativa não foi possível avaliar as populações microbianas. Este resultado evidencia a inibição das bactérias e fungos autóctones dos resíduos de café na combinação dos fatores ambiente com pH ácido e temperatura termofílica. Andorrà et al. (2010) citam baixa sensibilidade do método de DGGE para o estudo de leveduras durante a fermentação alcoólica de uvas com microrganismos autóctones a temperatura entre 13-25 °C, devido a menor detecção de populações pouco dominantes.

Em relação aos índices de diversidade para bactérias (Figura 5.20) dos ensaios submetidos às condições de pH 7,0 e 30 °C e outras variáveis (ensaios 1, 4 e 10, Tabela 4.3), evidenciou-se maior diversidade de Shannon_H (2,52) e estimador de riqueza de Chao-1 (17) no ensaio 1, no qual verificou-se máximo P de 82 mL H₂ com 30 g DQO L⁻¹ de água residuária. Portanto, alta diversidade de bactérias favoreceu a produção de H₂ a partir de resíduos de café, possivelmente devido à complexidade dos substratos e necessidade de ampla variedade de reações para sua degradação. No entanto, no ensaio 4 verificou-se menor índice de diversidade de Shannon_H (1,97) e estimador de riqueza de Chao-1 (10), para 7 g DQO L⁻¹ de água residuária (ensaios 1 e 10). Efeitos da concentração de substratos sobre a diversidade bacteriana também foram relatados por Kim et al. (2006), durante a operação de reatores de mistura completa com sacarose a 35 °C, pH 5,4 e 200 rpm. Os autores evidenciaram que disponibilidade superior de substratos foram favoráveis a bactérias relacionadas com a produção de H₂, tais como *Clostridium butyricum*, *C. saccharobutylicum*, *C. acidisoli*, *C. acetobutylicum* e *C. tyrobutyricum*.

Figura 5.20. Índices ecológicos para Bactérias e Fungos dos reatores em batelada avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H_2 , ácidos orgânicos e álcoois.

Ensaio 1) pH 7,0, 30°C, 180 rpm, *headspace* 50%, sem bio-aumentação, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 2) pH 7,0, 50°C, sem agitação, *headspace* 70%, sem bio-aumentação, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 4) pH 7,0, 30°C, 180 rpm, *headspace* 70%, sem bio-aumentação, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura; 5) pH 7,0, 50°C, sem agitação, *headspace* 70%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura; 6) pH 7,0, 50°C, 180 rpm, *headspace* 50%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 8) pH 4,0, 30°C, 180 rpm, *headspace* 70%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 9) pH 4,0, 30°C, sem agitação, *headspace* 70%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹; 10) pH 7,0, 30°C, sem agitação, *headspace* 50%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura; 12) pH 4,0, 30°C, sem agitação, *headspace* 50%, sem bio-aumentação, polpa e casca 2 g L⁻¹, água 7 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura; 13, 14 e 15) pH 5,5, 40°C, 90 rpm, *headspace* 60%, bio-aumentação 10%, polpa e casca 4 g L⁻¹, água 18,5 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 1 g L⁻¹.

Esta mesma observação pode ser aplicada aos resultados observados nos ensaios 8, 9 e 12 em pH 4,0 e 30 °C e outras variáveis (Tabela 4.3). Água residuária mais concentrada (30 g DQO L⁻¹) conduziu a maior diversidade e riqueza de bactérias (Shannon_H de 2,04 e Chao-1 de 9) no ensaio 8, quando comparado com o ensaio 9 (Shannon_H de 1,92 e Chao-1 de 8) e com o ensaio 12 (Shannon_H de 1,29 e Chao-1 de 5) com 7 g DQO L⁻¹.

Os ensaios 2, 5 e 6 foram submetidos às condições de pH 7,0 e 50 °C e outras variáveis (Tabela 4.3). No ensaio 6 observou-se índice de diversidade (Shannon_H de 2,42) e estimador de riqueza (Chao-1 de 19) maiores, enquanto, no ensaio 5 o índice de diversidade (Shannon_H 1,27) e riqueza (Chao-1 5) foram menores e estiveram relacionados com maior obtenção de produtos, tais como ácido láctico, acético e etanol, sugerindo que as populações de bactérias lácticas foram favorecidas e podem ter inibido outras populações de bactérias. Segundo Sikora et al., (2013) as bactérias lácticas têm a capacidade de sintetizar bacteriocinas, podendo assim eliminar outras bactérias. Por exemplo, Noike et al. (2002) observaram síntese de bacteriocinas por bactérias lácticas que inibiram a atividade de *Clostridium* sp. durante a produção de H₂ a partir de resíduo da fabricação de coalhada em pH 7,0 – 8,0 e 35 °C (Noike et al., 2002). Similarmente, Rosa et al. (2016) observaram a síntese de peptídeos antimicrobianos por bactérias lácticas como *Lactococcus* sp., durante a operação de reator de leito fluidificado alimentado com soro de queijo (3 – 10 g DQO L⁻¹) em TDH 6 - 14 h, pH 4,0 – 4,5, 30 °C e inoculado com lodo de reator UASB de água residuária de suinocultura tratado termicamente.

Para os fungos observou-se para os ensaios 1, 4 e 10, diversidade (Shannon_H de 2,58) e estimador de riqueza (Chao-1 de 19) maiores no ensaio 4, contrariamente as populações de bactérias cuja diversidade (Shannon_H 1,97) e estimador de riqueza (Chao-1 10) foram menores. Provavelmente, isso foi devido à maior disponibilidade de material lignocelulósico (6 g L⁻¹ de polpa e casca) e menor de material dissolvido (7 g DQO L⁻¹ de água residuária), o qual favoreceu os fungos por possuírem as enzimas para a degradação de celulose, celobiose e celodextrinas em reações hidrolíticas sobre a casca e polpa de café (Dashtban et al., 2009).

Nos ensaios 9 e 12 os índice de diversidade (Shannon_H) e estimador de riqueza (Chao-1) foram de 1,25 e 4 e de 1,27 e 6, respectivamente. Provavelmente, as condições aplicadas nesses ensaios não foram adequadas para o desenvolvimento de fungos (pH 4,0 e 30 °C), afetando a atividade hidrolítica e a produção de metabólitos para a fermentação. Inclusive no ensaio 8 (pH 4,0 e 30 °C) não foi possível obter amplificação do DNA fúngico, no entanto, a inibição foi descartada uma vez que obteve-se 75% de redução de carboidratos (Figura 5.15). Este resultado foi diferente do obtido por Najafpoor et al. (2015) durante a operação de reator em batelada

sequencial anaeróbia com *Saccharomyces cerevisiae* e fenol como substrato. Os autores observaram atividade da levedura em pH entre 4,0 e 9,5 com degradação entre 80 e 99% do fenol (Najafpoor et al., 2015).

Em relação ao índice de diversidade e riqueza de fungos dos ensaios em pH 7,0 e 50 °C, nos ensaios 2 (Shannon_H 2,87 e Chao-1 24) e 6 (Shannon_H 2,46 e Chao-1 17) foram maiores, quando comparado com o ensaio 5 (Shannon_H 1,61 e Chao-1 8). Possivelmente a menor concentração de água residuária (7 g DQO L⁻¹) nos ensaios 2 e 6 tenha favorecido o desenvolvimento dominante de fungos. Isto porque com resíduos de café verificou-se que as bactérias são os microrganismos abundantes em água residuária (Jung et al., 2012) enquanto os fungos na casca de café (Eida et al., 2011).

Em relação ao consórcio microbiano (Figura 5.20), observou-se que o índice de diversidade de Shannon_H e estimador de riqueza de Chao-1 foram de 2,14 e 13 para bactérias e de 1,56 e 6 para fungos, respectivamente. Tal consórcio autóctone dos resíduos de café era composto de bactérias e fungos, com maior diversidade de bactérias. Fenh et al. (2016) estudaram os microrganismos associados ao processamento úmido de café, e identificaram bactérias, leveduras e fungos filamentosos responsáveis pela hidrólise de pectina e mucilagem com produção de ácidos orgânicos, no entanto, com diversidade inferior de fungos filamentosos devido à inibição por leveduras.

Amostras do consórcio microbiano, e dos ensaios 9 e 13-14-15 (representando o ponto central do delineamento experimental PB12) foram sequenciadas com o objetivo de identificar diferenças na comunidade microbiana e genes funcionais entre microrganismos autóctones aos resíduos de café, nos quais foram observados produção de ácido láctico (ensaio 9) e etanol (ensaios 13-14-15). Obteve-se platôs para as curvas de rarefação dos dados taxonômicos (Figura 5.21 e 5.22), indicando que a informação coletada representou satisfatoriamente a comunidade microbiana.

Figura 5.21. Curvas de rarefação do consórcio microbiano para descrever a riqueza de famílias e gêneros dos reatores em batelada da avaliação dos fatores físicos, químicos e biológicos na fermentação.

Figura 5.22. Curvas de rarefação do ensaio 9 (azul) e ensaios 13-14-15 (vermelho) para descrever a riqueza de famílias e gêneros dos reatores em batelada da avaliação dos fatores físicos, químicos e biológicos na fermentação.

Em relação às condições do ensaio 9, obteve-se maior estimador de riqueza Chao-1 (758,2, comparado com 442,4 no consórcio microbiano e 433,8 nos ensaios 13-14-15). No entanto, verificou-se maior diversidade de Shannon_H nos ensaios 13-14-15 (1,84 comparado com 0,89 no consórcio microbiano e 1,44 no ensaio 9). Maior riqueza (maior número de gêneros) no ensaio 9 e diversidade (maior variedade de gêneros) nos ensaios 13-14-15, provavelmente foram consequência do aumento da população do consórcio microbiano com a adição de resíduos

nos reatores em batelada, devido à presença de bactérias e fungos autóctones na água residuária, polpa e casca.

Por meio da avaliação taxonômica (Figuras 5.23 e 5.24) verificou-se abundância relativa de 94,7%, 95% e 91,6% relacionadas com o domínio Bactéria, 0,01%, 1,2% e 0,87% com o domínio Eucariota e 0,01%, 0% e 0% com o domínio Archaea para o consórcio microbiano, ensaio 9 e ensaios 13-14-15, respectivamente. Em todos os ensaios verificou-se comunidade bacteriana semelhante (~ 92%), com capacidade das bactérias para fermentar vários substratos e obter diferentes produtos segundo as condições ambientais. Para o domínio Eucariota, a população fúngica representou 0,092%, 0,008% e 0,003% de abundância relativa no consórcio microbiano, ensaios 9 e 13-14-15, respectivamente. A diminuição da população de fungos do consórcio microbiano para o final da fermentação dos ensaios 9 e 13-14-15, pode estar relacionado com ambiente restritivo para o crescimento, devido à alta concentração de carboidratos solúveis (originados da hidrólise da polpa e casca e água residuária concentrada), condição que afeta a população dos fungos (Nagpal et al., 2009). A abundância relativa de Archaea de 0,17% no consórcio microbiano indica contaminação, uma vez que o CH₄ não foi detectado neste reator.

Bactérias da família Clostridiaceae (89,2%) foram as mais abundantes no consórcio microbiano, Lactobacillaceae (68,2%) e Acetobacteraceae (16,1%) no ensaio 9 e Clostridiaceae (34,6%), Lactobacillaceae (33,6%) e Acetobacteraceae (13,9%) nos ensaios 13-14-15 (Figura 5.23). Clostridiaceae foi referenciada como a principal família relacionada com a produção de hidrogênio em reatores anaeróbios (Tapia-Venegas et al., 2015), sendo importante para a transformação de resíduos de café em bioenergia. Por outro lado, representantes da família Lactobacillaceae foram caracterizados pela sua ampla capacidade fermentativa, com produção de ácido láctico, etanol, CO₂, ácido fórmico e succínico a partir de carboidratos (Holzapfel and Wood, 1995). Bactérias pertencentes a família Lactobacillaceae tem capacidade de crescimento em pH 4,0 (Holzapfel e Wood, 1995), explicando superior abundância relativa observada para esta família no ensaio 9. As bactérias da família Acetobacteraceae são comumente encontradas em ambientes ácidos como frutas (Komagata et al., 2014), pelo qual, podem ter sido originadas da polpa e casca de café, explicando sua presença no ensaio 9 e ensaios 13-14-15.

Figura 5.23. Grupos taxonômicos para (a) Famílias e (b) Gêneros de Bactérias no consórcio microbiano, ensaios 9 e 13-14-15 dos reatores em batelada avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H₂, ácidos orgânicos e álcoois.

Clostridium sp., *Lactobacillus* sp. e *Acetobacter* sp. foram os principais gêneros de bactérias identificados em todos os ensaios (Figura 5.23). No consórcio microbiano observou-se abundância relativa de 76,9% de *Clostridium* sp., gênero referenciado por sua capacidade de

fermentação de açúcares para a produção de ácido butírico, e de celulose para a síntese de álcoois e ácidos orgânicos (Lynd et al., 2002).

Verificou-se aumento da abundância relativa de *Lactobacillus* sp. de 2,9% no consórcio microbiano para 67,8% no ensaio 9. Representantes deste gênero são ácido-tolerantes e tem metabolismo fermentativo em meio ácido como pH 3,5 (Abdel-Rahman et al., 2013), condições similares as observadas durante o ensaio 9 (pH inicial 4,0 e concentração de ácidos 2.199 mg L⁻¹). A população de *Acetobacter* sp. foi significativa no ensaio 9 de 15,5%, no entanto, bactérias deste gênero foram caracterizadas por ter metabolismo aeróbio (Yamada et al., 2017). Sua identificação pode significar a presença de DNA de *Acetobacter* sp. (provavelmente a partir dos substratos), mas não necessariamente atividade metabólica, uma vez que esta metodologia amplifica todos os genomas presentes na amostra, inclusive de microrganismos aeróbios presentes nos substratos. Joyeux et al. (1984) estudaram o crescimento de bactérias do ácido acético durante as diferentes fases de produção de vinho, e observaram que *Acetobacter pasteurianus* e *A. aceti* podem sobreviver a processos aeróbios e anaeróbios, crescendo durante curtas exposições do vinho ao ar (Joyeux et al., 1984). Os resultados destes autores podem explicar a presença de bactérias do gênero *Acetobacter* sp. em amostras coletadas de reatores sob condições anaeróbias.

Outros gêneros identificados no ensaio 9 foram *Paenibacillus* sp. (3,2%). *Anoxybacillus* sp. (2,4%) e *Bacillus* sp. (2,2%) da família Bacillaceae. Bactérias relacionadas com esta família são normalmente identificadas em alimentos fermentados (Mandic-Mulec et al., 2016), por tanto, sendo originadas dos resíduos de café. A abundância relativa superior no ensaio 9 pode ser consequência da sua capacidade de formação de endósporos (Mandic-Mulec et al., 2015), que permitem sobreviver às condições ambientais restritivas ajustadas neste ensaio.

Nas amostras dos ensaios 13-14-15 coabitou *Lactobacillus* sp. (33,4%), *Clostridium* sp. (22,6%) e *Acetobacter* sp. (13,4%) como consequência do meio com pH neutro observado no final da fermentação (7,5 no ensaio 13, 6,4 no ensaio 14 e 6,6 no ensaio 15), adequado para o crescimento de vários gêneros de bactérias (de Sá et al., 2014). *Hungatella* sp. (3,3%) da família Clostridiaceae foi identificada nestes ensaios, devido ao crescimento ótimo em pH 7,0 e 30 °C (Kaur et al., 2014), condições semelhantes as observadas no final destes ensaios (meio com pH neutro e 40 °C). Além disso, *Hungatella* sp. produz ácido acético, etanol, H₂ e CO₂ a partir da

glicose (Kaur et al., 2014), metabólitos observados no final da fermentação dos ensaios 13, 14 e 15 (Tabela 5.9 e Figura 5.17). *Lachnoclostridium* sp. possivelmente foi favorecida neste ensaio (3,2%) devido à preferência por ambientes mesofílicos e em pH neutro, e habilidade de fermentar mono e dissacarídeos para a síntese de ácido acético (Yutin and Galperin, 2013) e observado durante esta fermentação (entre 1.062 e 1.307 mg L⁻¹).

A abundância relativa inferior para os fungos foi verificada nos diferentes ensaios (Figura 5.24), com predomínio do filo Ascomycota, sendo de 99,2% no consórcio microbiano, 98,1% no ensaio 9 e 100% nos ensaios 13-14-15. Ascomycota é caracterizada por sua capacidade de degradar material vegetal por meio de enzimas como celulasas e xilanases (Rouches et al., 2016), sendo importante para hidrólise da polpa e casca de café.

Foram observadas abundâncias relativas entre 0,1% a 15,5% para os diferentes gêneros de fungos no consórcio microbiano, ensaio 9 e 13-14-15. Os gêneros fúngicos identificados foram *Saccharomyces* sp. (entre 11,4% e 15,2%), *Kazachstania* sp. (entre 13,8% e 15,2%) e *Lachancea* sp. (entre 4,9% e 6%). Abundância relativa semelhante de fungos nos diferentes ensaios, permitiu inferir que as condições fermentativas não influenciaram o crescimento de gêneros específicos. Portanto, a mesma origem de substratos e a bio-aumentação com o consórcio microbiano foi mais importante para a conformação da comunidade fúngica durante a fermentação e síntese de diferentes produtos metabólicos.

Saccharomyces sp. foi identificado nos grãos de café para a remoção de polpa e material mucilaginoso, com crescimento entre 20 e 45 °C e, pH entre 2,5 e 8,0 e alta concentração de etanol (Kurtzman et al., 2011), adaptando-se às diferentes condições ajustadas nos ensaios. No entanto, observou-se diminuição de *Saccharomyces* sp. do consórcio microbiano (15,2%) para o ensaio 9 (11,4%) e ensaios 13-14-15 (11,9%), possivelmente como consequência de bactérias antagonistas, como as produtoras de ácido lático e ácido acético, uma vez que estes ácidos podem inibir o crescimento de leveduras (Kurtzman et al., 2011). *Saccharomyces* sp. pode ser importante quando o objetivo é a produção de álcool, devido à sua capacidade de transformar carboidratos em etanol com altas concentrações finais (Kurtzman et al. 2011).

Figura 5.24. Grupos taxonômicos para (a) Filos e (b) Gêneros de fungos no consórcio microbiano, ensaios 9 e 13-14-15 dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H₂, ácidos orgânicos e álcoois.

Kazachstania sp. pode fermentar glicose, galactose e sacarose em frutas, adaptando-se a temperaturas entre 25 e 40 °C e tolerando o ácido acético, condições observadas nos ensaios 13-14-15 (entre 1.599 e 1.843 mg L⁻¹) que explica a abundância superior nestes ensaios (15,2%).

Lachancea sp. foi predominante no ensaio 13-14-15 devido à alta concentração de etanol, pois esta levedura pode produzir ácido lático e reduzir os ácidos voláteis em substratos alcoólicos

como o vinho (Gobbi et al., 2013), explicando concentrações de ácidos voláteis inferiores no final da fermentação dos ensaios 13, 14 e 15 (inicial de 5.833 e final de 1.892 mg L⁻¹).

Kazachstania sp. e *Lachancea* sp. podem usar alguns ácidos orgânicos produzidos pelas bactérias do ácido láctico (Magalhães et al., 2011), justificando sua abundância superior no ensaio 9 e ensaios 13-14-15, aonde esses grupos de bactérias (*Lactobacillus* sp.) eram superiores (Figura 5.23 e 5.24).

Em outros estudos foram identificadas microrganismos como *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, e *Pichia anomala* durante o processamento semi-seco de café (Vilela et al., 2010), portanto, os resíduos de café foram uma fonte importante de microrganismos com metabolismo hidrolítico, fermentativo e de produção de H₂. Bactérias ácido lácticas, como *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Lactococcus lactis*, afetaram a produção de H₂ reator UASB alimentado com água residuária de café (Jung et al., 2011b), referenciando sua presença natural nesses resíduos e explicando a necessidade do controle operacional para a produção de metabólitos desejados.

De acordo com as análises taxonômicas, neste estudo a produção de H₂ foi principalmente devido ao metabolismo de *Clostridium* sp. (predominante no consórcio microbiano), a produção de ácido láctico de *Lactobacillus* sp. (predominante no ensaio 9) e a produção de etanol e ácido acético da associação entre *Lactobacillus* sp. e *Clostridium* sp., evidenciando que fatores da fermentação como temperatura, pH e concentração de substratos modificaram a estrutura da comunidade microbiana.

O perfil funcional no consórcio microbiano, ensaios 9 e 13-14-15 foi estudado através de anotação de KOs (Ortologia KEGG) da base de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), que representam genes/proteínas com funções específicas. A partir das curvas de rarefação construídas com números de KO observou-se platô (Figura 5.25). Portanto, as informações sequenciadas foram suficientes para explicar a diversidade funcional nos reatores.

O estimador de riqueza Chao-1 para os KOs foi no ensaio 9 (5.498) quando comparado com o consórcio microbiano (3.760) e os ensaios 13-14-15 (4.119). No entanto, observou-se maior variedade de genes nos ensaios 13-14-15 com diversidade de Shannon_H de 7,30,

comparado com 7,18 no consórcio microbiano e 3,31 no ensaio 9, o qual corresponde com a diversidade de gêneros observado neste último ensaio (Shannon_H de 1,84).

Durante a análise dos KO verificou-se abundância relativa entre 3,2 e 4,2% para o metabolismo de energia, entre 7,9 e 10% para o metabolismo de carboidratos, entre 5,7 e 6,5% para metabolismo / famílias de enzimas, entre 16,1 e 17,3% para transporte / catabolismo e transporte de membrana, entre 0,7 e 1% para degradação e metabolismo de xenobióticos (Figura 5.26). As funções citadas estão relacionadas aos metabolismos observados nos diferentes ensaios, como degradação de resíduos de café, fermentação, produção de energia e de metabólitos dissolvidos. Soares et al. (2018) observaram 16,2% de metabolismo de carboidratos em reator em batelada com produção de H_2 a partir do bagaço de cana-de-açúcar (37 °C, 3,4 g L⁻¹ de extrato de levedura, 5 g L⁻¹ de bagaço de cana-de-açúcar e compostagem de resíduos alimentares como inóculo). Na presente pesquisa com resíduos de café verificou-se valores menores (7,9 - 10%), devido a diferenças nos substratos e condições operacionais que estimulou comunidade microbiana e funções metabólicas específicas.

Figura 5.25. Curvas de rarefação para riqueza de KOs no (a) Consócio microbiano (b) Ensaio 9 (c) Ensaios 13-14-15 dos reatores em batelada avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H_2 , ácidos orgânicos e álcoois.

Figura 5.26. Composição do nível 2 do KEGG para o consórcio microbiano, ensaios 9 e 13-14-15 dos reatores em batelada avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H₂, ácidos orgânicos e álcoois.

As análises dos genes funcionais foram focadas em metabolismos relacionados à degradação de lignina, fenol, pectina, celulose e hemicelulose, além de acidogênese, acetogênese e enzimas associadas a fungos (Figura 5.27), com total de 145 KOs estudados. Tais metabolismos corresponderam a 4,6%, 3,5% e 3,6% do total de KOs determinado nas amostras de DNA do consórcio microbiano, ensaios 9 e 13-14-15, respectivamente. Obteve-se para o consórcio microbiano foi a amostra com maior número de KOs relacionados com metabolismos relevantes para a degradação de resíduos de café, provavelmente devido ao processo de bio-aumentação. Segundo Sivagurunathan et al. (2016), a bio-aumentação permite a seleção de enzimas especializadas, explicando o aumento na detecção de KOs para funções metabólicas sobre a

lignocelulose, pectina, fenóis e fermentação de carboidratos, compostos comumente observados nos resíduos do café.

Figura 5.27. Abundância relativa* de enzimas e números KO relacionados com a degradação de resíduos de café (Degradação de lignina e fenol, degradação de celulose e hemicelulose, degradação de pectina, acidogênese, acetogênese, produção de hidrogênio e enzimas de fungos) no (a) Consórcio microbiano, (b) Ensaio 9 e (c) Ensaios 13-14-15.

*Abundância relativa calculada com o total de reads para enzimas encontradas no consórcio microbiano (105.541), ensaio 9 (374.969) e ensaios 13-14-15 (197.698).

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

*Abundância relativa calculada com o total de reads para enzimas encontradas no consórcio microbiano (105.541), ensaio 9 (374.969) e ensaios 13-14-15 (197.698).

A partir do aprofundamento no estudo desses metabolismos no consórcio microbiano verificou-se 7% de genes relacionados a degradação de lignina e fenol, 37,9% de genes da degradação de celulose e hemicelulose, 33,7% relacionados a acidogênese, 0,1% a acetogênese, 12,7% a produção de hidrogênio e 8,6% a enzimas associadas a fungos (Figura 5.27a). Estas enzimas foram importantes para a transformação dos resíduos de café, porque participam da hidrólise de polímeros, conversão de carboidratos em ácidos orgânicos, produção biogás e de efluentes menos inibitórios devido à degradação do fenol. Além disso, os fungos possuem enzimas como celulases, hemicelulases e ligninases (Dashtban et al., 2009) que contribuem com a hidrólise adicional de polpa e casca.

No consórcio microbiano, o metabolismo mais importante foi a relacionado a degradação de celulose e hemicelulose, com o K01223 (3%) e K01811 (3,3%) correspondendo a 6-fosfo-beta-glicosidase (EC 3.2.1.86, K01223) e alfa-D-xilosido xilohidrolase (EC 3.2.1.177, K01811), respectivamente. Ambas enzimas são da família das hidrolases glicosídica,s a primeira age sobre os carboidratos produzindo glicose e outros monossacarídeos, sendo encontrada em *Escherichia coli* e *Lactobacillus lactis* (Yang et al., 2013). A alfa-D-xilosido xilohidrolase de bactérias como *Clostridium cellulovorans*, participam da degradação do galactomanana da hemicelulose (Aburaya et al., 2015).

O segundo metabolismo predominante no consórcio microbiano foi observação de genes relacionados a acidogênese (33,7%). Para K00016 (L-lactato desidrogenase, EC 1.1.1.27) e K04072 (acetaldeído desidrogenase / álcool desidrogenase, EC 1.2.1.10) observou-se abundância relativa de 2,5% e 4,7%, respectivamente. Via L-lactato desidrogenase ocorre a transformação de piruvato em ácido láctico durante o metabolismo heterolático (Abdel-Rahman et al., 2013). Enquanto, a acetaldeído desidrogenase sintetiza o acetaldeído na reação anterior à geração de etanol durante produção de solventes tipo clostrídios (Yan and Chen, 1990). Por meio desses resultados pode-se inferir sobre a origem dos metabolismos observados no ensaio 9 com produção de ácido láctico de 144 mg L⁻¹, e no ensaio 13-14-15 com produção de etanol de ~ 1.602 mg L⁻¹. No entanto, foi importante considerar a identificação de genes relacionados a butirato quinase (2,5%, K00929, EC 2.7.2.7) e acetato quinase (1%, K00925, EC 2.7.2.1), porque por

meio da ação dessas enzimas tem-se a formação de ácido butírico e acético a partir de ácido láctico em reatores com interações entre bactérias lácticas e clostrídios (Sikora et al., 2013), como o observado no consórcio microbiano (*Lactobacillus* sp. 2,9% e *Clostridium* sp. 76,9%).

Genes relacionados a enzimas associadas a fungos contribuíram com 8,6% do metabolismo do consórcio microbiano. Obteve-se K01958 e K00873 de 4% e 3,5% de abundância relativa, respectivamente, correspondentes a piruvato carboxilase (K01958, EC 6.4.1.1) e piruvato quinase (K00873, EC 2.7.1.40), importantes enzimas para o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de carboidratos (Burke et al., 1983; Pronk et al., 1996). Outras genes relacionados a enzimas como álcool desidrogenase - preferência por propanol (K13953, EC 1.1.1.1) e a aldeído desidrogenase (K00128, EC 1.2.1.3) foram observados com abundâncias relativas de 0,1% e 0,5%, respectivamente, relacionadas à fermentação alcoólica e identificadas em várias leveduras (Bennetzens e Hall, 1982; Abdel-Rahman et al., 2013). Por meio da diversidade de enzimas fúngicas revelou sua importante contribuição para a produção de etanol a partir de resíduos de café.

Em relação ao consórcio microbiano observou-se 12,7% de abundância relativa de genes, relacionados com a piruvato-ferredoxina/flavodoxina oxidoredutase (11%, K03737, EC 1.2.7.1 1.2.7.-) e com genes de diferentes subunidades da piruvato ferredoxina oxidoredutase (EC 1.2.7.1, 0,3% para a subunidade alfa - K00169, 0,3% para a subunidade beta - K00170, 0,1% para a subunidade delta - K00171 e 0,1% para a subunidade gama - K00172). No consórcio microbiano verificou-se predominância de *Clostridium* sp. (76,9%) e 10,4% do metabolismo de degradação do resíduo de café estava relacionado à produção de H₂.

No consórcio microbiano foram também identificados outros genes relacionados com a ferredoxina hidrogenase com 0,1% (K00532, EC 1.12.7.2), a formato desidrogenase com 0,03% (K00122, EC 1.17.1.9) e subunidade principal da formato desidrogenase com 0,7% (K00123, EC 1.17.1.9). Por meio da ação da ferredoxina hidrogenase tem-se a conversão do piruvato em ácido acético, CO₂ e H₂ por fungos anaeróbios, os quais possuem em sua constituição celular organela especial chamada hidrogenossomo (Lee et al., 1977). As duas últimas enzimas são do grupo da formiato desidrogenase, cujos genes foram identificados em leveduras, bactérias aeróbias e anaeróbias para a oxidação do formiato. Em condições anaeróbias, algumas bactérias transformam o formiato em H₂ e CO₂ por meio da enzima hidrogenilase fórmica (Ferry, 1990).

Verificou-se que o metabolismo mais importante no ensaio 9 foi associado a acidogênese (42,4%), sendo desse valor identificados 6% dos genes relacionados a L-lactato desidrogenase (K00016, EC 1.1.1.27) e 5,3% com acetaldeído desidrogenase/álcool desidrogenase (K04072, EC 1.2.1.10 1.1 .1.1). Em função da abundância relativa de 67,8% observada para *Lactobacillus* sp. neste ensaio infere-se sobre a predominância de KOs para o metabolismo do ácido láctico (produção de 144 mg L⁻¹ ácido láctico). A acetaldeído desidrogenase/álcool desidrogenase também foi relacionada com a transformação do acetaldeído em etanol durante a fermentação entérica ácida mista (Hallenbeck, 2009), no entanto, a produção de etanol no ensaio 9 não foi verificada.

Em relação a degradação da celulose e hemicelulose verificou-se 34,1% de abundância relativa, com a identificação de genes relacionados em 4,5% a 6-fosfo-beta-glicosidase (K01223; EC 3.2.1.86), 4,1% para a alfa-galactosidase (K07407, EC 3.2.1.22) e 3,9% para a beta-galactosidase (K01190, EC 3.2.1.23). Galactosidases são relevantes na ruptura da polpa e da casca, uma vez que atuam sobre as mananas e heteromananas da lignocelulose para produzir resíduos de galactose (Malgas et al., 2015), material adequado para a fermentação. Além disso, foram relevantes no ensaio 9 as enzimas necessárias para a degradação do material polimérico da pectina em monossacarídeos, cuja abundância relativa observada foi de 0,03% para genes relacionados a pectato liase (EC 4.2.2.2) (K01728), 0,03% para a ramnogalacturonana exoliase (K18198, EC 4.2.2.24) e 0,03% para ramnogalacturonana endoliase (K18197, EC 4.2.2.23) (Van Dyk and Pletschke, 2012).

Subsequentemente, as enzimas associadas a fungos no ensaio 9 corresponderam à abundância relativa de 9,9%, com 3,9% dos genes relacionados a piruvato quinase (EC 2.7.1.40, K00873), 3% a álcool desidrogenase (EC: 1.1.1.1, K13953) e 1,9% a piruvato carboxilase (EC 6.4.1.1, K01958). Estas enzimas foram relacionadas com fermentação alcoólica de carboidratos em leveduras (Burke et al., 1983; Pronk et al., 1996), no entanto, produção de etanol foi observada neste ensaio. Provavelmente, genes relacionados a álcool desidrogenase foram identificados, mas não foi verificada atividade no processo fermentativo.

No ensaio 9 a abundância relativa maior de 9,2% foi relacionada à degradação de lignina e fenol, em comparação ao consórcio microbiano (7%) e ensaios 13-14-15 (5,6%), com identificação de genes relacionados a enzimas como a desidrogenase de álcool arílico (0,9%, EC 1.1.1.90, K00055) e acetil-CoA C-acetiltransferase (1,4%, EC 2.3.1.9, K00626). Por meio da ação da desidrogenase de álcool arílico tem-se a redução de compostos aromáticos em intermediários de baixa massa molecular durante a degradação da lignina (Muheim et al., 1991). Genes da enzima acetil-CoA C-acetiltransferase foram identificados em *Clostridium acetobutylicum* para a transformação de vários substratos, incluindo compostos aromáticos via degradação do benzoato mediante a coenzima A ligases. Esta enzima transforma acetil-CoA em acetoacetil-CoA, o qual pode ser convertido em ácidos orgânicos e álcoois (Stim-Herndon et al., 1995; Heider e Georg, 1997). Como mencionado acima, estas enzimas podem promover a degradação do fenol para a produção de metabólitos de interesse comercial, reduzindo seus efeitos negativos no meio reacional.

Sobre as condições operacionais do ensaio 9 (pH 4,0, 30 °C, sem agitação, *headspace* 70%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 6 g L⁻¹, água residuária 7 g DQO L⁻¹ e extrato de levedura 2 g L⁻¹) foram verificados KOs relacionados com reações hidrolíticas de bactérias e fungos. Nesse ensaio não foi observado produção de H₂, portanto, isso foi devido a diversidade e riqueza de populações relacionadas somente com a hidrólise, as quais foram provavelmente favorecidas pelas condições de pH 4,0. Sob tais condições obteve-se de 174 a 250 mg SST L⁻¹ de biomassa inicial e final, respectivamente, e 75% de redução de carboidratos (concentração inicial 693 mg L⁻¹).

Em relação as enzimas da acetogênese identificou-se maior proporção de genes no ensaio 9 (1,8%) em comparação com o consórcio microbiano (0,1%) e ensaios 13-14-15 (1%). No entanto, H₂ não foi observado no biogás e a concentração de ácido acético e lático foram baixas (144 e 351 mg L⁻¹, respectivamente). Provavelmente, isso foi relacionado com as populações de bactérias e fungos no ensaio 9, por meio das quais potencializaram a quantificação de KOs do sequenciamento de DNA, no entanto, alguns desses genes não foram funcionais durante a fermentação.

Verificou-se aumento dos KOs para metabolismos microbianos de 105.541 no consórcio microbiano para 197.698, nos ensaios 13-14-15 representando 3,6% do total de KOs na amostra

(Figura 5.27). Acidogênese foi maior nos ensaios 13-14-15 (44,9%), contribuindo com a alta produção de etanol e ácido acético (1.599 e 1.869 mg L⁻¹, respectivamente). Genes relacionados as acetaldéido desidrogenase/álcool desidrogenase (K04072, EC 1.2.1.10 1.1.1.1) e acetato quinase (K00925, EC 2.7.2.1), foram identificados com abundância relativa de 6,9 e 2,9%, respectivamente.

Nos ensaios 13-14-15 genes relacionados com a degradação da celulose e hemicelulose representaram 31,8% dos KOs (Figura 5.27). Os genes mais abundantes (5,8%) foram relacionados com a 6-fosfo-beta-glicosidase (EC 3.2.1.86, K01223). Sob tais condições desses ensaios foi identificado 87,9% de bactérias semelhantes a *Clostridium* sp., as quais possuem atividade hidrolítica e fermentativa e possibilidade de co-produção de H₂, etanol e ácido acético (Hung et al., 2011; Yang et al., 2013).

Nos ensaios 13-14-15 os genes associados as enzimas de fungos representaram 8,2% dos KOs (Figura 5.27), sendo identificados 3,9% relacionados a piruvato quinase (EC 2.7.1.40, K00873) e 1,7% a piruvato carboxilase m (EC 6.4.1.1, K01958). Todavia, menor porcentagem desses genes (4%) foi identificada no consórcio microbiano. Provavelmente, isso foi consequência da diversidade de fungos superior neste ensaio (Shannon_H 2,44 no ensaio 13-14-15 e 1,56 no consórcio microbiano), com possível maior atividade de leveduras com capacidade de produção de etanol.

Na Figura 5.28 desenhou-se proposta de rotas de produção de H₂, ácidos orgânicos e álcoois a partir dos resíduos de café (polpa, casca e água residuária), considerando possíveis substratos observados nos resíduos, produtos metabólicos quantificados nos reatores, enzimas e microrganismos com abundância relativa maior durante a análise de metagenômica. Genes foram identificados e relacionados a enzimas com potencial de transformação de todos os compostos observados nos resíduos de café (lignocelulose, polifenóis, pectina, monossacarídeos, ácidos orgânicos e álcoois) e síntese dos produtos metabólicos quantificados no final da fermentação dos ensaios 9 e 13-14-15 (H₂, etanol, ácido lático e acético).

Clostridium sp. foi o microrganismo mais importante para a co-digestão de resíduos de café, identificado com abundância relativa maior em reações de hidrólise da lignina/fenol (entre

0,004% e 0,128%), celulose e hemicelulose (entre 0% e 0,408%), produção de H₂ (entre 0,079% e 0,413%), etanol (entre 0,012% e 0,089%) e ácido acético (entre 0,001% e 0,034%). *Lactobacillus* sp. foi o segundo microrganismo identificado com maior potencial metabólico, no entanto, não foram identificados genes relacionados a atividade sobre arabinose e xilose, mas, a produção de etanol (entre 0,004% e 0,057%), ácido acético (entre 0,006% e 0,098%) e láctico (entre 0,005% e 0,188%). *Bacillus* sp. foi importante para a degradação da pectina (entre 0% e 0,002%), arabinose (entre 0% e 0,001%) e galactose (entre 0% e 0,002%), e *Paenibacillus* sp. na degradação de todos os constituintes da hemicelulose (entre 0% e 0,014%). Por tanto, os microrganismos autóctones a polpa, casca e água residuária possuíam potencial metabólico para a realização de ampla diversidade de rotas de transformação dos resíduos de café em ácidos, álcoois e H₂.

Por outro lado, verificou-se que a maioria dos genes identificados para todas as amostras analisadas (consórcio microbiano, ensaio 9 e ensaios 13-14-15) foram relacionadas as enzimas de degradação de polifenóis e lignocelulose, observando-se diferenças durante a transformação de monossacarídeos em metabólitos gasosos ou dissolvidos. Similarmente, a degradação da pectina, somente foi verificada no ensaio 9 (0,002%), por tanto as condições deste ensaio (pH 4,0, 30 °C, sem agitação, *headspace* 70%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 6 g L⁻¹, água residuária 7 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹) estimularam superior crescimento de microrganismos com este metabolismo, similares a *Bacillus* sp.

Figura 5.28. Proposta de rota metabólica para produção de H₂, etanol, ácido acético e lático da co-digestão de resíduos de café sob diferentes condições operacionais.

Abundância relativa* para enzimas no consórcio microbiano (Número azul e →, pH 4,9, 37 °C, sem agitação, headspace 60%, polpa e casca 2 g L⁻¹, água residuária 3,5 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 1 g L⁻¹), ensaio 9 (Número verde e →, pH 4,0, 30 °C, sem agitação, headspace 70%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 6 g L⁻¹, água residuária 7 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹), e ensaios 13-14-15 (Número vermelho e →, pH 5,5, 40 °C, 90 rpm, headspace 60%, bio-aumentação 10%, polpa e casca 4 g L⁻¹, água residuária 18,5 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 1 g L⁻¹). Enzimas (EC): 4.2.2.2) Pectato liase, 4.2.2.23) Ramnogalacturonana endoliase, 4.2.2.24) Ramnogalacturonana exoliase, 2.3.1.9) Acetil-CoA C-acetiltransferase, 1.1.1.90) Desidrogenase de álcool arílico, 3.2.1.4) Endoglucanase, 3.2.1.21) Beta-glucosidase, 3.2.1.86) 6-fosfo-beta-glicosidase, 3.2.1.70) Glucano 1,6-alfa-glicosidase, 3.2.1.55) Arabinoxilano arabinofuranohidrolase, 3.2.1.99) Arabinana endo-1,5-alfa-L-arabinosidase, 3.2.1.22) Alfa-galactosidase, 3.2.1.23) Beta-galactosidase, 3.2.1.85) 6-fosfo-beta-galactosidase, 5.3.1.8) Manose-6-fosfato isomerase, 3.2.1.25) Beta-manosidase, 2.7.7.13) Manose-1-fosfato guanililtransferase, 5.4.2.8) Fosfomanomutase, 3.2.1.8) Endo-1,4-beta-xilanase, 3.2.1.37) Xilano 1,4-beta-xilosidase, 3.2.1.177) Alfa-D-xilosido xilohidrolase, 3.2.1.156) Xilanases de extremidades reductoras de oligossacarídeos, 1.2.7.1 1.2.7.-) Piruvato-ferredoxina/ flavodoxina oxidorreductase, 1.2.1.10 1.1.1.1) Acetaldeído desidrogenase/álcool desidrogenase, 2.7.2.1) Acetato quinase, 1.1.1.27) L-lactato desidrogenase.*Abundância relativa calculada considerando o total de KOs nas amostras do consórcio microbiano (2.297.166), ensaio 9 (10.776.878) e ensaios 13-14-15 (5.562.693).

5.5.3. Considerações parciais

A hipótese 4 “*Alterações nos fatores da fermentação permitem aumentar a produção de H₂, ácidos orgânicos e álcoois e modificar a comunidade microbiana*” foi confirmada uma vez que:

- Obteve-se maior produção de H₂ mediante a seleção adequada dos fatores da fermentação, sendo pH 7,0, temperatura 30 °C, *headspace* 50% e alta concentração de substratos (água residuária de 30 g DQO L⁻¹ e polpa e casca de 6 g L⁻¹).
- Obteve-se produtos interessantes para a indústria energética e química, como H₂, etanol, ácido láctico e ácido acético mediante condições específicas de co-digestão da água residuária e resíduo de polpa e casca de café. Observou-se maior proporção de ácido láctico principalmente em pH 4,0 e 30 °C, etanol em pH 5,5 e ácido acético em pH 7,0 e 30 °C. Por meio deste estudo evidenciou-se a possibilidade de usar resíduos de café e microrganismos autóctones na produção de metabólitos com aplicação biotecnológica.
- A riqueza e abundância de bactérias, fungos e genes dos mesmos foi alterada em função das condições operacionais, evidenciando-se alterações na estrutura da comunidade microbiana e processos metabólicos para a síntese de compostos líquidos ou gasosos específicos.
- *Clostridium* sp., *Lactobacillus* sp., *Saccharomyces* sp. e *Kazachstania* sp. com potencial metabólico para a degradação de lignina, fenol, celulose, hemicelulose e pectina, além de realizarem acidogênese, acetogênese e produção de hidrogênio foram identificados.
- As bactérias e fungos autóctones dos resíduos de café foram relacionados com a hidrólise, fermentação e deslignificação sob diversas condições operacionais.

5.6. Avaliação dos fatores da fermentação que conduzem ao consumo de H₂ por homoacetogênese (Hipóteses 5)

5.6.1. Parâmetros cinéticos da produção de H₂

O efeito do pH, *headspace*, concentração de polpa e casca, e água residuária sobre a cinética de produção de H₂ foram avaliados por meio do desenho fatorial fracionado 2⁴⁻¹ (Tabela

5.10 e Figura 5.29 e 5.30), uma vez que foram significativos para a co-digestão de resíduos de café (Seção 5.4 e 5.5). Diante das condições selecionadas, as variáveis respostas mais importantes analisadas foram o potencial máximo de produção de H_2 (P), velocidade máxima de produção de H_2 (R_m) e tempo de início da produção de H_2 (λ), calculados mediante o ajuste dos dados ao modelo de Gompertz modificado (Zwietering et al., 1990).

Figura 5.29. Cinéticas de produção de H_2 acumulado e ajuste ao modelo de Gompertz modificado dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação que conduzem ao consumo de H_2 por homoacetogênese.

Ensaios 1) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 3 g L⁻¹, água 10 g DQO L⁻¹; 2) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 3 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹; 3) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 3 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹; 4) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 3 g L⁻¹, água 10 g DQO L⁻¹; 5) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹; 6) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L⁻¹, água 10 g DQO L⁻¹; 7) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹, água 10 g DQO L⁻¹; 8) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹; 9, 10, 11 e 12) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 20 g DQO L⁻¹.

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

Tabela 5.10: Parâmetros cinéticos da produção de H₂ dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação que conduzem ao consumo de H₂ por homoacetogênese.

Ensaio	Condições Experimentais				Parâmetros cinéticos		
	pH	Headspace (%)	Polpa e casca (g L ⁻¹)	Água residuária (g DQO L ⁻¹)	P (mL H ₂)	Rm (mL H ₂ h ⁻¹)	λ (h)
1	5,5	40	3	10	22	1,4	37,1
2	7,5	40	3	30	135	7,0	21,0
3	5,5	60	3	30	98	4,6	35,5
4	7,5	60	3	10	18	2,7	15,4
5	5,5	40	9	30	189	5,0	32,8
6	7,5	40	9	10	32	4,2	15,5
7	5,5	60	9	10	14	1,4	18,0
8	7,5	60	9	30	125	4,4	22,1
9 PC	6,5	50	6	20	70	2,8	25,7
10 PC	6,5	50	6	20	70	2,6	15,5
11 PC	6,5	50	6	20	31	2,6	16,7
12 PC	6,5	50	6	20	97	6,9	32,1

PC Ponto central, P Potencial máximo de produção de H₂, Rm Velocidade máxima de produção, λ Tempo de início da fermentação.

Figura 5.30. Produção de H_2 dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação que conduzem ao consumo de H_2 por homoacetogênese.

Ensaio 1) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 3 g L⁻¹, água 10 g DQO L⁻¹; 2) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 3 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹; 3) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 3 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹; 4) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 3 g L⁻¹, água 10 g DQO L⁻¹; 5) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹; 6) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L⁻¹, água 10 g DQO L⁻¹; 7) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹, água 10 g DQO L⁻¹; 8) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹; 9, 10, 11 e 12) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 20 g DQO L⁻¹.

Os maiores valores de P de 189, 135 e 97 mL H₂ e Rm de 5,0, 7,0 e 6,9 mL H₂ h⁻¹ foram obtidos nos ensaios 5 (pH 5,5), 2 (pH 7,5) e 8 (pH 6,5), respectivamente. Por meio da análise estatística não foi evidenciado influência significativa do pH sobre o P ($\alpha=0,05$, Tabela 5.11), portanto, foi possível atingir maior produção de H₂ nos três níveis de pH estudados (pH 5,5, 6,5 e 7,5). Isto porque as condições ótimas de produção de H₂ não depende exclusivamente do pH, mas também de outros fatores ambientais e natureza dos substratos (Ruggeri et al., 2015). Neste caso, verificou-se que independente da maior concentração de água residuária (30 g DQO L⁻¹) adicionada em ambos os ensaios de maior produção de H₂ (ensaios 5 e 2) observou-se fermentação em amplo intervalo de pH (5,5 a 7,5, respectivamente).

Tabela 5.11: Análise estatística dos parâmetros cinéticos dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação que conduzem ao consumo de H₂ por homoacetogênese.

	Níveis			P		Rm		λ	
	-1	0	1	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor
Média				80	0,000	4,0	0,000	25,1	0,000
Curvatura				-35	0,137	-0,3	0,786	-4,7	0,424
pH	5,5	6,5	7,5	-3	0,749	1,4	0,003	-12,7	0,000
Headspace (%)	40	50	60	-32	0,001	-1,3	0,007	-4,3	0,059
Concentração de polpa e casca (g L ⁻¹)	3	6	9	21	0,023	-0,1	0,825	-5,2	0,025
Concentração de água residuária (g DQO L ⁻¹)	10	20	30	116	0,000	2,9	0,000	6,4	0,008

P = Potencial máximo de produção de H₂, Rm = Velocidade máxima de produção, λ = Tempo de início da fermentação.

p-valor < 0,05 (95% de confiança)
p-valor < 0,1 e > 0,05 (90% de confiança)

Verificou-se aumento significativo de Rm ($\alpha=0,05$, Tabela 5.11) com alteração do pH de 5,5 para 7,5. Valores de $3,1 \pm 2,0$ mL H₂ h⁻¹ foram obtidos em pH 5,5 (ensaios 1, 3, 5 e 7), $3,7 \pm 2,1$ mL H₂ h⁻¹ em pH 6,5 (ensaios 9, 10, 11 e 12) e $4,6 \pm 1,8$ mL H₂ h⁻¹ em pH 7,5 (ensaios 2, 4, 6 e 8). Este resultado pode ser comparado com o obtido durante a hipótese 4 de “Avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H₂, ácidos orgânicos e álcoois” (Seção 5.5), onde meios de pH neutros foram favoráveis para obtenção de maior valor de Rm (4 mL H₂ h⁻¹ em pH

7,0, ensaio 1), uma vez que possibilitou maior crescimento celular, consumo de carboidratos e atividade metabólica.

Observou-se aumento dos valores de λ com diminuição do pH de 7,5 para 5,5. Valores de $18,7 \pm 3,6$ h foram obtidos em pH 7,5 (ensaios 2, 4, 6 e 8), seguidos de $22,5 \pm 7,9$ h em pH 6,5 (9, 10, 11 e 12) e finalmente $30,9 \pm 8,7$ h em pH 5,5 (ensaios 1, 3, 5 e 7). Como referido na seção 5.5, pH próximo ao neutro favoreceu maior produção de H_2 (P de 189 mL H_2 em pH 7,5, ensaio 5) e, portanto, maior capacidade metabólica com consequente diminuição do tempo de início da fermentação. A diminuição do *headspace* de 60% para 40% favoreceu aumento significativo de P e Rm ($\alpha=0,05$, Tabela 5.11 e Figura 5.29), obtendo-se valores maiores com 40% (189 mL H_2 e 5 mL H_2 h⁻¹, respetivamente, no ensaio 5), intermediários com 50% (67 ± 27 mL H_2 e $3,7 \pm 2,1$ mL H_2 h⁻¹, respetivamente, para os ensaios 9, 10, 11 e 12) e menores com 60% de *headspace* (14 mL H_2 e 1,4 mL H_2 h⁻¹, respetivamente, no ensaio 7). Mesmo com pouco volume de *headspace* e aumento da pH_2 no meio, o acúmulo de biogás na fração gasosa não impediu o deslocamento do H_2 do meio líquido para o gasoso. Segundo Ciranna et al. (2014), maior pH_2 podem conduzir ao decréscimo na síntese de H_2 , levando a mudança de rota para a produção de metabólitos reduzidos, tais como ácido láctico, etanol, butanol e acetona. No entanto, baixa produção de metabólitos reduzidos foram observadas nos ensaios com *headspace* 40% (por exemplo, no ensaio 5, o ácido láctico e etanol foram observados inferiores ao limite de detecção do método cromatográfico), inferindo que, as pH_2 atingidas nestes ensaios não afetaram a síntese deste gás (P de 189 mL H_2 e Rm de 5 mL H_2 h⁻¹).

Em relação ao volume de *headspace* não foi verificado efeito significativo sobre o λ dentro da faixa estudada. Por exemplo, tempos próximos de 15,4, 15,5, 15,5 h foram obtidos nos ensaios 4, 10 e 6, correspondendo a volumes de *headspace* de 60, 50 e 40%, respetivamente. Possivelmente porque a pH_2 não exerceu efeito direto sobre a velocidade de crescimento da microbiota (Ciranna et al., 2014).

A concentração de polpa e casca aumentou significativamente o P ($\alpha=0,1$, Tabela 5.11). Aumento nos valores de P de 68 ± 58 e 67 ± 27 para 90 ± 82 mL H_2 foram obtidos utilizando-se 3, 6 e 9 g L⁻¹ de polpa e casca, respetivamente. Do mesmo modo, para maior concentração de

polpa e casca foi reduzido o tempo de início da fermentação (λ) de $27,2 \pm 10,7$ h (3 g L^{-1}) para $22,5 \pm 7,9$ h (6 g L^{-1}) e posteriormente para $22,1 \pm 7,6$ h (9 g L^{-1}) ($\alpha=0,1$, Tabelas 5.10 e 5.11).

Verificou-se que maior concentração de polpa e casca tiveram efeito positivo sobre a fermentação, ao representar uma fonte de substrato complexa com maior teor de carboidratos insolúveis (Gouvea et al., 2009), que podem ser aproveitados para a produção de H_2 mediante a hidrólise por enzimas celulolíticas que facilitam sua transformação em material dissolvido. Além disso, este resíduo é obtido em ambientes abertos na fazenda (Seção 5.2) e é constituído da microbiota natural do resíduo que contribuem como inóculo e diminuem o tempo de início da fermentação. Portanto, maior quantidade de polpa e casca podem ser aplicadas, em concentrações que permitem aumentar a obtenção de bioenergia sem causar efeitos negativos na fermentação.

Observou-se também que o aumento da concentração de água residuária de 10 para 30 g DQO L^{-1} influenciou significativamente P , R_m e λ ($\alpha=0,05$, Tabela 5.11). Obteve-se valores máximos de P , R_m e λ no ensaio 5 com 30 g DQO L^{-1} (189 mL H_2 , $5 \text{ mL H}_2 \text{ h}^{-1}$ e $32,8 \text{ h}$, respectivamente), seguido do ensaio 12 com 20 g DQO L^{-1} (97 mL H_2 , $6,9 \text{ mL H}_2 \text{ h}^{-1}$ e $32,1 \text{ h}$, respectivamente) e ensaio 6 com 10 g DQO L^{-1} (32 mL H_2 , $4,2 \text{ mL H}_2 \text{ h}^{-1}$ e $15,5 \text{ h}$, respectivamente). Verificou-se a importância da natureza dos resíduos na fermentação, uma vez que água residuária rica em carboidratos dissolvidos tornou-se substrato adequado para a fermentação (Gómez et al., 2011) e contribuiu para aumento das velocidades de produção de H_2 . Enquanto, o material lignocelulósico (polpa e casca de café) pode ter sua aplicação limitada, devido à dificuldade no processo de hidrólise diante de necessidade de ruptura da lignina e estrutura cristalina da celulose (Gómez et al., 2011; Nissilä et al., 2014).

Em relação ao λ , constatou-se que o aumento da concentração de DQO da água residuária resultou em maior tempo de início da fermentação. Isto pode ser devido à necessidade adicional de enzimas para a conversão do substrato em H_2 , além disso, o aumento da concentração da água residuária eleva proporcionalmente a quantidade de fenóis, requerendo maior tempo de início da fermentação para posterior crescimento de biomassa (Ren et al., 2009).

Apesar do efeito positivo da maior concentração de água residuária, a DQO máxima da água de processamento de café usada nessa pesquisa situa-se em 31 g DQO L^{-1} . Desta forma, o aumento da concentração para níveis superiores a este não é possível nesta pesquisa. Desse modo,

foi fixado o valor de 30 g DQO L⁻¹ como sendo a concentração mais adequada para a fase de otimização da produção de H₂.

5.6.2. Parâmetros físico-químicos

Analizou-se os carboidratos dissolvidos, sólidos suspensos totais (SST) e fenóis totais durante a fermentação em cada ensaio (Tabela 5.12, Figura 5.31). Não se observou relação direta da redução de carboidratos com a produção de H₂ (Figura 5.31), uma vez que obteve-se similar consumo de carboidratos em ensaios com *P* menor de 98 mL H₂ (ensaio 3: redução de carboidratos de 93%, concentração inicial de carboidratos 2.483 mg L⁻¹) e maior de 189 mL H₂ (ensaio 5: redução de carboidratos de 91%, concentração inicial de 2.633 mg L⁻¹). Os carboidratos podem ser convertidos em ácidos orgânicos, etanol e H₂ por ampla variedade de espécies de bactérias (Rosales-Colunga e De León, 2014), portanto, pode-se inferir que nos ensaios com maior redução de carboidratos e baixa *P*, ocorreu a síntese de outros compostos dissolvidos (como ácido acético e butírico, Tabela 5.14). Redução de 100% do conteúdo dos carboidratos não ocorreu em nenhum dos ensaios, provavelmente, a acumulação de ácidos orgânicos, maior pH₂ e menores valores de pH no final da fermentação podem ter contribuído para inibição da atividade acetogênica (Gonçalves et al., 2014).

Foi observado aumento máximo de SST no ensaio 1 (144 para 368 mg L⁻¹) com baixo *P* de 22 mL H₂, e ausência de crescimento celular no ensaio 5 (de 402 a 384 mg SST L⁻¹) com maior *P* de 189 mL H₂, sem relação direta com a produção de H₂. Segundo Palomo-Briones et al. (2017), durante a fermentação cerca de 30 a 50% dos substratos são direcionados para a produção de biomassa (Palomo-Briones et al., 2017), pelo qual, a ausência de crescimento em alguns ensaios (ensaio 3, 4 e 5) podem evidenciar dificuldades na determinação da biomassa mediante análise de sólidos.

Tabela 5.12: Parâmetros físico-químicos dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação que conduzem ao consumo de H₂ por homoacetogênese.

Ensaio	Condições Experimentais				Parâmetros físico-químicos						Produção de H ₂
	pH	Headspace	Polpa e casca	Água residuária	Carboidratos dissolvidos		SST		Fenol		P
		(%)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	Inicial (mg L ⁻¹)	Final (mg L ⁻¹)	Inicial (mg L ⁻¹)	Final (mg L ⁻¹)	Inicial (mg L ⁻¹)	Final (mg L ⁻¹)	(mL)
1	5,5	40	3	10	607	79	144	368	121	159	22
2	7,5	40	3	30	2.350	210	410	456	280	452	135
3	5,5	60	3	30	2.483	174	430	306	266	448	98
4	7,5	60	3	10	560	133	190	124	128	1641	18
5	5,5	40	9	30	2.633	224	402	384	260	464	189
6	7,5	40	9	10	545	157	162	333	5.998	1.632	32
7	5,5	60	9	10	525	90	186	358	5.938	1.758	14
8	7,5	60	9	30	2.267	172	496	522	336	406	125
9 PC	6,5	50	6	20	1.427	133	306	373	177	88	70
10 PC	6,5	50	6	20	1.167	127	328	467	236	6.796	70
11 PC	6,5	50	6	20	1.097	137	356	453	211	289	31
12 PC	6,5	50	6	20	1.247	267	592	603	254	6.221	97

PC Ponto central, P Potencial máximo de produção de H₂, Rm Velocidade máxima de produção de H₂, λ Tempo de início da fermentação, SST Sólidos suspensos totais.

Figura 5.31. Redução de carboidratos, aumento dos sólidos suspensos totais (SST), aumento do fenol e Potencial máximo de produção de H_2 (P) dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação que conduzem ao consumo de H_2 por homoacetogênese.

Ensaio 1) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 3 g L^{-1} , água 10 g DQO L^{-1} ; 2) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 3 g L^{-1} , água 30 g DQO L^{-1} ; 3) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 3 g L^{-1} , água 30 g DQO L^{-1} ; 4) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 3 g L^{-1} , água 10 g DQO L^{-1} ; 5) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L^{-1} , água 30 g DQO L^{-1} ; 6) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L^{-1} , água 10 g DQO L^{-1} ; 7) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L^{-1} , água 10 g DQO L^{-1} ; 8) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L^{-1} , água 30 g DQO L^{-1} ; 9, 10, 11 e 12) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 6 g L^{-1} , água 20 g DQO L^{-1} .

Avaliou-se o efeito dos fatores da fermentação (pH, *headspace*, concentração de polpa e casca e água residuária, Tabela 5.13) na redução de carboidratos e aumento de SST. O pH não influenciou significativamente a redução de carboidratos ($\alpha=0,05$, Tabela 5.13), verificando-se valores maiores e menores de consumo de carboidratos nos mesmos níveis de pH. Por exemplo no ensaio 8 e 6, obteve-se reduções de 92 e 71%, ambos em pH inicial 7,5.

Tabela 5.13: Análise estatística dos parâmetros físico-químicos dos reatores em batelada de avaliação do efeito das características físico-químicas da fermentação na homoacetogênese.

	Níveis			Redução de Carboidratos		Aumento de SST	
	-1	0	1	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor
Média				85	0,0000	80	0,0155
Curvatura				2	0,7007	-2	0,9768
pH	5,5	6,5	7,5	-6	0,1447	-38	0,4502
Headspace (%)	40	50	60	1	0,7893	-60	0,2514
Concentração de polpa e casca (g L ⁻¹)	3	6	9	-2	0,5111	24	0,6257
Concentração de água residuária (g DQO L ⁻¹)	10	20	30	12	0,0129	-123	0,0412

SST Sólidos suspensos totais.

p-valor < 0,05 (95% de confiança)
p-valor < 0,1 e > 0,05 (90% de confiança)

Do mesmo modo, não se verificou efeito significativo do pH sobre os SST ($\alpha=0,05$, Tabela 5.13), determinando-se ausência de crescimento celular, tanto em condições de pH 5,5 (ensaio 3: concentração inicial de 430 mg L⁻¹ e final de 306 mg L⁻¹), como em pH 7,5 (ensaio 4: concentração inicial de 190 mg L⁻¹ e final de 124 mg L⁻¹). O pH inicial da fermentação não afetou a produção de biomassa e consumo de carboidratos, possivelmente porque a diversidade de microrganismos do consórcio microbiano de diferentes níveis tróficos, provavelmente com variação de taxas metabólicas e de crescimento a diferentes intervalos de pH (Saady, 2013).

Em relação ao *headspace* verificou-se que este fator não causou efeito significativo na redução de carboidratos e aumento de SST ($\alpha=0,05$, Tabela 5.13). Para as condições de 60, 50 e 40% de *headspace* obteve-se redução de carboidratos próximas; ou seja, de 93% (ensaio 3, 2.483 mg L⁻¹ de carboidratos iniciais), 91% (ensaio 9, 1.427 mg L⁻¹ de carboidratos iniciais) e 91% (ensaio 5, 2.633 mg L⁻¹ de carboidratos iniciais), respectivamente. Aumento similar na concentração de SST também foi obtido em todos os níveis de *headspace* estudado, ou seja, de 186 a 358 mg SST L⁻¹ com 60% de *headspace* (no ensaio 7), de 328 a 467 mg SST L⁻¹ com 50% de *headspace* (ensaio 10) e de 144 a 368 mg SST L⁻¹ com 40% de *headspace* (ensaio 1).

Alguns autores reportaram que maior pH₂ podem inibir o crescimento celular e limitar a transferência de massa (Ciranna et al., 2014). No entanto, ausência de evidências do efeito

inibitório de maior pH_2 na fermentação apontam resultados diferentes aos reportados pelos autores citados, possivelmente, porque as concentrações de H_2 não atingiram níveis suficientemente elevados (discutido no início desta seção).

A concentração de polpa e casca não aumentou significativamente a redução de carboidratos e aumento de SST ($\alpha=0,05$, Tabela 5.13). Obteve-se redução alta de 92% no ensaio 8 (concentração inicial de 2.267 mg L^{-1}) e baixa de 71% no ensaio 6 (concentração inicial de 545 mg L^{-1}) com a mesma concentração de polpa e casca de 9 g L^{-1} . Do mesmo modo, limitado crescimento celular no ensaio 7 (186 no início e $358 \text{ mg SST L}^{-1}$ no final da fermentação) ou manutenção de biomassa no ensaio 5 (402 no início para $384 \text{ mg SST L}^{-1}$ no final da fermentação) foram verificados para 9 g L^{-1} de polpa e casca. Este resultado foi similar ao obtido durante a hipótese 4 “*Avaliação dos fatores da fermentação sobre a produção de H_2 , ácidos orgânicos e álcoois*”, inferindo que baixas velocidades de hidrólise da polpa e casca podem ter conduzido a este resultado (ver Seção 5.5).

O método de determinação do crescimento da biomassa através da análise de sólidos, pode ter limitado a obtenção de resultados adequados (Tabela 5.12). Por exemplo, para reatores nas mesmas condições experimentais (pH 5,5 e 40% de *headspace* nos ensaios 1 e 5), mas com diferentes concentrações iniciais de substratos (ensaio 1: polpa e casca 3 g L^{-1} e água residuária de 10 g DQO L^{-1} e ensaio 5: polpa e casca 6 g L^{-1} e água residuária de 30 g DQO L^{-1}) verificou-se diferença nas concentrações iniciais de SST, com valores de $144 \text{ mg SST L}^{-1}$ no ensaio 1 e $402 \text{ mg SST L}^{-1}$ no ensaio 5. Sendo assim, utilizando-se a mesma concentração de bio-aumentação, os sólidos aumentaram pela adição de polpa, casca e água residuária, que conseqüentemente proporcionaram maior presença natural de microrganismos e material particulado, mascarando os sólidos correspondentes a biomassa e dificultando a quantificação correta do crescimento celular em cada ensaio.

Superior concentração de água residuária aumentou significativamente a redução de carboidratos ($\alpha=0,05$, Tabela 5.13 e Figura 5.31), com valor máximo de 93%, referente a 30 g DQO L^{-1} (ensaio 3, carboidratos iniciais de 2.483 mg L^{-1}), e mínimo de 71%, referente 10 g DQO L^{-1} (ensaio 6, carboidratos iniciais de 545 mg L^{-1}). Como discutido em seções anteriores, este

resultado pode ser devido à predominância de açúcares dissolvidos na água residuária de café, facilitando o consumo dos carboidratos disponíveis a maior concentração deste resíduo.

Observou-se efeito negativo da concentração de água residuária em relação ao aumento de SST ($\alpha=0,05$, Tabela 5.13). Sendo assim, a maior produção de biomassa foi observada na concentração de 10 g DQO L⁻¹ (de 144 a 368 mg SST L⁻¹ no ensaio 1) e a menor a 30 g DQO L⁻¹ (de 430 a 306 mg SST L⁻¹ no ensaio 3 ou de 402 a 384 mg SST L⁻¹ no ensaio 5). Este efeito difere do observado por Ratti et al. (2015), verificando que o incremento na concentração do substrato proporciona maior crescimento dos microrganismos. Os autores observaram para de 2 g L⁻¹ de celulose, aumento em massa celular de 0,6 para 7,4 mg SVT L⁻¹. Este aumento em SVT foi superior em comparação com 0,5 g L⁻¹ de celulose de 0,8 para 6,2 mg SVT L⁻¹, durante a operação de reatores em batelada com bagaço de cana pré-tratado mediante explosão a vapor (200 °C por 7 min) e tratamento alcalino (NaOH 1% m/v, 121 °C, 30 min) em pH 7,0, 55 °C e bagaço *in natura* como fonte de inóculo. No entanto, nos reatores para co-digestão de resíduos de café a hidrólise de material polimérico da água residuária pode ter conduzido a diminuição nas concentrações de SST em alguns ensaios (por exemplo ensaios 3 e 5 com 30 g DQO L⁻¹), não possibilitando relacionar adequadamente o crescimento celular com a concentração de substratos.

A relação dos fenóis com a produção de H₂ foi avaliada nos diferentes reatores em batelada (Tabela 5.12, Figura 5.31). Em 9 ensaios (ensaio 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 11 e 12) verificou-se aumento da concentração de fenóis, de 232 ± 70 mg L⁻¹ no início e 1.875 ± 2.665 mg L⁻¹ no final da fermentação. Tais resultados podem ser consequência da atividade hidrolítica na lignina da polpa e casca de café, uma vez que a degradação da hemicelulose e celulose permite a despolimerização da lignina liberando elementos fenólicos mediante o rompimento de ligações β -O-4 (Waldron, 2010).

Ao contrário, nos ensaios 6, 7 e 9 verificou-se diminuição da concentração de fenóis, de 4.038 ± 3.344 mg L⁻¹ no início e 1.159 ± 930 mg L⁻¹ no final da fermentação. A degradação de fenóis pode ocorrer pela ação de bactérias semelhantes a *Clostridium* sp. para posterior conversão em H₂ (Tai et al., 2010), o qual justificaria o consumo de fenóis observado. Nos ensaios 6 e 7, concentrações baixas iniciais de carboidratos (545 e 525 mg L⁻¹, respectivamente) e maior de fenóis (5.998 e 5.938 mg L⁻¹, respectivamente) podem ter estimulado o aproveitamento dos

fenóis como substratos. No entanto, não foi evidenciada relação direta entre fenóis e produção de H_2 (Figura 5.31).

Inibição das bactérias fermentativas por fenóis a partir de 1.500 mg L^{-1} foram reportadas por Chapleur et al. (2015), embora, não foi observada esta atividade nos ensaios 6 e 7, onde as concentrações de fenóis foram superiores a 5.938 mg L^{-1} . Sendo assim, maiores concentrações de fenóis nestes ensaios não proporcionaram efeitos negativos observáveis na produção de H_2 , crescimento de biomassa ou liberação de metabólitos dissolvidos como ácido acético ou butírico. Bactérias similares a *Clostridium beijerinckii* com resistência a inibidores presentes nos hidrolisados de material lignocelulósico (Quéméneur et al., 2012a) podem estar presentes no consórcio microbiano, uma vez que foi realizado processo de bio-aumentação a partir de resíduos de café, os quais apresentam naturalmente maior concentração de fenol (Mussatto, 2014).

Observou-se maior demanda química de oxigênio dissolvida inicial (DQO, Figura 5.32) nos ensaios com maior concentração de água residuária, polpa e casca (por exemplo, ensaio 5: $27.233 \text{ g DQO L}^{-1}$ com 9 g L^{-1} de polpa e casca e 30 g DQO L^{-1} de água residuária superior ao ensaio 1: $8.267 \text{ g DQO L}^{-1}$ com 3 g L^{-1} de polpa e casca e 10 g DQO L^{-1} de água residuária), confirmando que os substratos contribuíram com matéria orgânica solúvel para a fermentação.

Em todos os ensaios observou-se diminuição da concentração de DQO, de $18.551 \text{ mg DQO L}^{-1}$ no início para $13.210 \text{ mg DQO L}^{-1}$ na fase de estabilização da produção de H_2 (Figura 5.32). Isto pode ser explicado pelas P entre 14 e $189 \text{ mL } H_2$ observadas nos reatores, uma vez que 33% da DQO contida nos resíduos podem ser convertidas em H_2 (Gómez et al., 2011).

Para o final da fermentação, verificou-se aumento da DQO nos ensaios 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 (na fase de estabilização de 11.479 ± 9.492 e final de $17.822 \pm 7.945 \text{ mg L}^{-1}$) e diminuição nos ensaios 3 e 5 (na fase de estabilização de 21.913 ± 513 e final de $19.750 \pm 636 \text{ mg L}^{-1}$). A produção de ácido acético via homoacetogênese contribuiu ao aumento da matéria orgânica dissolvida nos ensaios 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 (discutidos posteriormente na Figura 5.32). Caso contrário, nos ensaios 3 e 5 obteve-se pequenos aumentos em H_2 posterior a 200 h de fermentação (de 74 para $77 \text{ mL } H_2$ no ensaio 3 e de 89 para $92 \text{ mL } H_2$ no ensaio 5,

Figura 5.32), explicando a diminuição da DQO como consequência do retorno para a fermentação H_2 .

Figura 5.32. Demanda química de oxigênio (DQO) e potencial máximo de produção de H_2 (P) dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação que conduzem ao consumo de H_2 por homoacetogênese.

Ensaios 1) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 3 g L⁻¹, água 10 g DQO L⁻¹; 2) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 3 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹; 3) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 3 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹; 4) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 3 g L⁻¹, água 10 g DQO L⁻¹; 5) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹; 6) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L⁻¹, água 10 g DQO L⁻¹; 7) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹, água 10 g DQO L⁻¹; 8) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹; 9, 10, 11 e 12) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 20 g DQO L⁻¹.

Não foi obtida relação direta entre a produção de H_2 e DQO dissolvida (Figura 5.32), observando-se diminuição da DQO nos reatores com maior (ensaio 5) e menor produção de H_2 (ensaio 7). No ensaio 5 de P foi de 189 mL H_2 , observou-se diminuição da DQO de 27.233 para 22.275 mg L⁻¹ do início para a estabilização da produção de H_2 , respectivamente. Do mesmo modo, no ensaio 7 verificou-se decréscimo para a DQO de 8.653 para 6.010 mg L⁻¹, porém o valor de P (14 mL H_2) foi menor quando comparado ao ensaio 5. Sendo a DQO uma medida que abrange toda a matéria orgânica capaz de ser oxidada, compostos que não são utilizados como substratos para a síntese de H_2 podem ser determinados conjuntamente (de Sá et al., 2014), mascarando o efeito da DQO na produção de H_2 .

5.6.3. Ácidos orgânicos, álcoois e pH

Os principais metabólitos observados nos reatores para produção de H₂ foram os ácidos acético, butírico, propiônico e etanol (Tabela 5.14 e Figura 5.33). O isobutanol, *n*-butanol, ácido isobutírico, isovalérico e valérico foram quantificados nos diferentes ensaios, mas as concentrações obtidas foram inferiores ao limite de detecção do método cromatográfico, portanto, não foram considerados durante a presente discussão.

Tabela 5.14: Ácidos orgânicos e álcoois e pH dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação que conduzem ao consumo de H₂ por homoacetogênese.

Ensaio	Fase	pH	Metanol	Etanol	Ácido Acético	Ácido Propiônico	Ácido Butírico	Ácido Láctico
					mg L ⁻¹			
1	Inicial	5,5	≤ LD	1.143	357	29	683	1.181
	Exponencial		43	≤ LD	416	15	537	1.590
	Estabilização	6,7	≤ LD	944	443	25	1.522	117
2	Inicial	7,5	158	3.213	1.025	70	1.439	791
	Exponencial		173	≤ LD	931	130	2.177	5.075
	Estabilização	8,5	150	3.740	642	142	5.122	1.225
3	Inicial	5,5	111	4.058	957	89	1.827	984
	Exponencial		123	4.167	680	88	3.265	3.238
	Estabilização	7,6	≤ LD	3.564	222	45	4.146	1.429
4	Inicial	7,5	≤ LD	921	334	3	450	1.400
	Exponencial		18	667	379	≤ LD	392	1.415
	Estabilização	5,5	≤ LD	416	933	≤ LD	753	26
5	Inicial	5,5	≤ LD	3.093	792	38	1.185	809
	Exponencial		≤ LD	≤ LD	1.079	27	1.034	5.425
	Estabilização	7,7	≤ LD	≤ LD	259	3	2.606	613
6	Inicial	7,5	≤ LD	339	139	≤ LD	122	1.181
	Exponencial		87	1.459	450	21	951	1.604
	Estabilização	5,7	≤ LD	564	869	≤ LD	863	24
7	Inicial	5,5	≤ LD	325	157	≤ LD	154	1.313
	Exponencial		≤ LD	635	331	32	694	1.065
	Estabilização	5,7	≤ LD	199	277	≤ LD	305	28
8	Inicial	7,5	267	3.970	909	68	1.779	3.908
	Exponencial		206	4.115	1.087	106	1.837	4.550
	Estabilização	8,0	277	3.587	1.116	283	4.013	53

Continua.

Continuação da Tabela 5.14

Ensaio	Fase	pH	Metanol	Etanol	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido
					Acético	Propiônico	Butírico	Lático
mg L ⁻¹								
9 PC	Inicial	6,5	≤ LD	2.465	535	≤ LD	761	914
	Exponencial		≤ LD	≤ LD	659	54	963	2.581
	Estabilização	6,3	≤ LD	2.331	1.167	61	3.188	25
10 PC	Inicial	6,5	≤ LD	≤ LD	493	≤ LD	538	2.713
	Exponencial		98	3.095	548	98	1.813	2.888
	Estabilização	5,9	≤ LD	≤ LD	1.845	22	2.445	44
11 PC	Inicial	6,5	≤ LD	1.668	617	21	1.131	2.625
	Exponencial		24	1.628	403	22	1.449	2.345
	Estabilização	7,1	≤ LD	682	818	≤ LD	1.163	57
12 PC	Inicial	6,5	≤ LD	886	403	≤ LD	435	274
	Exponencial		≤ LD	2.534	956	33	1.443	473
	Estabilização	7,1	≤ LD	2.124	1.377	23	2.892	58

≤ LD Inferior ao limite de detecção, PC Ponto central. Ensaios 1) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 3 g L⁻¹, água 10 g DQO L⁻¹; 2) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 3 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹; 3) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 3 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹; 4) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 3 g L⁻¹, água 10 g DQO L⁻¹; 5) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹; 6) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L⁻¹, água 10 g DQO L⁻¹; 7) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹, água 10 g DQO L⁻¹; 8) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹; 9, 10, 11 e 12) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 20 g DQO L⁻¹.

Em relação ao pH, verificou-se diminuição do início até estabilização da produção de H₂ nos ensaios 4, 6, 9 e 10 (inicial entre 6,5 e 7,5 e final entre 5,5 e 6,3) e aumento nos outros ensaios (ensaios 1, 2, 3, 5, 7, 8, 11 e 12, inicial entre 5,5 e 7,5 e final entre 5,7 e 8,5). A diminuição do pH foi consequência da síntese de ácidos orgânicos e álcoois, com produção de 1.299 ± 560 mg L⁻¹ em pH inicial de 7,5 (ensaios 4 e 6) e 3.200 ± 114 mg L⁻¹ em pH inicial de 6,5 (ensaios 9 e 10, Tabela 5.14). Resultados similares foram observados por Khanal et al. (2004), com diminuição na capacidade de tamponamento do meio e diminuição no pH (de 6,0 para < 5,2) devido a produção de H₂ e ácidos orgânicos como acético (100 - 500 mg L⁻¹), butírico (1.200 – 3.000 mg L⁻¹) e propiônico (1.500 – 3.000 mg L⁻¹) em reatores em batelada com sacarose e amido (37 °C, 10 g L⁻¹ de sacarose ou 150 g L⁻¹ de amido e material de compostagem como inóculo).

Figura 5.33. Balanço de massa dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação que conduzem ao consumo de H_2 por homoacetogênese.

Ensaio 1) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 3 g L⁻¹, água 10 g DQO L⁻¹; 2) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 3 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹; 3) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 3 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹; 4) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 3 g L⁻¹, água 10 g DQO L⁻¹; 5) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹; 6) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L⁻¹, água 10 g DQO L⁻¹; 7) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹, água 10 g DQO L⁻¹; 8) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹; 9, 10, 11 e 12) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 20 g DQO L⁻¹.

Caso contrário, o incremento do pH (ensaios 1, 2, 3, 5, 7, 8, 11 e 12) pode ser consequência de reações de consumo de ácido láctico e propiônico com síntese de bicarbonato (Equações 5.3 e 5.5). Sob tais condições observou-se diminuição para ambos os ácidos (concentração inicial e na estabilização para ácido láctico de 1.685 ± 1987 e 154 ± 227 mg L⁻¹ nos ensaios 1, 5, 7, 8, 11 e 12, e para ácido propiônico de 44 ± 13 e 18 ± 21 mg L⁻¹ nos ensaios 1, 3, 5 e 11, respectivamente).

Verificou-se maior diversidade de metabólitos (ácidos orgânicos e álcoois) com utilização de maior concentração de substrato. Por exemplo, no ensaio 8 com 30 g DQO L⁻¹ de água residuária e 9 g L⁻¹ de polpa e casca foram observados 5 metabólitos diferentes (metanol, ácido acético, butírico, propiônico e láctico entre 10 e 2.666 mg L⁻¹), enquanto no ensaio 1 com 10 g DQO L⁻¹ de água residuária e 6 g L⁻¹ de polpa e casca foram observados somente 2 (ácido acético e butírico com 86 e 839 mg L⁻¹, respectivamente). Possivelmente, a disponibilidade de substrato diminui a competição entre microrganismos, favorecendo maior diversidade microbiana e de subprodutos (Vasconcelos et al., 2016).

Ácido acético foi observada em 9 ensaios (ensaios 1, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12, Tabela 5.14) sem relação direta com a produção de H₂, uma vez que obteve-se *P* próximo com produção baixa ou ausente (ácido acético inferior ao limite de detecção e *P* de 14 mL H₂, ensaio 7) e maior concentração (599 mg L⁻¹ de ácido acético e *P* de 18 mL H₂, ensaio 4).

Observou-se produção de ácido acético de 103 ± 24 mg L⁻¹ em pH 5,5 (ensaios 1 e 7), 790 ± 490 mg L⁻¹ em pH 6,5 (ensaios 9, 10, 11 e 12), e 512 ± 227 mg L⁻¹ em pH 7,5 (ensaios 4, 6 e 8). Alguns autores referenciam que a faixa de pH entre 6,0 a 7,0 favorece a rota deste ácido, justificando maior concentração nos ensaios 9, 10, 11 e 12 (Antonopoulou et al., 2011; Shanmugam et al., 2014).

Não foi observado efeito estatístico significativo ($\alpha=0,05$, Tabela 5.15) do pH, *headspace* ou concentração de substratos na produção de ácido acético, possivelmente pela complexidade durante a síntese, diversidade de microrganismos, nutrientes, substratos, e parâmetros operacionais que influenciam a produção deste metabólito (Islam et al., 2015; Saady, 2013). Ao mesmo tempo, o ácido acético é um dos principais produtos da fermentação em amplo intervalo de pH e de substratos, como carboidratos, proteínas e gorduras (Dionisi and Silva, 2016).

Resultados similares foram observados por Ciranna et al. (2014), em reatores em batelada alimentados com glicose a 67 °C, verificando produção de ácido acético (entre 85 – 100 mM) em ampla faixa de pH (5,5 e 8) e pH_2 altas (*headspace* de 33%) e baixas (mediante a aplicação de N_2 gasoso). Isto foi consequência da fermentação com *Caloramator celer*, bactéria com metabolismo flexível capaz de fermentar sob condições ácidas, alcalinas e amplo intervalo de pH_2 . Portanto, microrganismos semelhantes aos reportados pelos autores, podem ter se adaptado às diferentes condições operacionais da fermentação de resíduos de café, e com produção de ácido acético.

Adicionalmente, nas seções 5.3 e 5.4 foi evidenciada a produção de ácido acético utilizando diferentes compostos encontrados nos resíduos de café, como carboidratos (Equação 5.6), ácido lático, propiônico, etanol (Equações 5.3, 5.4, 5.5 e 5.8) e fenol na água residuária (Equação 5.1), mediante rotas acetogênicas, fermentação de carboidratos, ou degradação de fenol com co-produção de H_2 . Destaca-se que tais reatores foram operados em condições de pH (4,0 – 7,0) e *headspace* diferentes (50 – 70%).

Nessa pesquisa verificou-se ácido butírico de 1.163 a 5.122 mg L⁻¹ na fase de estabilização da fermentação (Tabela 5.14 e Figura 5.33). Concentração de ácido butírico de 3.684 mg L⁻¹ foi observada no ensaio 2 (pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 3 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹), e relacionada diretamente com maior P (135 mL H_2). Valor inferior foi observado no ensaio 7 (pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹, água 10 g DQO L⁻¹) de 151 mg L⁻¹ e P de 14 mL H_2 .

Observou-se efeito significativo da concentração de água residuária na produção de ácido butírico ($\alpha=0,05$, Tabela 5.15), obtendo-se valor máximo de 3.684 mg L⁻¹ no ensaio 2 com 30 g DQO L⁻¹ e mínimo de 151 mg L⁻¹ no ensaio 7 (10 g DQO L⁻¹). Isto porque maior concentração de água residuária potencializaram a produção de H_2 e, portanto, a co-produção de ácidos orgânicos como o butírico.

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

Tabela 5.15: Análise estatística dos ácidos orgânicos e álcoois dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação que conduzem ao consumo de H_2 por homoacetogênese.

	Níveis			Produção de HAc		Produção de HBu		Produção de HPr		Produção de HLa		Produção de EtOH	
	-1	0	1	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor
Média				217	0,1503	1461	0,0041	36	0,1080	110	0,0499	94	0,5804
Curvatura				1144	0,0465	488	0,6801	-19	0,7853	-220	0,2071	431	0,4688
pH	5,5	6,5	7,5	332	0,2549	558	0,4241	72	0,1080	-3	0,9765	188	0,5804
Headspace (%)	40	50	60	27	0,9205	-419,	0,5434	36	0,3832	3	0,9765	-188	0,5804
Concentração de polpa e casca (g L ⁻¹)	3	6	9	93	0,7368	-649	0,3571	36	0,3832	-220	0,0499	-75	0,8223
Concentração de água residuária (g DQO L ⁻¹)	10	20	30	-332	0,2555	1.906	0,0263	72	0,1080	220	0,0499	75	0,8223

HAc Ácido acético, *HBu* Ácido butírico, *HPr* Ácido propiônico, *HLa* Ácido láctico, *EtOH* Etanol.

p-valor < 0,05 (95% de confiança)
 p-valor < 0,1 e > 0,05 (90% de confiança)

A importância da água residuária, tanto para a produção de ácido butírico, quanto para a redução de carboidratos e crescimento celular (Tabelas 5.13 e 5.15) pode ser consequência da presença ácidos orgânicos neste resíduo, uma vez que estimulam microrganismos celulolíticos, como *Clostridium* sp., cujo crescimento inicial com ácidos orgânicos facilita a adaptação rápida a substratos como a polpa e casca (Lynd et al., 2002).

Na maioria dos ensaios (ensaios 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12) verificou-se aumento da concentração de ácido butírico da fase inicial ($937 \pm 662 \text{ mg L}^{-1}$) para a exponencial ($1.563 \pm 782 \text{ mg L}^{-1}$) depois de aproximadamente 30 h de fermentação e estabilização ($2.674 \pm 1.639 \text{ mg L}^{-1}$). A predominância da rota butírica na maioria das condições testadas pode ser consequência da bio-aumentação com consórcio microbiano obtido dos resíduos de café, com bactérias produtoras de ácido butírico como um dos principais produtos metabólicos (Lee et al., 2010).

Por outro lado, nos ensaios com *headspace* de 40% (ensaios 1, 2, 5 e 6) observou-se maior produção de ácido butírico (entre 741 e 3.684 mg L^{-1}) quando comparado com os de 50% (entre 32 e 2.426 mg L^{-1} , ensaios 9, 10, 11 e 12) e 60% (entre 151 e 2.319 mg L^{-1} , ensaios 3, 4, 7 e 8), sem efeito estatístico significativo ($\alpha=0,05$, Tabela 5.15). Nos ensaios com menor volume de *headspace* (ensaios 1, 2, 5 e 6), a maior pH_2 pode levar a produção predominante deste ácido, uma vez que em altas pressão ($>60 \text{ Pa}$) tem-se a produção de ácido butírico como estratégia de prevenção de inibição causada por acúmulo de equivalentes redutores (Angenent et al., 2004).

Verificou-se produção de etanol somente em 3 ensaios (ensaios 2, 6 e 12), dos quais os ensaios 2 e 6 tinham em comum o *headspace* de 40% e pH de 7,5. Nenhum dos fatores da fermentação teve efeito significativo na produção de etanol ($\alpha=0,05$, Tabela 5.15), embora, volumes de *headspace* de 40% podem ter levado a este resultado, uma vez que maior pH_2 permite à predominância da rota de produção de solventes (Sivagurunathan et al., 2016).

Em alguns casos (ensaios 3, 7, 8 e 10) observou-se aumento da concentração de etanol após aproximadamente 30 h de fermentação e diminuição na estabilização da fermentação, principalmente no ensaio 2, com concentrações de 2.088, 3.003 e 1.838 mg L^{-1} , respectivamente. Rotas acetogênicas de obtenção de energia a partir do etanol (Equação 5.4) podem ter ocorrido,

uma vez que na estabilização da fermentação o esgotamento de substratos (principalmente carboidratos dissolvidos) pode induzir à degradação de alguns ácidos orgânicos e álcoois.

Observou-se produção de ácido propiônico somente nos ensaios 2 (pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 3 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹), 8 (pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹), 9, 10 e 12 (pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 6 g L⁻¹, água 20 g DQO L⁻¹), com concentrações finais entre 22 e 215 mg L⁻¹ (Tabela 5.14). Maior produção de H₂ entre 70 e 135 mL H₂ nos ensaios 2, 8 e 9 pode ter levado à produção deste metabólito, uma vez que esta rota permite o consumo de 2 mols de H₂ por reação (Equação 5.9), aliviando o acúmulo de H₂ com ganho energético ($\Delta G^{\circ} = -279,4$) (Saady, 2013).

Com o aumento da produção de ácido propiônico verificou-se diminuição da síntese de ácido láctico nos ensaios 2, 8 e 9. Por exemplo, no ensaio 8 com a máxima produção de ácido propiônico (225 mg L⁻¹) constatou-se diminuição da concentração de ácido láctico de 3.908 mg L⁻¹ no início para 53 mg L⁻¹ na estabilização da fermentação. Isto porque o ácido láctico é o principal substrato para a formação de ácido propiônico, levando ao consumo do substrato e H₂ (Saady, 2013), portanto, é uma reação desfavorável para a produção de H₂.

Os fatores da fermentação pH, *headspace* e concentração dos substratos não afetaram significativamente a produção de ácido propiônico ($\alpha=0,1$, Tabela 5.15), no entanto, os ensaios com produção deste ácido foram operados com pH inicial maior que 6,5 (ensaio 2 e 8 com pH de 7,5 e ensaios 9, 10 e 12 com pH de 6,5). Isto porque, o ácido propiônico é produzido preferencialmente em pH superior à neutralidade (entre 6,0 - 9,0) (Dionisi and Silva, 2016; Sivagurunathan et al., 2017).

Observou-se aumento na concentração de metanol nos ensaios 1, 2, 3, 4, 6, 10 e 11 de 38 ± 66 mg L⁻¹ no início para 81 ± 62 mg L⁻¹ após ~30 h de fermentação (Tabela 5.14). *Clostridium* sp. pode produzir H₂ e metanol a partir da pectina (Schink and Zeikus, 1980), o que pode explicar o aumento da concentração deste solvente em alguns ensaios a partir da pectina contida na polpa e casca de café.

Na maioria dos casos verificou-se que a concentração de metanol diminuiu (ensaios 1, 2, 3, 4, 6, 10 e 11), principalmente no ensaio 3 (pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 3 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹) de 111 mg L⁻¹ no início e inferior ao limite de detecção no final da fermentação. Schink e Zeikus (1980), relataram a necessidade de associações microbianas para a degradação

do metanol, com a presença de microrganismos metilotróficos. Como não houve atividade metanogênica nos reatores (confirmada pela ausência de metano no biogás), concentrações baixas de H_2 podem possibilitar condições favoráveis para a degradação deste composto (Stams, 1994).

Em relação ao ácido láctico verificou-se aumento após aproximadamente 30 h de fermentação de 1.416 ± 1.080 para $2.884 \pm 1.684 \text{ mg L}^{-1}$ na maioria dos ensaios (ensaios 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 e 12, Tabela 5.14) e diminuição para $361 \pm 541 \text{ mg L}^{-1}$ na estabilização do processo, possivelmente devido a sua utilização para a produção de ácido butírico (Equação 5.8). Este resultado foi positivo, uma vez que bactérias do ácido láctico observadas nos resíduos de café (Jung et al., 2011b) não foram estimuladas em nenhuma das condições testadas, favorecendo assim rotas de produção de H_2 .

Bactérias semelhantes a *Clostridium* sp. podem estar presentes no consórcio microbiano, uma vez que a capacidade de transformar ácido láctico em H_2 , ácido butírico e CO_2 é amplamente observada nestes microrganismos sob condição de ausência de carboidratos, explicando o consumo deste ácido e maior produção de ácido butírico (Sikora et al., 2013). Para isto, é comum relação sintrófica com bactérias produtoras de ácido láctico (que provavelmente permitiram a produção de ácido láctico nas primeiras 30 h de fermentação), tornando a reação energeticamente favorável (Sikora et al., 2013).

Assim, os principais metabólitos observados nos diferentes ensaios foram ácido butírico e acético, resultado similar ao obtido em outras pesquisas com água residuária de café e biomassa obtida da auto-fermentação deste resíduo, sendo que 28% da DQO efluente correspondeu ao ácido butírico de $1,78 \text{ mol } H_2 \text{ mol}_{\text{hexose}}^{-1}$ (Jung et al., 2011b). Portanto, as características físico-químicas da água residuária utilizada pode ter influenciado a rota metabólica predominante nos reatores. A utilização de consórcio microbiano favoreceu a preferência da rota butírica, uma vez que inóculos mistos levam a produção de ácido butírico como principal metabólito dissolvido (Tapia-Venegas et al., 2015).

Inibição da formação de ácidos orgânicos a partir de material celulolítico tem sido reportada a partir de 2 g L^{-1} (Siegert and Banks, 2005), embora, nessa pesquisa observou-se atividade acidogênica com até 9 g L^{-1} de polpa e casca de café. Estas diferenças podem ser

consequência da aplicação de material pré-tratado mediante reator hidrotérmico, que conduziu a menor tamanho de partícula, redução do teor de lignina e hemicelulose, a aumento dos carboidratos fermentáveis na polpa e casca, aumentando a capacidade de transformação dos resíduos em ácidos e álcoois (Seções 5.2 e 5.3). Do mesmo modo, a bio-aumentação do consórcio microbiano autóctone de resíduos de café favoreceu a degradação de resíduos lignocelulósicos, devido aos microrganismos e genes funcionais para a degradação da celulose, hemicelulose, lignina e pectina (Seção 5.5).

Obteve-se para o balanço de massa dos reatores (Figura 5.33) entre 23% e 129%, demonstrando que componentes dissolvidos diferentes de ácidos orgânicos e carboidratos estiveram presente nos reatores, devido à complexidade dos substratos. Biomassa, sólidos procedentes da polpa e casca ou substâncias liberadas delas, ácidos orgânicos e álcoois não avaliados, podem ter contribuído também com a DQO dissolvida.

5.6.4. Homoacetogênese

O ácido acético foi observado após 3 (Homoacetogênese 1), 6 (Homoacetogênese 2) e 9 d (Final da fermentação) de atingida a estabilização da produção de H_2 (Figuras 5.30 e 5.34). com o objetivo de verificar a diminuição do H_2 acumulado com produção deste ácido, evento relacionado ao enriquecimento de bactérias homoacetogênicas que consomem este gás para seu crescimento (Modestra et al., 2015).

Figura 5.34. (a) Produção de ácido acético por homoacetogênese e (b) Diminuição do H_2 acumulado dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação que conduzem ao consumo de H_2 por homoacetogênese.

Ensaio 1) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa 3 g L⁻¹, água 10 g DQO L⁻¹; 2) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa 3 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹; 3) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa 3 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹; 4) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa 3 g L⁻¹, água 10 g DQO L⁻¹; 5) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa 9 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹; 6) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa 9 g L⁻¹, água 10 g DQO L⁻¹; 7) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa 9 g L⁻¹, água 10 g DQO L⁻¹; 8) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa 9 g L⁻¹, água 30 g DQO L⁻¹; 9, 10, 11 e 12) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa 6 g L⁻¹, água 20 g DQO L⁻¹.

Observou-se em todos os ensaios diminuição do H₂ acumulado de 14-139 mL H₂ na estabilização da produção de H₂, para 8-104 mL H₂ na Homoacetogênese 1, 6-89 mL H₂ na Homoacetogênese 2 e 5-92 mL H₂ no final da fermentação. Adicionalmente, produção de ácido acético por homoacetogênese (Ac_{Homo}) de 962-3.169 mg L⁻¹ na Homoacetogênese 1, 638-3.545 mg L⁻¹ na Homoacetogênese 2 e 290-3.139 mg L⁻¹ no final da fermentação. Verificou-se ausência de metanogênese, portanto, as perdas de H₂ acumulado foram associadas principalmente com a homoacetogênese. Possivelmente após a estabilização da fermentação, o esgotamento de substrato e outras condições de estresse podem ter permitido o crescimento autotrófico de bactérias acetogênicas a partir de H₂/CO₂ (Saady, 2013). Similarmente, o acúmulo de ácidos orgânicos e maior pH₂ permitem que a reação de produção de Ac_{Homo} seja termodinamicamente favorável (Equação 5.15) (Saady, 2013).

Para a Homoacetogênese 1 observou-se diminuição do H₂ acumulado de 14-189 para 8-104 mL H₂, com produção de Ac_{Homo} de 962-3.169 mg L⁻¹. Após este período, a diminuição do H₂ foi inferior (Homoacetogênese 2 entre 6-89 mL H₂, e no final da fermentação entre 5-92 mL H₂), portanto, a homoacetogênese teve sua maior expressão durante os primeiros dias após atingida a produção máxima de H₂, e diminuiu com o tempo, quando a concentração de H₂ tornou-se ainda menor. Isto pode ser explicado através da cinética de crescimento de bactérias homoacetogênicas, uma vez que apresentam períodos de fase lag (λ) de aproximadamente 60 – 100 h (Ryan et al., 2008), com uso de H₂. Sendo assim, a fase exponencial de crescimento das bactérias homoacetogênicas corresponderia com a Homoacetogênese 1 entre 143 e 164 h (3 – 4 d).

Yan et al., (2014) relataram que o acúmulo de ácido acético pode levar a inibição pelo produto, uma vez que maior concentração intracelular desse ácido inibe a enzima anidrase carbônica, ocasionando mudança metabólica que pode ser favorável para a população acetogênica. Este argumento justificaria o ligero aumento da concentração de H₂ acumulado nos ensaios 3 (Homoacetogênese 2: 74 mL H₂ e Final da fermentação 77 mL H₂) e 5 (Homoacetogênese 2: 89 mL H₂ L⁻¹ e Final da fermentação 92 mL H₂, Figuras 5.30 e 5.34). Adicionalmente, a diminuição do conteúdo de matéria orgânica dissolvida foi consequência da sua transformação em biogás (Figura 5.32).

A utilização de culturas mistas pode ter contribuído para o metabolismo homoacetogênico, uma vez que este tipo de inóculo é constituído de microrganismos consumidores de H_2 com capacidade de conversão de ácidos graxos de cadeia curta, dióxido de carbono e hidrogênio (de Sá et al., 2014). Além disso, alguns autores relataram que maior pH_2 (> 500 Pa) selecionam a predominância de bactérias homoacetogênicas, como *Clostridium* sp. e *Acetobacterium* sp., devido à capacidade de suportar esta condição em comparação com outros metabolismos acetogênicos (Demirel and Scherer, 2008; Saady, 2013). Portanto, o maior acúmulo de H_2 na estabilização da fermentação pode ter permitido o crescimento de bactérias homoacetogênicas nos diferentes ensaios.

Relação entre a produção de H_2 e Ac_{Homo} foi observada no ensaio 5 com maior P (pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L^{-1} , água 30 g DQO L^{-1}). Sob tais condições observou-se a maior diminuição de H_2 acumulado de 189 mL H_2 (Estabilização) para 92 mL H_2 (Final da fermentação), principalmente nos primeiros 7 d de fermentação (Homoacetogênese 1: 104 mL H_2). Ao contrário, no ensaio 7 onde obteve-se a menor P (pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L^{-1} , água 10 g DQO L^{-1}), observou-se diminuição no H_2 de 14 mL H_2 (Estabilização) para 5 mL H_2 (Final da fermentação). Portanto, observou-se superior ocorrência de homoacetogênese em reatores com maior P (Figura 5.34).

Alguns autores relataram a ocorrência da homoacetogênese como consequência de longos períodos de retenção de sólidos e maior pH_2 (Clark et al., 2012). Condições similares, de retenção de sólidos durante 10 d e maior acúmulo de gás em volumes pequenos de *headspace* foram aplicadas principalmente nos sistemas de maior P (por exemplo, no ensaio 5 com 189 mL H_2 e *headspace* 40%), correspondendo em maiores perdas de H_2 observadas nestes ensaios.

O efeito dos fatores da fermentação (pH, *headspace*, concentração de água residuária, polpa e casca) na produção de Ac_{Homo} foi estudado utilizando-se ferramentas estatísticas (Tabela 5.16). Em relação ao pH inicial, observou-se efeito significativo na produção de Ac_{Homo} somente durante a Homoacetogênese 2 ($\alpha=0,1$, Tabela 5.16). Isto porque o intervalo de pH analisado no desenho fracionado 2^{4-1} (5,5, 6,5 e 7,5) foi diferente do observado no início da homoacetogênese (entre 5,5 a 8,5 na estabilização da produção de H_2), não sendo possível concluir sobre seu efeito

na produção de Ac_{Homo} . Embora, os valores da faixa citada como a de maior consumo de H_2 por homoacetogênese entre 4,0 a 5,5 (Dinamarca and Bakke, 2009), foram atingidos durante a fermentação como consequência do acúmulo de ácidos orgânicos (pH no final da fermentação nos ensaios 1, 2, 3, 4, 9, e 12: 5,0; ensaios 5, 7, e 11: 4,8; ensaios 6 e 10: 4,9; ensaio 8: 5,1), influenciando positivamente a maior atividade homoacetogênica.

Tabela 5.16: Análise estatística da produção de Ac_{Homo} dos reatores em batelada da avaliação dos fatores da fermentação que conduzem ao consumo de H_2 por homoacetogênese.

	Níveis			Homoacetogênese 1		Homoacetogênese 2		Final da fermentação	
	-1	0	1	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor
Média				1762	0,0001	1851	0,0000	1496	0,0000
Curvatura				94	0,8826	573	0,1860	-634	0,1668
pH	5,5	6,5	7,5	261	0,4860	485	0,0714	241	0,3400
Headspace (%)	40	50	60	-317	0,4020	-976	0,0046	-551	0,0556
Concentração de polpa e casca (g L ⁻¹)	3	6	9	-98	0,7891	378	0,1392	-48	0,8449
Concentração de água residuária (g DQO L ⁻¹)	10	20	30	1365	0,0081	1824	0,0002	2010	0,0001

Ac_{Homo} Ácido acético por homoacetogênese.

p-valor < 0,05 (95% de confiança)
p-valor < 0,1 e > 0,05 (90% de confiança)

Verificou-se com menor volume de *headspace* aumento significativo da produção de Ac_{Homo} ($\alpha=0,05$, Tabela 5.16). Isto foi evidente durante a Homoacetogênese 2 e no final da fermentação, sendo a produção de Ac_{Homo} maior quando o volume do *headspace* foi de 40% (Homoacetogênese 2: 2.339 ± 1.298 mg L⁻¹, Final da fermentação: 1.772 ± 1.345 mg L⁻¹), seguido de *headspace* 50% (Homoacetogênese 2: 2.138 ± 109 mg L⁻¹, Final da fermentação: 1.179 ± 336 mg L⁻¹) e finalmente *headspace* 60% (Homoacetogênese 2: 1.363 ± 984 mg L⁻¹, Final da fermentação: 1.221 ± 1.013 mg L⁻¹). Menores volumes de *headspace* permitem acúmulo de biogás com maior pressão (Sigurbjornsdottir and Orlygsson, 2012), aumentando a disponibilidade de produtos gasosos dissolvidos no meio líquido, os quais podem ser utilizados

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

como substratos para a homoacetogênese e justificam a maior produção de ácido acético em *headspace* de 40%.

A concentração de polpa e casca não afetou significativamente a produção de Ac_{Homo} ($\alpha=0,05$, Tabela 5.16), sendo verificadas maior concentração deste ácido para 3 g L⁻¹ desse material (Homoacetogênese 1: 1.811 ± 1.059 mg L⁻¹, Homoacetogênese 2: 1.662 ± 1.290 mg L⁻¹; Final da fermentação: 1.520 ± 1.233 mg L⁻¹), 6 g L⁻¹ (Homoacetogênese 1: 1.809 ± 596 mg L⁻¹, Homoacetogênese 2: 2.138 ± 109 mg L⁻¹; Final da fermentação: 1.179 ± 336 mg L⁻¹) e 9 g L⁻¹ de polpa e casca (Homoacetogênese 1: 1.712 ± 610 mg L⁻¹, Homoacetogênese 2: 2.040 ± 1.236 mg L⁻¹; Final da fermentação: 1.473 ± 1.231 mg L⁻¹). Possivelmente, a condição insolúvel da polpa e casca na estabilização da produção de H₂, levou à preferência de rotas autotróficas de consumo de H₂ para a obtenção de energia.

Verificou-se efeito significativo da concentração de água residuária na produção de Ac_{Homo} ($\alpha=0,05$, Tabela 5.16). Obteve-se maior concentração de Ac_{Homo} em 30 g DQO L⁻¹ (Homoacetogênese 1: 2.444 ± 488 mg L⁻¹, Homoacetogênese 2: 2.763 ± 968 mg L⁻¹; Final da fermentação: 2.501 ± 563 mg L⁻¹) seguido de 20 g DQO L⁻¹ (Homoacetogênese 1: 1.809 ± 696 mg L⁻¹, Homoacetogênese 2: 2.138 ± 109 mg L⁻¹; Final da fermentação: 1.179 ± 336 mg L⁻¹) e finalmente 10 g DQO L⁻¹ (Homoacetogênese 1: 1.079 ± 135 mg L⁻¹, Homoacetogênese 2: 939 ± 367 mg L⁻¹; Final da fermentação: 492 ± 168 mg L⁻¹). Isto pode ser devido a maior P observada para maior concentração de água residuária, permitindo obter maior teor de H₂ e CO₂ no biogás, substratos utilizados pelos microrganismos homoacetogênicos (Saady, 2013).

O ensaio 5 foi selecionado para a identificação dos carboidratos devido à alta produção de H₂ (189 mL H₂), maior consumo de H₂ acumulado no final da fermentação (92 mL H₂) e produção de ácido acético via homoacetogênese (concentração final de 2.713 mg L⁻¹), com o objetivo de relacionar o consumo de carboidratos com os metabolismos observados. Somente arabinose foi quantificado no início (77 mg L⁻¹), estabilização da produção de H₂ (232 mg L⁻¹) e final da fermentação (inferior ao limite de detecção). Evidenciou-se atividade hidrolítica da arabinase sobre a hemicelulose, com aumento do conteúdo de arabinose (Van Dyk and Pletschke, 2012) durante a etapa de produção de H₂. No entanto, uma vez que a produção de H₂ estabilizou,

houve consumo da arabinose com síntese de ácido acético, provavelmente, mediante homoacetogênese autotrófica. Segundo Latif et al. (2014), as bactérias homoacetogênicas também possuem a capacidade de obter elétrons a partir de açúcares simples para a produção de ácido acético mediante a rota Wood–Ljungdahl.

Foi possível inferir que para diminuir a ocorrência de homoacetogênese é recomendável finalizar a fermentação imediatamente após atingir estabilização da produção de H_2 , utilizar concentrações baixas de água residuária (por exemplo, 10 g DQO L^{-1}) e maiores volumes de *headspace* (por exemplo 60%).

5.6.2. Considerações parciais

A hipótese 5 “*Alterações nos fatores da fermentação permitem aumentar a produção de H_2 , ácidos orgânicos e álcoois e modificar a comunidade microbiana*” foi negada uma vez que:

- Sob todos os fatores físico-químicos da fermentação avaliados (pH inicial entre 5,5 e 7,5, *headspace* entre 40 e 60%, concentração de água residuária entre 10 e 30 g DQO L^{-1} e concentração de casca e polpa entre 3 e 9 g L^{-1}) foi verificado consumo do H_2 acumulado e síntese de ácido acético via homoacetogênese.

Outras considerações importantes foram que

- A origem do inóculo foi mais importante que os fatores da fermentação na ocorrência de homoacetogênese. Isto porque, igual bio-aumentação do consórcio microbiano em todos os reatores justificaria a ocorrência de homoacetogênese nas diferentes condições de fermentação (consórcio microbiano bio-aumentado a partir de resíduos de café).
- A produção de ácido acético por homoacetogênese aumentou significativamente a partir de *headspace* de 40% e maior concentração de água residuária de 30 g DQO L^{-1} .
- As condições que maximizaram a produção de H_2 (maior concentração de substrato e menor volume de *headspace*) também levaram a maiores produções de ácido acético por homoacetogênese. Por tanto, retirada do biogás na estabilização da fermentação H_2 é recomendável para evitar perdas no H_2 acumulado.

5.7. Seleção das condições de fermentação de otimização da produção de H₂ e avaliação da homoacetogênese (Hipóteses 6)

5.7.1. Parâmetros cinéticos da Etapa I (Produção de H₂)

Os fatores pH, *headspace* e concentração de polpa e casca foram avaliados mediante Desenho de Composto Central Rotacional (DCCR) em duas etapas da fermentação (Figura 5.36): **Etapa I:** Desde o início da fermentação até a estabilização da produção de H₂; **Etapa II:** Desde a estabilização da produção de H₂ até estabilização do consumo de H₂.

Determinou-se a cinética de produção de H₂ durante a etapa I, mediante o ajuste da equação de Gompertz modificada (Zwietering et al., 1990) (Figura 5.35 e Tabela 5.17).

O pH inicial dos reatores da etapa I esteve entre 5,5 e 7,5, com alguns ensaios em meio com pH ácido (4,82, ensaio 9) e alcalino (8,18, ensaio 10). Maior potencial máximo de produção de H₂ (*P*; Tabela 5.17) foi observado em pH 5,5 (208 ± 27 mL H₂, ensaios 1, 3, 5 e 7), seguido de pH 6,5 (144 ± 26 mL H₂, ensaios 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17) e finalmente em pH 7,5 (91 ± 26 mL H₂, ensaios 2, 4, 6 e 8). Em relação aos pontos extremos, referentes aos ensaios 9 e 10, observou-se 228 e 163 mL H₂ em pH iniciais de 4,8 e 8,2, respectivamente. Abreu et al. (2009) avaliaram a cinética de produção de H₂ a 37°C para diferentes valores de pH a partir de arabinose (30 g L⁻¹), com inóculo proveniente de lodo anaeróbico de reator alimentado com glicose e arabinose. Os autores observaram *P* de 137 mL H₂ em pH 7,5; 112 mL H₂ em pH 6,5; 47 mL H₂ em pH 5,5 e ausência de H₂ em pH 4,5. Desta forma, os autores obtiveram maiores *P* (137 mL H₂) em pH superior a 7,0, enquanto no presente trabalho, os melhores resultados em *P* foram entre pH 4,8 e 5,5 (na faixa de 203 a 244 mL H₂), possivelmente influenciado por diferenças no inóculo. Isso porque, durante a obtenção do consórcio microbiano utilizado para a bio-aumentação dos reatores com resíduos de café, o pH inicial da fermentação foi de ~4,9 (Seção 5.1), possivelmente selecionando microrganismos com melhor crescimento na faixa de pH ácido.

Figura 5.35. Cinéticas de produção de H_2 acumulado e ajuste ao modelo de Gompertz modificado dos reatores em batelada da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H_2 .

Ensaio 1) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 2) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 3) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 4) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 5) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 6) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 7) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 8) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 9) pH 4,82, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 10) pH 8,18, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 11) pH 6,5, *headspace* 33,18%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 12) pH 6,5, *headspace* 66,82%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 13) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 6,95 g L⁻¹; 14) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 17,05 g L⁻¹; 15, 16 e 17) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹.

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

Tabela 5.17: Parâmetros cinéticos dos reatores em batelada da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H_2 .

Ensaio	Experimentos			Hidrogênio			
	pH	Headspace (%)	Polpa e casca (g L ⁻¹)	<i>P</i> (mL)	<i>Rm</i> (mL h ⁻¹)	λ (h)	Produção (L H ₂ L ⁻¹ d ⁻¹)
1	5,5	40	9	206	13,5	36,4	1,6
2	7,5	40	9	112	19,8	22,7	2,4
3	5,5	60	9	203	8,6	43,3	0,7
4	7,5	60	9	55	3,1	15,4	0,2
5	5,5	40	15	244	11,4	17,1	1,4
6	7,5	40	15	106	7,4	18,9	0,9
7	5,5	60	15	178	10,1	33,0	0,8
8	7,5	60	15	89	7,7	19,8	0,6
9	4,82	50	12	228	4,4	131,7	0,4
10	8,18	50	12	163	7,9	22,8	0,8
11	6,50	33,18	12	170	14,4	17,2	2,1
12	6,5	66,82	12	89	7,5	17,7	0,5
13	6,5	50	6,95	154	13,6	15,2	1,3
14	6,5	50	17,05	137	8,7	17,3	0,8
15 PC	6,5	50	12	157	7,3	11,3	1,1
16 PC	6,5	50	12	148	11,9	14,7	1,1
17 PC	6,5	50	12	154	10,4	11,1	1,0

PC Ponto central, *P* Potencial máximo de produção de H_2 , *Rm* Velocidade máxima de produção, λ Tempo de início da fermentação.

Figura 5.36. Variação temporal de H_2 e ácido acético dos reatores em batelada da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H_2 e II de avaliação da homoacetogênese.

Ensaio 1) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 2) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 3) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 4) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 5) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 6) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 7) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 8) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 9) pH 4,82, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 10) pH 8,18, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 11) pH 6,5, *headspace* 33,18%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 12) pH 6,5, *headspace* 66,82%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 13) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 6,95 g L⁻¹; 14) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 17,05 g L⁻¹; 15, 16 e 17) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹.

Durante a etapa I, as maiores R_m (velocidades máximas de produção de H_2) foram observadas nos reatores em batelada em pH inicial 5,5 ($10,9 \pm 2,1$ mL H_2 h⁻¹, ensaios 1, 3, 5 e 7), seguido de pH 6,5 ($10,5 \pm 2,9$ mL H_2 h⁻¹, ensaios 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17), pH 7,5 ($9,5 \pm 7,2$ mL H_2 h⁻¹, ensaios 2, 4, 6 e 8), pH 8,18 ($7,9$ mL H_2 h⁻¹, ensaios 10) e pH 4,82 ($4,4$ mL H_2 h⁻¹, ensaios 9). Abreu et al. (2009), observaram resultados similares, ou seja de $2,1$ mL H_2 h⁻¹ em pH 5,5; $2,9$ mL H_2 h⁻¹ em pH 6,5; $1,7$ mL H_2 h⁻¹ em pH 7,5 e $1,9$ mL H_2 h⁻¹ em pH 8,0, reportando pH de 6,5 como o adequado para maiores velocidades de produção de H_2 , similar ao observado no presente estudo. Maiores R_m em pH entre 5,5 e 6,5 pode estar relacionado com a obtenção do consórcio microbiano autóctone dos resíduos de café em pH inicial de 5,0, permitindo a seleção da população de bactérias com crescimento predominante em meio ácido.

O tempo de início da fermentação para os reatores da etapa I (λ) foi de $32,5 \pm 11,1$ h em pH inicial de 5,5 (ensaios 1, 3, 5 e 7); $14,9 \pm 2,8$ h em pH inicial de 6,5 (ensaios 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17) e $19,2 \pm 3,0$ h em pH inicial de 7,5 (ensaios 2, 4, 6 e 8). Muri et al. (2016) verificaram longos λ para condições ambientais extremas de pH. Por exemplo, especificamente com os resíduos de café obteve-se λ de $32,4 \pm 11,1$ h e $131,7$ h para pH inicial 5,5 (ensaios 1, 3, 5 e 7) e 4,82 (ensaio 9), respectivamente. Abreu et al. (2009) observaram λ de $19,3$ h em pH 5,5; $14,5$ h em pH 6,5 e $13,7$ h em pH 7,5 utilizando açúcar simples (arabinose) para a alimentação do reator. Portanto, a partir da co-digestão de resíduos de café foi necessário maior tempo de início da fermentação devido à complexidade dos substratos (polpa, casca e água residuária), para os quais foram necessárias reações de hidrólise prévias à fermentação.

Em relação ao volume de *headspace* dos reatores da etapa I, evidenciou-se os maiores P (Tabela 5.17) nos ensaios com 40% (167 ± 69 mL H_2 , ensaios 1, 2, 5, e 6), 50% (163 ± 30 mL H_2 , ensaios 9, 10, 13, 14, 15, 16 e 17) e 60% (131 ± 71 mL H_2 , ensaios 3, 4, 7 e 8). A maior produção de H_2 de 170 mL H_2 foi obtida no ensaio 11 com *headspace* menor (33,18%), entretanto, quando o volume de *headspace* foi aumentado para 66,82% a produção foi inferior, correspondendo a 89 mL H_2 (ensaio 12).

Verificou-se resultados similares em relação à Rm . Velocidades decrescentes de produção de H_2 foram obtidas utilizando-se 40% ($13 \pm 5,2$ mL H_2 h⁻¹, ensaios 1, 2, 5, e 6), 50% ($9,2 \pm 3,1$ mL H_2 h⁻¹, 9, 10, 13, 14, 15, 16 e 17) e 60% ($7,4 \pm 3,0$ mL H_2 h⁻¹, ensaios 3, 4, 7 e 8). Para 33,18% de *headspace*, obteve-se a maior Rm de 14,4 mL H_2 h⁻¹ (ensaio 11) quando comparado com 66,82% (7,5 mL H_2 h⁻¹, ensaio 12). De acordo com Shanmugam et al. (2014), volume menor de *headspace* pode conduzir a elevada pressão de H_2 e, consequentemente inibir a produção de H_2 e limitar o uso de substratos altamente concentrados. No entanto, na presente pesquisa, possivelmente os valores de pH_2 não foram suficientemente altas para afetar a fermentação, uma vez que as melhores P e Rm foram observadas nos menores volumes de *headspace*.

O λ mais longo de $32 \pm 44,1$ h foi observado em *headspace* de 50% (ensaios 9, 10, 13, 14, 15, 16 e 17), seguido de $27,9 \pm 12,7$ h a 60% (ensaios 3, 4, 7 e 8) e $23,8 \pm 8,7$ h a 40% (ensaios 1, 2, 5, e 6). Para as condições de *headspace* de 33,18% e 66,82% observou-se o λ de aproximadamente 17 h (ensaio 11 e 12). Possivelmente, condições extremas de pH (4,82 e 8,18, ensaios 9 e 10) e concentração de polpa e casca (6,95 e 17,05 g L⁻¹) com 50% de *headspace*, podem ter favorecido maiores tempos de início da fermentação.

Em relação a concentração de polpa e casca para os reatores da etapa I, não observou-se discrepância entre os valores obtidos de P (Tabela 5.17) para 9 g L⁻¹ (144 ± 74 mL H_2 , ensaios 1, 2, 3 e 4), 12 g L⁻¹ (158 ± 41 mL H_2 , ensaios 9, 10, 11, 12, 15, 16 e 17) e 15 g L⁻¹ (154 ± 71 mL H_2 , ensaios 5, 6, 7 e 8). Similarmente, para 6,95 e 17,05 g L⁻¹ de polpa e casca foi observado 154 e 137 mL H_2 , respectivamente. Portanto, concentrações altas de polpa e casca não proporcionaram maior produção de H_2 .

Em contrapartida, maior velocidade de produção (Rm) foi observada em menor concentração de polpa e casca, uma vez que verificou-se valores superiores de Rm com 6,95 g L⁻¹ (13,6 mL H_2 h⁻¹, ensaio 13), seguido de 9 g L⁻¹ ($11,3 \pm 7,1$ mL H_2 h⁻¹, ensaios 1, 2, 3 e 4), 12 g L⁻¹ ($9,1 \pm 3,3$ mL H_2 h⁻¹, ensaios 9, 10, 11, 12, 15, 16 e 17), 15 g L⁻¹ ($9,2 \pm 1,9$ mL H_2 h⁻¹, ensaios 5, 6, 7 e 8) e 17,05 g L⁻¹ (8,7 mL H_2 h⁻¹, ensaio 14). Segundo Cazier et al. (2015) maior concentração de sólidos pode favorecer o aumento na porcentagem de CO_2 e H_2 no reator. Sob estas condições, a alta pH_2 conduz a inibição do processo hidrolítico e diminui a difusão de compostos intermediários dissolvidos, ocasionando em acúmulo na fração líquida.

A informação destacada pelos autores possibilita justificar, no presente estudo, as menores velocidades de produção de H_2 (Rm) para maiores concentrações de polpa e casca (15 e 17,05 g L⁻¹).

Verificou-se diminuição de λ para menor concentração de polpa e casca. Sendo assim, obteve-se λ de $32,4 \pm 44$ h (ensaios 9, 10, 11, 12, 15, 16 e 17) e $29,5 \pm 12,7$ h (ensaios 1, 2, 3 e 4) quando utilizou-se 12 e 9 g L⁻¹ de polpa e casca, respectivamente. Além disso, valores de λ inferiores foram obtidos em reatores contendo 15 g L⁻¹ de polpa ($22,2 \pm 7,3$ h, ensaios 5, 6, 7 e 8). Como referido anteriormente, as condições de extrema acidez e menores volumes de *headspace* podem ter conduzido a maiores λ , como por exemplo com 12 g L⁻¹ de polpa e casca. No entanto, pode-se observar que a concentração de polpa e casca não influenciou no tempo de início da fermentação, uma vez que λ próximos de 15,2 h e 17,3 h foram obtidos para 6,95 g L⁻¹ (ensaio 13) e 17,05 g L⁻¹ (ensaio 14) de polpa e casca, respectivamente.

Uma das maiores dificuldades durante a adição de substratos hidrolisados em reator hidrotérmico é o aumento proporcional de compostos inibidores como fenóis e furfural. Uma estratégia estudada nesta pesquisa foi a bio-aumentação com bactérias autóctones dos resíduos de café, permitindo a seleção de populações adaptadas a estes compostos inibitórios (Sivagurunathan et al., 2017).

Estes resultados foram diferentes dos observados por Ratti et al. (2013) durante a produção de H_2 com celulose a 37 °C, utilizando reatores em batelada com adição de celulase e inóculo de lixiviado tratado termicamente (90 °C por 10 min). Os autores obtiveram aumento de P (de 19,9 para 125,9 mmol H_2), Rm (de 0,8 para 2,3 mmol H_2 h⁻¹) e λ (de 5,1 para 9,2 h) para 2,5 para 10 g L⁻¹ de celulose, respectivamente. Provavelmente, a obtenção de valores menores de P , Rm e λ durante a co-digestão de resíduos de café foi devido a complexidade lignocelulósica desses resíduos, além da faixa de concentração de polpa e casca (6,95 a 17,05 g L⁻¹), os quais podem ter conduzido a limitações das reações hidrolíticas.

Os resultados dos parâmetros cinéticos da fermentação dos reatores da etapa I foram utilizados para calcular a produção de H_2 (Tabela 5.17) e ajustar modelos matemáticos (Tabela 5.18 e 5.19) para a P , Rm e λ e a produção de H_2 (L H_2 L⁻¹ d⁻¹). A significância dos modelos

foi avaliada mediante do teste de ANOVA (Tabela 5.19). Observou-se coeficientes de correlação entre 74,7% e 89,6%, indicando que os modelos podem explicar até 89,6% da variação da resposta. O valor F dos modelos (para P : 34,1, Rm : 14,4, λ : 41,2 e para Produção: 28,5, Tabela 5.19) foram maiores que os valores F tabulado (para P : 2,3, Rm : 2,04, λ : 2,4 e para Produção: 1,99), indicando que os modelos são válidos.

A partir do modelo 4 de produção de H_2 , no qual observou-se o maior coeficiente de correlação (89,4%), foram elaboradas superfícies de resposta e curvas de contorno (Figura 5.37). Verificou-se máxima produção de H_2 em pH entre 6,3 e 8,3 (Figura 5.37a e b), *headspace* entre 30 e 35% (Figura 5.37a e c), e concentração de polpa e casca entre 6,0 e 9,0 g L^{-1} (Figura 5.37b e c). Valores máximos de produção de H_2 foram obtidas com pH $\sim 7,0$, possivelmente pH próximo a neutralidade (entre 6,5 e 7,5) pode estimular maior diversidade de microrganismos, conduzindo a maior velocidade de produção de H_2 , uma vez que este estímulo pode aumentar a sinergia entre grupos de microrganismos com capacidade metabólica, tanto hidrolítica quanto fermentativa (de Sá et al., 2014).

Tabela 5.18: Modelos dos reatores em batelada da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H_2 .

Parâmetro		Modelo	Coefficiente de correlação, R^2 (%)	P-valor
P (mL H_2)	1.	$Y_1 = 136,4 - 42,3 x_1 + 18,1 x_1^2 - 20,5 x_2$	80,0	0,0000
Rm (mL h^{-1})	2.	$Y_2 = 11,2 - 1,5 x_1^2 - 2,5 x_2 - 1,2 x_3 - 1,3 x_1 x_2 - 0,9 x_1 x_3 + 2,6 x_2 x_3$	80,3	0,0000
λ (h)	3.	$Y_3 = 10,5 - 17,3 x_1 + 20,9 x_1^2$	74,7	0,0000
Produção (L H_2 L^{-1} d^{-1})	4.	$Y_4 = 1,11 - 0,16 x_1^2 - 0,49 x_2 + 0,10 x_2^2 - 0,14 x_3 - 0,09 x_1 x_2 - 0,14 x_1 x_3 + 0,26 x_2 x_3$	89,6	0,0000

P (Potencial máximo de produção de H_2): $F_{3; 27; 0,1} = 2,3$; $F_{11; 16; 0,1} = 1,99$; Rm (Velocidade máxima de produção): $F_{6; 24; 0,1} = 2,04$, $F_{8; 16; 0,1} = 2,09$; λ (Tempo de início da fermentação): $F_{2; 28; 0,1} = 2,5$; $F_{12; 16; 0,1} = 1,99$; Produção: $F_{7; 23; 0,1} = 1,99$, $F_{7; 16; 0,1} = 2,13$.

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

Tabela 5.19: ANOVA dos reatores em batelada da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H₂.

	Soma de quadrados				Graus de liberdade				Quadrados médios				F calculado			
	<i>P</i>	<i>Rm</i>	λ	Produção	<i>P</i>	<i>Rm</i>	λ	Produção	<i>P</i>	<i>Rm</i>	λ	Produção	<i>P</i>	<i>Rm</i>	λ	Produção
Regressão	68088	413	18586	9,5	3	6	2	7	22696	68,8	9293	1,4	34,1	16,4	41,4	28,5
Resíduos	17953	101	6279	1,1	27	24	28	23	665	4,2	224	0,0				
Falta de Ajuste	16290	83	6258	1,0	11	8	12	7	1481	10,4	521	0,1	14,2	9,3	398,6	16,6
Erro Puro	1663	18	22	0,1	16	16	16	16	104	1,1	1	0,0				
Total	86041	514	24865	10,6	30	30	30	30								

P Potencial máximo de produção de H₂, *Rm* Velocidade máxima de produção, λ Tempo de início da fermentação.

Figura 5.37a. Superfície de resposta e curva de contorno para a produção de H_2 com os fatores *headspace*, pH e concentração de polpa e casca dos reatores em batelada da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H_2 .

Figura 5.37b. Superfície de resposta e curva de contorno para a produção de H_2 com os fatores *headspace*, pH e concentração de polpa e casca dos reatores em batelada da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H_2 .

Figura 5.37c. Superfície de resposta e curva de contorno para a produção de H_2 com os fatores *headspace*, pH e concentração de polpa e casca dos reatores em batelada da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H_2 .

Para as condições de *headspace* (Figura 5.37c) não foi observado ponto de curvatura, sendo verificado para valor inferior a 30% possivelmente pode ser observado maior P . No entanto, quando os reatores foram operados com 33% de *headspace* (ensaio 11) obteve-se alta pressão de gás com ruptura de algumas tampas de butila de segurança, tornando-se inviável testar níveis inferiores para este fator.

Escolhendo-se 30% como o valor de *headspace* que maximiza a produção de H_2 , segundo a Figura 5.37c, concentração de polpa e casca entre 6 e 7 g L^{-1} permitem maiores valores de produção de H_2 . A partir dos resultados obtidos recomenda-se para obtenção de valor máximo P a partir da co-digestão resíduos de café o uso de 7 g L^{-1} de casca e polpa.

5.7.2. Parâmetros físico-químicos da Etapa I (Produção de H_2)

Os parâmetros físico-químicos dos reatores da etapa I como carboidratos dissolvidos, demanda química de oxigênio dissolvida (DQO) e fenóis foram estudados nos diferentes ensaios durante a etapa I (Tabela 5.20 e Figura 5.38). Não foi verificado o aumento do P em relação à concentração inicial e redução de carboidratos, uma vez que maiores e menores potenciais de produção de H_2 de 112 mL H_2 (ensaio 2) e 55 mL H_2 (ensaio 4), respectivamente, foram obtidas nos ensaios com remoção de $58 \pm 3\%$ (Figura 5.38) e concentração de carboidratos dissolvidos iniciais semelhantes (1.930 e 2.140 mg L^{-1} , respectivamente).

Durante a etapa I, obteve-se redução de carboidratos de $71 \pm 5\%$ em pH 5,5 (carboidratos iniciais de 1.778 ± 123 mg L^{-1} , ensaios 1, 3, 5 e 7), $51 \pm 10\%$ em pH 6,5 (carboidratos iniciais de 2.180 ± 276 mg L^{-1} , ensaios 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17) e $62 \pm 6\%$ em pH 7,5 (carboidratos iniciais de 2.118 ± 147 mg L^{-1} , ensaios 2, 4, 6 e 8). Reduções de 64% e 75%, também foram obtidas em pH inicial de 4,82 (ensaio 9) e 8,18 (ensaio 10), respectivamente, correspondendo a 2.040 e 2.120 mg L^{-1} de carboidratos iniciais. Por tanto, no presente estudo o pH não relacionou-se com consumo de carboidratos, uma vez que observou-se redução de $> 71\%$ em meio com pH ácido (5,5) e alcalino (8,18). O efeito negativo de condição de pH ácido no consumo de carboidratos foi relatado por Zhou et al. (2017) durante a fermentação de glicose (20 g L^{-1}) em

reator em batelada a 37 °C, com inóculo de lodo de estação de tratamento de água residuária tratado à 105 °C por 2 h. Os autores citam inibição das bactérias fermentativas com a diminuição do pH. No entanto, neste estudo, evidenciou-se redução de carboidratos para pH inicial entre 4,82 e 8,18, o qual pode ser consequência de microrganismos tolerantes a meios com pH ácidos e alcalinos na comunidade microbiana. Por exemplo, foi verificado no consórcio microbiano abundância relativa de 2,9% para *Lactobacillus* sp. (Figura 5.23), reportado por Abdel-Rahman et al. (2013) como bactéria com capacidade de crescimento em pH de 3,5. Do mesmo modo, foi observado 76,9% de *Clostridium* sp., que foi referido por Temudo et al. (2008) como o gênero predominante em ambiente com pH ácido (4,0 - 5,5) e alcalino (7,5 – 8,0), durante a produção de H₂ em reator de mistura completa a 30°C, pH de 4,0 – 8,5, alimentado com glicose, glicerol e xilose e inoculado com cultura mista.

Tabela 5.20: Parâmetros físico-químicos dos reatores em batelada da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H₂.

Ensaio	Condições Experimentais			Parâmetros físico-químicos						Hidrogênio
	pH	Headspace	Polpa e casca	Carboidratos dissolvidos		DQO dissolvida		Fenol		P
		(%)	(g L ⁻¹)	Inicial (mg L ⁻¹)	Final (mg L ⁻¹)	Inicial (mg L ⁻¹)	Final (mg L ⁻¹)	Inicial (mg L ⁻¹)	Final (mg L ⁻¹)	(mL)
1	5,5	40	9	1.853	575	18.933	16.953	346	332	206
2	7,5	40	9	1.930	853	21.992	22.516	331	147	112
3	5,5	60	9	1.707	378	20.033	17.797	329	351	203
4	7,5	60	9	2.140	868	22.233	21.875	372	189	55
5	5,5	40	15	1.643	578	19.283	19.656	369	155	244
6	7,5	40	15	2.287	695	21.300	21.375	408	212	106
7	5,5	60	15	1.907	550	22.833	18.422	376	146	178
8	7,5	60	15	2.113	780	22.467	22.203	399	202	89
9	4,82	50	12	2.040	735	18.250	20.859	300	118	228
10	8,18	50	12	2.120	523	20.000	23.156	360	168	163
11	6,50	33,18	12	1.750	795	23.033	25.906	360	223	170
12	6,5	66,82	12	1.880	743	23.800	27.188	395	447	89
13	6,5	50	6,95	2.290	1.210	24.567	24.297	411	315	154
14	6,5	50	17,05	2.100	1.290	19.800	23.109	393	232	137
15 PC	6,5	50	12	2.413	1.500	24.267	26.344	544	195	157
16 PC	6,5	50	12	2.413	1.010	24.267	25.984	544	218	148
17 PC	6,5	50	12	2.413	995	24.267	24.578	544	473	154

PC Ponto central, P Potencial máximo de produção de H₂, DQO Demanda química de oxigênio.

Figura 5.38. Produção de H_2 , redução de carboidratos dissolvidos, aumento da demanda química de oxigênio (DQO) e redução do fenol dos reatores em batelada da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H_2 .

Ensaios 1) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L^{-1} ; 2) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L^{-1} ; 3) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L^{-1} ; 4) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L^{-1} ; 5) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 15 g L^{-1} ; 6) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 15 g L^{-1} ; 7) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 15 g L^{-1} ; 8) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 15 g L^{-1} ; 9) pH 4,82, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L^{-1} ; 10) pH 8,18, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L^{-1} ; 11) pH 6,5, *headspace* 33,18%, polpa e casca 12 g L^{-1} ; 12) pH 6,5, *headspace* 66,82%, polpa e casca 12 g L^{-1} ; 13) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 6,95 g L^{-1} ; 14) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 17,05 g L^{-1} ; 15, 16 e 17) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L^{-1} .

Verificou-se que a variação do volume do *headspace* de 33,18 a 66,82% nos reatores da etapa I não influenciou no consumo de carboidratos dissolvidos. Por exemplo, redução de carboidratos de $65 \pm 6\%$ foi observada em *headspace* de 40% (inicial de $1.928 \pm 268\ mg\ L^{-1}$, ensaios 1, 2, 5 e 6), de $54 \pm 14\%$ com *headspace* 50% (inicial de $2.256 \pm 166\ mg\ L^{-1}$, ensaios 9, 10, 13, 14, 15, 16 e 17) e de $68 \pm 8\%$ com *headspace* 60% (inicial de $1.967 \pm 202\ mg\ L^{-1}$, ensaios 3, 4, 7, e 8). Novamente, verificou-se $58 \pm 4\%$ de consumo de carboidratos no ensaio 11 (33,18% *headspace*, concentração inicial de $1.750\ mg\ L^{-1}$) e no ensaio 12 (66,82% *headspace*, concentração inicial de $1.880\ mg\ L^{-1}$). Resultados similares foram observados por Lee et al.

(2012) durante a produção de H_2 em reatores de mistura completa alimentados com sacarose, sob condições de fermentação de 37 °C, pH 5,5, e diferentes pressões (entre 0,17 e 1 atm). Os autores observaram redução próxima a 100% para pressão de até 1 atm no reator.

Observou-se $66 \pm 7\%$ de redução nos carboidratos com concentração de polpa e casca de 9 g L⁻¹ (ensaios 1, 2, 3 e 4, inicial de 1.908 ± 180 mg L⁻¹) e 15 g L⁻¹ (ensaios 5, 6, 7 e 8, inicial de 1.988 ± 277 mg L⁻¹), nos reatores em batelada da etapa I. Provavelmente, a maioria dos açúcares estavam na forma insolúvel, como celulose e hemicelulose, fato evidenciado nos ensaios 13 e 14 com concentração mínima (6,95 g L⁻¹) e máxima (17,05 g L⁻¹) de polpa e casca, onde o consumo de carboidratos foi de $43 \pm 6\%$ para 2.290 e 2.100 mg L⁻¹ iniciais de carboidratos respectivamente.

A transformação da matéria orgânica em metabólitos gasosos ou dissolvidos dos reatores da etapa I foi estudada mediante o parâmetro de demanda química de oxigênio (DQO). Observou-se diminuição da DQO dissolvida de 21.844 ± 2.034 para 20.258 ± 2.935 mg DQO L⁻¹ nos ensaios 1, 3, 4, 7, 8 e 13. Este resultado, possivelmente, foi consequência da transformação em biogás (Gómez et al., 2011). Segundo Thanwised (2017), a remoção de matéria orgânica pode ser utilizada como parâmetro da fermentação, uma vez que indica a degradação de substratos orgânicos para a obtenção de energia e produção de H_2 , verificando remoção de 45,3% e 57,5% para 172 e 346 mL H_2 L⁻¹, respectivamente. O autor utilizou reatores em batelada com água residuária da produção de tapioca (9.277 mg DQO L⁻¹), em pH 5,0 – 7,0 e lodo de UASB procedente de indústria de tapioca tratado termicamente (105 °C por 2 h).

Nos ensaios 2, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16 e 17 da etapa I verificou-se aumento de DQO dissolvida de 21.842 ± 2.241 para 23.697 ± 2.488 mg DQO L⁻¹ (Figura 5.38). Possivelmente, em função da hidrólise da polpa e casca ocorreu a liberação de matéria orgânica para a fase líquida do reator. Bactérias, como os *Clostridium* sp. e *Bacillus* sp., e fungos *Aspergillus* sp. foram identificados no consórcio microbiano, os quais possuem enzimas capazes de degradar material polimérico liberando monômeros (de Gonzalo et al., 2016; Lynd et al., 2002), que consequentemente, aumentaram a concentração de matéria orgânica dissolvida.

Verificou-se maiores reduções na concentração de matéria orgânica nos ensaios 7 (de 22.833 para 18.422 mg DQO L⁻¹) e 1 (de 18.933 para 16.953 mg DQO L⁻¹) da etapa I, nos quais observou-se altas produções de H₂ de 178 e 206 mL H₂. Este resultado corresponde com o referenciado por Thanwised (2017), verificou maior consumo de matéria orgânica (57,5%) como consequência de produção de 346 mL H₂ L⁻¹, uma vez que a degradação conduziu a produção de biogás.

Não foi observado relação entre a concentração de fenóis e o potencial máximo de produção de H₂ (*P*) para os reatores da etapa I. No ensaio 2, no qual observou-se melhores resultados de *P* (112 mL H₂), a concentração inicial e final de fenol foram de 331 e 147 mg L⁻¹, respectivamente. Para as condições do ensaio 4 com menor valor de *P* (55 mL de H₂), observou-se 372 e 189 mg L⁻¹ de fenol inicial e final, respectivamente. Desta forma, outros fatores interferiram negativamente na produção de H₂, e não necessariamente o fenol (Figura 5.38, Tabela 5.20).

Observou-se menor concentração de fenol na maioria dos ensaios, em pH inicial 7,5 (ensaio 6, de 408 para 212 mg L⁻¹), pH 6,5 (ensaio 15, de 544 para 195 mg L⁻¹) e pH 5,5 (ensaio 7, de 376 para 146 mg L⁻¹). Similarmente, em meio ácido de 4,82 a redução de fenol foi inferior (inicial 300 e final 118 mg L⁻¹, ensaio 9), quando comparado em meio alcalino de 8,18 (inicial 360 e final 168 mg L⁻¹, ensaio 9). Essa redução foi relacionada a presença de bactérias degradadoras de fenol no consórcio microbiano, tais como *Clostridium* sp. (Figura 5.23). Por exemplo, Tai et al. (2010) observaram degradação de 35% a 67% de fenol (concentração inicial entre 200 e 400 mg L⁻¹) durante a produção de H₂, mediante *Clostridium butyricum* em reatores em batelada contendo glicose (5 g L⁻¹) e fenol, a 37 °C e pH 6,5.

No entanto, nos ensaios 3 e 12 observou-se ligeiro aumento da concentração de fenol (de 329 e 395 mg L⁻¹ para 351 e 447 mg L⁻¹, respectivamente), provavelmente, relacionado a maior atividade das bactérias hidrolíticas em pH 4,82 e 5,5, com liberação desse composto a partir da hidrólise da lignina da polpa e casca de café. Fungos e bactérias com atividade celulolítica (Dashtban et al., 2009; de Gonzalo et al., 2016) crescem melhor em meio com pH ácido como aqueles dos ensaios 3 e 12.

O volume de *headspace* não afetou diretamente a degradação de fenol durante a fermentação da etapa I, uma vez que obteve-se remoção similar com 40% (ensaio 2, de 331 para 147 mg L⁻¹) e 60% de *headspace* (ensaio 6, de 402 para 212 mg L⁻¹). Houve diferença durante a fermentação nos níveis máximo (66,82%) e mínimo (33,18%) de *headspace*, verificando-se aumento em fenol no primeiro caso (ensaio 12, 395 para 447 mg L⁻¹) e redução no segundo (ensaio 11, de 360 para 223 mg L⁻¹). De acordo com Cazier et al. (2015), a alta pH₂ pode afetar a hidrólise durante a digestão anaeróbia, o que explica o aumento de fenol por hidrólise durante o ensaio 12 para maior porcentagem de *headspace* (66,82%).

Observou-se diminuição de fenol de 369 para 155 mg L⁻¹ no ensaio 5 e de 331 para 147 mg L⁻¹ no ensaio 2 em relação a concentração de polpa e casca de 15 g L⁻¹ e 9 g L⁻¹, respectivamente. Todavia, nos ensaios 3 (de 329 para 351 mg L⁻¹) e 12 (de 395 para 447 mg L⁻¹) com 9 e 12 g L⁻¹ de polpa e casca, respectivamente, observou-se ligeiro aumento de fenol, provavelmente devido a hidrólise. Possivelmente, na co-digestão de resíduos de café a hidrólise foi limitada, uma vez que a atividade catalítica não aumentou proporcionalmente com a disponibilização de substrato. Estes resultados foram similares aos observados por Ratti et al. (2013), com diminuição na degradação de celulose de 41% para 28% para 2,5 e 5 g L⁻¹, respectivamente, durante a operação de reatores em batelada com celulasas a pH 7,0 e 37°C, utilizando como inóculo lixiviado de aterro sanitário. Isso porque as reações hidrolíticas podem ser lentas e incompletas (Battista et al., 2016), conduzindo a baixa liberação de fenóis mediante degradação da lignina.

5.7.3. Ácidos orgânicos, álcoois e pH da Etapa I (Produção de H₂)

O pH e as concentrações de ácidos orgânicos no início da fermentação, fase exponencial (de 24 a 130 h de operação) e final da etapa I (de 42 a 230 h de operação) foram determinadas para obtenção de H₂ (Figura 5.39, Tabela 5.21). Ácido cítrico e fórmico foram observados em todos os ensaios, mas cujos valores foram inferiores ao limite de detecção do método cromatográfico, sendo assim, não foram considerados a título de discussão.

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

Tabela 5.21: Ácidos orgânicos, álcoois e pH dos reatores em batelada da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H₂.

Ensaio	Fase	pH	Etanol	n-Butanol	Ácido Acético	Ácido Propiónico	Ácido Butírico	Ácido Láctico	Ácido isovalérico	Ácido valérico	Ácido capróico
(mg L ⁻¹)											
1	Inicial	5,5	1.868	70	584	≤ LD	1.014	4.198	13	50	65
	Exponencial		1.470	71	566	16	3.229	2.792	15	57	66
	Final I	8,1	3.370	156	446	≤ LD	3.884	31	26	109	138
2	Inicial	7,5	3.286	73	871	≤ LD	1.279	4.562	14	52	68
	Exponencial		3.492	72	872	≤ LD	2.255	3.924	14	55	67
	Final I	7,3	4.453	147	962	≤ LD	4.216	2.135	25	109	139
3	Inicial	5,5	2.416	72	611	≤ LD	1.072	3.372	13	53	69
	Exponencial		1.180	70	604	47	3.845	2.490	15	58	62
	Final I	7,6	2.843	173	820	≤ LD	3.540	≤ LD	27	102	143
4	Inicial	7,5	3.441	72	832	≤ LD	1.628	2.836	15	52	68
	Exponencial		3.598	71	912	≤ LD	1.749	4.490	13	54	65
	Final I	7,0	3.875	170	1.455	≤ LD	5.021	1.363	24	108	130
5	Inicial	5,5	2.496	71	811	≤ LD	980	3.596	13	53	67
	Exponencial		3.488	72	631	40	3.938	2.757	16	53	69
	Final I	7,7	3.470	164	810	≤ LD	5.166	≤ LD	26	105	139
6	Inicial	7,5	3.724	73	848	≤ LD	1.922	21	16	53	70
	Exponencial		6.349	73	1.000	≤ LD	2.480	4.325	15	53	68
	Final I	7,4	3.989	153	1.132	≤ LD	4.933	1.466	25	107	142
7	Inicial	5,5	2.047	70	704	≤ LD	920	3.333	≤ LD	≤ LD	69
	Exponencial		4.809	76	384	82	4.126	1.652	14	50	66
	Final I	7,5	3.914	173	842	≤ LD	5.339	≤ LD	29	101	149
8	Inicial	7,5	4.157	73	777	≤ LD	1.507	4.137	14	52	68
	Exponencial		4.694	73	1.010	≤ LD	2.287	4.008	14	58	64
	Final I	7,3	3.354	158	1.344	≤ LD	5.826	1.143	25	103	145
9	Inicial	4,8	3.243	72	775	≤ LD	1.230	4.671	14	74	69
	Exponencial		3.523	75	476	10	4.119	2.847	15	58	67
	Final I	5,8	2.577	181	490	≤ LD	5.468	≤ LD	24	106	185
10	Inicial	8,2	2.747	73	658	≤ LD	1.441	4.735	14	55	68
	Exponencial		2.943	73	832	≤ LD	1.859	4.735	14	55	≤ LD
	Final I	7,5	2.761	162	1.307	≤ LD	5.137	347	24	106	140
11	Inicial	6,5	1.201	71	625	≤ LD	1.385	5.303	14	52	69
	Exponencial		4.087	72	773	≤ LD	2.972	5.314	15	58	67
	Final I	7,9	2.904	145	857	≤ LD	3.807	2.050	23	103	133
12	Inicial	6,5	2.588	71	782	≤ LD	1.716	4.969	15	54	68
	Exponencial		4.017	72	869	≤ LD	2.919	4.018	15	59	65
	Final I	7,5	3.494	162	1.355	≤ LD	4.831	1.272	24	103	131
13	Inicial	6,5	3.432	75	843	≤ LD	1.698	5.483	15	54	71
	Exponencial		1.644	74	890	≤ LD	2.841	4.219	14	52	68
	Final I	7,8	3.308	1.40	817	≤ LD	4.112	2.707	24	106	127

Continua.

Continuação Tabela 5.21

Ensaio	Fase	pH	Etanol	n-Butanol	Ácido Acético	Ácido Propiônico	Ácido Butírico	Ácido Láctico	Ácido isovalérico	Ácido valérico	Ácido capróico
(mg L ⁻¹)											
14	Inicial	6,5	2.915	71	712	≤ LD	1.620	4.441	14	56	70
	Exponencial		3.505	72	734	≤ LD	2.734	4.202	15	56	68
	Final I	7,8	3.537	145	758	≤ LD	4.665	1.952	24	106	132
15 PC	Inicial	6,5	3.849	72	781	≤ LD	2.044	5.016	16	59	70
	Exponencial		1.770	70	645	≤ LD	2.266	4.210	13	52	67
	Final I	7,5	4.398	141	648	≤ LD	4.870	2.848	24	108	128
16 PC	Inicial	6,5	3.849	72	781	≤ LD	2.044	5.016	16	59	70
	Exponencial		1.178	69	637	≤ LD	3.136	4.154	15	58	67
	Final I	7,5	3.560	141	765	≤ LD	3.860	2.628	23	105	140
17 PC	Inicial	6,5	3.849	72	781	≤ LD	2.044	5.016	16	59	70
	Exponencial		4.304	73	792	≤ LD	3.258	3.967	15	58	66
	Final I	7,6	3.823	141	707	≤ LD	4.124	2.825	24	106	129

≤ LD Inferior ao limite de detecção, PC Ponto central. Ensaios 1) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 2) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 3) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 4) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 5) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 6) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 7) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 8) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 9) pH 4,82, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 10) pH 8,18, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 11) pH 6,5, *headspace* 33,18%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 12) pH 6,5, *headspace* 66,82%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 13) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 6,95 g L⁻¹; 14) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 17,05 g L⁻¹; 15, 16 e 17) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹.

Nos ensaios 2, 4, 6, 8 e 10 observou-se ligeira diminuição de pH de 7,5 – 8,2 (pH inicial) para 7,0 – 7,5 (pH final na etapa I). Isso foi decorrente da produção de ácidos orgânicos, entre 4.337 e 5.148 mg L⁻¹, provavelmente com a predominância de rotas metabólicas acidogênicas (Zhou et al., 2017). Todavia, nos ensaios 1, 3, 5, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17 observaram-se aumento do pH de 4,8 – 6,5 (início) para 5,8 – 8,1 (final da etapa I), provavelmente devido a ocorrência de rotas que permitem a liberação de bicarbonato, com consequente aumento da alcalinidade, tais como a síntese de ácido acético (produção entre 46 e 649 mg L⁻¹) a partir de ácido láctico (consumo entre 1.816 e 4.419 mg L⁻¹, Equação 5.3).

Figura 5.39. Produção de ácidos orgânicos e álcoois dos reatores em batelada da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H₂ e II de avaliação da homoacetogênese.

Ensaio 1) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 2) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 3) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 4) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 5) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 6) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 7) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 8) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 9) pH 4,82, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 10) pH 8,18, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 11) pH 6,5, *headspace* 33,18%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 12) pH 6,5, *headspace* 66,82%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 13) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 6,95 g L⁻¹; 14) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 17,05 g L⁻¹; 15, 16 e 17) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹.

Em todos os ensaios da etapa I, foi observado de 5 a 8 diferentes ácidos orgânicos, confirmando a coexistência de comunidade microbiana complexa e capacidade metabólica diversa (Liu and Wang, 2017).

Em todos os ensaios da etapa I o principal metabólito observado foi o ácido butírico, de 4.419 e 4.319 mg L⁻¹ no ensaio 7 (pH 5,5, *headspace* 60% e polpa e casca 15 g L⁻¹) e 8 (pH 7,5, *headspace* 60% e polpa e casca 15 g L⁻¹), respectivamente. Nesses ensaios, a característica comum foi a maior porcentagem de *headspace* e concentração de substrato. Resultados similares foram observados por Mizuno et al. (2000) durante a operação de reatores de mistura completa alimentados com glicose a 35 °C, pH 6,0 e inoculado com microrganismos oriundos de grãos de soja. Os autores verificaram aumento na produção de ácido butírico de 1.771 para 1.942 mg L⁻¹ após redução da pH₂ mediante injeção de N₂.

Em função do aumento de ácido butírico do início até o final da fermentação da etapa I, em todas as condições experimentais testadas, pode-se inferir sobre a predominância de bactérias semelhantes a *Clostridium* no consórcio microbiano, referenciada como produtora de H₂ via rota do ácido butírico a partir resíduos celulósicos (Islam et al., 2015), principal constituinte da polpa e casca de café utilizadas como substrato.

Etanol foi observado em concentrações altas principalmente na fase exponencial dos ensaios 7 e 11 (2.762 e 2.886 mg L⁻¹, respectivamente), e diminuição no final da etapa I (1.867 e 1.703 mg L⁻¹, respectivamente). Estes ensaios foram conduzidos sob condições diferentes (pH 5,5, *headspace* 60% e polpa e casca 15 g L⁻¹ no ensaio 7 e pH 6,5, *headspace* 33,18% e polpa e casca 12 g L⁻¹ no ensaio 11). Sob tais condições, provavelmente, bactérias semelhantes a *Clostridium* sp. (Lynd et al., 2002) contribuíram para produção de etanol independente das condições de fermentação. Devido a produção de etanol durante a fase exponencial (Equação 5.14) pode ter ocorrido a liberação de bicarbonato, consequentemente aumentando o pH para 7,5 (ensaio 7) e 7,9 (ensaio 11), observados no final da etapa I.

Concentração máxima de ácido acético foi observada no ensaio 4 (pH 7,5, *headspace* 60% e concentração de polpa casca 9 g L⁻¹) e ensaio 10 (pH 8,18, *headspace* 50% e polpa e casca 12 g L⁻¹), de 832 e 658 mg L⁻¹, respectivamente (início) até 912 e 832 mg L⁻¹, respectivamente (fase exponencial) e de 1.455 e 1.307 mg L⁻¹, respectivamente, (final da etapa I). Maior volume de *headspace* (>50%) e produção intermediária de H₂ (entre 55 e 163 mL

H₂) podem ter favorecido estes resultados, uma vez que a acidogênese e acetogênese são termodinamicamente favoráveis quando a pH₂ é baixa (Liu and Wang, 2017). Diminuição da concentração de ácido acético foi verificada principalmente nos ensaios 1 (fase inicial: 584 mg L⁻¹, exponencial: 566 mg L⁻¹ e final I: 446 mg L⁻¹) e 9 (fase inicial: 775 mg L⁻¹, exponencial: 476 mg L⁻¹ e final I: 490 mg L⁻¹), em condições com 2.870 e 4.238 mg L⁻¹ de ácido butírico no final da etapa I. Segundo Spirito et al. (2014), a rota de alongamento da cadeia via β oxidação reversa pode levar a síntese de ácido butírico a partir de ácido acético e ácido láctico (Equação 5.16) (Spirito et al., 2014), o que poderia explicar menor concentração de ácido acético nos ensaios 1 e 9.

Por meio da equação 5.16 também se pode explicar a redução na concentração de ácido láctico observada em todos os ensaios, com exceção do ensaio 6 (1.445 mg L⁻¹). Por exemplo, no ensaio 1, observou-se diminuição da concentração de ácido láctico de 4.671 mg L⁻¹ no início da fermentação, para inferior ao limite de detecção, no final da etapa I, provavelmente, relacionada ao alongamento de cadeia. As reações das equações 5.3 e 5.7 também podem ter ocorrido e contribuído para o consumo de ácido láctico com produção de ácido acético (entre 46 e 649 mg L⁻¹ nos ensaios 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12 e 14) e butírico (entre 1.816 e 4.419 mg L⁻¹ em todos os ensaios).

Em relação ao n-Butanol observou-se menor concentração (máximo de 6 mg L⁻¹, ensaios 1, 5, 7, 9, 11, 12,14 e 17) ou inferior ao limite de detecção na fase exponencial da fermentação, e entre 65 e 109 mg L⁻¹ no final da etapa I em todas as condições experimentais (Tabela 5.21). A solventogênese foi favorecida pelo aumento da pH₂ (de Sá et al., 2014), somente no final da etapa I, na qual obteve-se produção de H₂ entre 55 e 244 mL H₂.

Os ácidos valérico e isovalérico foram observados em todos os ensaios, entre 7 e 29 mg L⁻¹ (início) e entre 32 e 101 mg L⁻¹ (final). No ensaio 7 (pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 15 g L⁻¹) verificou-se a máxima concentração para ambos os ácidos (29 e 101 mg L⁻¹ para ácido valérico e isovalérico, respectivamente). Saady (2013) descreve a equação 5.17 para a síntese de ácido valérico a partir de ácido propiônico e H₂, o qual justifica a diminuição no

ácido propiônico de 82 mg L⁻¹ na fase exponencial para inferior ao limite de detecção no ensaio 7 no final da etapa I, e permite inferir, que a produção de H₂ pode ter sido afetada em função da produção deste ácido.

Similarmente, ácido capróico foi observado entre 56 e 116 mg L⁻¹ em todos os ensaios. Este ácido orgânico pode ser produzido a partir de ácido butírico, CO₂ e H₂ (Equação 5.18) ou a partir de glicose (Equação 5.19).

Provavelmente, o ácido capróico foi decorrente da fermentação da glicose (Equação 5.19), porque não se observou diminuição da concentração de ácido butírico em nenhum dos reatores (Eq. 5.18), mas fermentação dos carboidratos dissolvidos (de 80 a 89%). A natureza dos substratos também pode ter influenciado essa possibilidade, uma vez que ácido capróico a partir de derivados de lignocelulose (polpa e casca) e água residuária de café foram observadas em outras pesquisas. Por exemplo, Jung et al. (2010) obtiveram entre 21 e 23% de ácido capróico a partir de água residuária de café, em reator UASB de produção de H₂ a 35 °C, e microrganismos autóctones dos resíduos como inóculo. Similarmente, Quéméneur et al. (2012) verificaram ácido capróico a partir da lignina em reatores em batelada de produção de H₂ em pH 5,5, com lodo tratado termicamente como inóculo (90 °C por 10 minutos).

5.7.4. Ácido acético, H₂ e parâmetros físico-químicos da Etapa II (Homoacetogênese)

Após a estabilização da produção de H₂ (2-9 d de operação, etapa I), continuou-se monitorando o biogás por 10 a 18 d de operação (etapa II). Verificou-se diminuição e estabilização do H₂ acumulado, além de aumento da concentração de ácido acético em todas as condições de operação, fenômeno relacionado com a homoacetogênese, pelo qual, determinou-se as concentrações de ambos os produtos metabólicos em cada etapa da fermentação (Tabela 5.22). O ácido acético produzido como consequência da

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

homoacetogênese (Ac_{Homo}) foi calculado segundo Luo et al. (2011) (ver Material e Métodos, Seção 4.3.4).

Tabela 5.22: Ácido acético e H_2 dos reatores em batelada da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H_2 e II de avaliação da homoacetogênese.

Ensaio	Experimentos*			Ácido acético por homoacetogênese			Hidrogênio		
	pH	Headspace	Polpa e casca	Etapa I	Etapa II	Aumento	Etapa I	Etapa II	Diminuição
		(%)	(g L ⁻¹)		(mg L ⁻¹)			(mL H ₂)	
1	5,5	40	9	0	2.293	2.293	206	83	123
2	7,5	40	9	0	2.409	2.409	112	13	99
3	5,5	60	9	0	2.402	2.402	203	9	194
4	7,5	60	9	81	2.639	2.558	55	14	41
5	5,5	40	15	0	3.106	3.106	244	57	187
6	7,5	40	15	0	1.735	1.735	106	15	91
7	5,5	60	15	0	1.890	1.890	178	41	137
8	7,5	60	15	45	1.655	1.610	89	14	75
9	4,82	50	12	0	2.449	2.449	228	126	102
10	8,18	50	12	0	1.915	1.915	163	77	86
11	6,5	33,18	12	0	2.024	2.024	170	49	121
12	6,5	66,82	12	36	2.941	2.905	89	26	63
13	6,5	50	6,95	0	3.066	3.066	154	47	107
14	6,5	50	17,05	0	1.299	1.299	137	60	77
15 PC	6,5	50	12	1.033	3.225	2192	157	49	108
16 PC	6,5	50	12	868	2.293	1.425	148	40	108
17 PC	6,5	50	12	902	2.160	1.258	154	44	110

*Condições experimentais do início da etapa I. PC Ponto central.

Em função da produção de ácidos orgânicos e álcoois durante a etapa I ocorreu alteração do pH dos reatores, portanto, no início da etapa II verificou-se pH entre 5,8 e 8,1 (Tabela 5.23), não relacionando-se com o aumento do Ac_{Homo} . Isto porque, tanto em meio ácido de 5,8, quanto alcalino de 8,1 verificou-se valores próximos de 2.449 (ensaio 9) e 2.293 mg L⁻¹ de Ac_{Homo} (ensaio 1). Similarmente, o máximo (194 mL H₂, ensaio 3) e mínimo consumo de H₂ (41 mL H₂, ensaio 4) foram verificados em pH próximo à neutralidade (de 7,6 e 7,0, respectivamente). Sob tais condições não se observou efeito do pH sobre a

homoacetogênese autotrófica. Yan et al. (2014) referenciam que a diminuição do pH (inferior a 5,5), acúmulo de ácidos orgânicos e álcoois, inibiram as bactérias homoacetogênicas durante a operação de reatores em batelada alimentados com glicose, sob condições experimentais de 37 °C, pH inicial 7,0, e *Acetobacterium woodii* em co-cultura com microrganismos acetogênicos. No caso específico desta pesquisa com resíduos de café as condições de pH e concentrações de ácidos orgânicos no início da etapa II não foram deletérias para a homoacetogênese.

Relação direta entre o volume de *headspace* e aumento do Ac_{Homo} não foi observada, uma vez que, foram observados valores próximos. Por exemplo, para 33,18% e 40% de *headspace* observou-se 2.024 mg L⁻¹ (ensaio 11) e 2.386 ± 563 mg L⁻¹ de ácido acético (ensaios 1, 2, 5 e 6), respectivamente, enquanto para maior volume de *headspace* de 66,82% e 60% observou-se 2.905 mg L⁻¹ (ensaio 12) e 2.115 ± 441 mg L⁻¹ (ensaios 3, 4, 7 e 8).

Tendência semelhante foi observada para o H₂, sendo observada diminuição similar de 121 e 112 mL H₂ para condição mínima (33,18%, ensaio 11) e máxima (66,82%, ensaio 12) de *headspace*. Este resultado difere da análise estatística realizada para a hipótese 5 sobre “Avaliação dos parâmetros fermentativos que conduzem ao consumo de H₂ por homoacetogênese” (Seção 5.6), sendo confirmado o efeito significativo do volume do *headspace* sobre a homoacetogênese, entre 6 e 9 dias, após a estabilização da produção de H₂. Kisielewska et al. (2015) também citaram que maior pressão e concentração de CO₂ e H₂ podem favorecer condições adequadas para alteração da rota metabólica de produção para consumo de H₂. Possivelmente, o acúmulo de biogás em todos os ensaios no início da etapa II conduziu a alta pH₂, mascarando o efeito do volume de *headspace* em relação a concentração de Ac_{Homo} e consumo de H₂.

Efeito da concentração de polpa e casca sobre o aumento do Ac_{Homo} nos reatores da etapa II foi evidenciado, sendo de 3.066 (ensaio 13) e 2.416 ± 109 mg L⁻¹ (ensaios 1, 2, 3 e 4), respectivamente, para 6,95 e 9 g L⁻¹ dos resíduos. Por outro lado, valores menores de Ac_{Homo} , de 2.085 ± 370 e 1.299 mg L⁻¹, foram observados para 15 (ensaios 6, 7 e 8) e 17,05 g L⁻¹ de polpa e casca (ensaio 14). Por meio da análise de superfície de resposta (Figura 5.37) observou-se maior produção de H₂ para polpa e casca entre 6,95 e 9 g L⁻¹, portanto, neste mesmo intervalo foi possível obter a maior produção de Ac_{Homo} , uma vez que, H₂ e CO₂ são precursores da homoacetogênese (Saady, 2013).

No entanto, não se verificou nos ensaios relação com a concentração de polpa e casca e diminuição do H_2 acumulado, uma vez que, tanto para maior ou menor concentração destes substratos obteve-se resultados próximos, sendo de 114 ± 63 mL H_2 para 9 g L^{-1} de polpa e casca (ensaios 1, 2, 3 e 4) e 123 ± 26 mL H_2 para 15 g L^{-1} de polpa e casca (ensaios 6, 7, 8 e 9). Provavelmente, isto foi devido à capacidade de crescimento autotrófico e heterotrófico das bactérias homoacetogênicas (Saady, 2013), a partir de carboidratos disponibilizados pela polpa e casca ou dos gases no *headspace*.

O aumento da concentração de ácido acético por homoacetogênese (Ac_{Homo}) e diminuição do H_2 acumulado foram comparados mediante teste de Tukey ($\alpha=0,05$, Figura 5.40), por ser parâmetros com distribuição normal (p-valor de Shapiro-wilks 0,2017 para o aumento de Ac_{Homo} e 0,1053 para a diminuição de H_2). Não se verificou diferença significativa ($\alpha=0,05$) no aumento da concentração de Ac_{Homo} sob as condições experimentais selecionadas. Portanto, pode ter ocorrido homoacetogênese em amplo intervalo de condições de fermentação (pH 4,82 – 8,18, *headspace* 33,18 – 66,82%, polpa e casca $6,95 - 17,05 \text{ g L}^{-1}$).

Obteve-se homoacetogênese com consumo significativamente menor de H_2 (95% de confiança) nas condições dos ensaios 4 (pH 7,5, *headspace* 60%, polpa 9 g L^{-1}), 8 (pH 7,5, *headspace* 60%, polpa 15 g L^{-1}), 12 (pH 6,5, *headspace* 66,82%, polpa 12 g L^{-1}) e 14 (pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca $17,05 \text{ g L}^{-1}$). Foi possível verificar condições de inferior consumo de H_2 para a homoacetogênese, nas quais foram em pH inicial próximo a neutralidade (entre 6,5 e 7,5) e baixa pH_2 (para *headspace* entre 50% e 66,82%). Este resultado é interessante, uma vez que possibilita tomar medidas de controle para evitar perdas no rendimento H_2 em função da homoacetogênese.

Figura 5.40. Intervalos de confiança do (a) Aumento de ácido acético por homoacetogênese (Ac_{Homo}) e (b) Diminuição de H_2 dos reatores em batelada durante a etapa II de avaliação da homoacetogênese.

Teste de diferença honestamente significativa (HSD) de Tukey: Intervalos com sobreposição são estatisticamente iguais (95% de confiança). Ensaios 1) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 2) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 3) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 4) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 5) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 6) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 7) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 8) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 9) pH 4,82, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 10) pH 8,18, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 11) pH 6,5, *headspace* 33,18%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 12) pH 6,5, *headspace* 66,82%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 13) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 6,95 g L⁻¹; 14) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 17,05 g L⁻¹; 15, 16 e 17) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹.

Parâmetros físico-químicos como carboidratos dissolvidos, sólidos suspensos totais (SST), demanda química de oxigênio dissolvida (DQO) e fenóis foram determinados para a etapa II, com o intuito de relacionar o consumo de substrato orgânico (redução de carboidratos), crescimento de biomassa (aumento de SST) e hidrólise (aumento da matéria orgânica e fenol) com o consumo de H_2 (Tabela 5.23 e Figura 5.40).

Verificou redução de carboidratos, entre 37% e 76% para 378 e 1.500 mg L^{-1} no início da etapa II em todos os ensaios. Em função do consumo de carboidratos e produção de H_2 em todos os ensaios, evidenciou-se metabolismo heterotrófico e autotrófico sob todas as condições experimentais estudadas (pH 5,8 – 8,1, *headspace* 33,18 – 66,82% e concentração de polpa e casca 6,95 – 17,05 g L^{-1}), seja para a produção de Ac_{Homo} ou de outros ácidos orgânicos e álcoois.

Relação direta não foi observada entre consumo de H_2 e carboidratos (Figura 5.41), sendo observada diminuição em H_2 de 99 e 86 mL H_2 em relação a maior redução de carboidratos (76% para 853 mg L^{-1} de carboidratos inicial, ensaio 2) e menor redução de carboidratos (47% para 378 mg L^{-1} de carboidratos inicial, ensaio 3), respectivamente. Por meio dessa análise verificou-se que a homoacetogênese originou-se também a partir de substrato orgânico, uma vez que durante o crescimento heterotrófico, 1 mol de glicose permite sintetizar 3 mol de ácido acético, o qual significa ganho energético maior que o crescimento sob condição autotrófica (Saady, 2013). No entanto, deve ser considerado, que os açúcares podem ter sido utilizados também para a síntese de biomassa ou outros ácidos orgânicos ou álcoois (Palomo-Briones et al., 2017).

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

Tabela 5.23: Parâmetros físico-químicos dos reatores em batelada da etapa II de avaliação da homoacetogênese.

Ensaio	Condições Experimentais			Parâmetros físico-químicos								Homoacetogênese
	pH	Headspace	Polpa e casca	Carboidratos dissolvidos		SST		DQO dissolvida		Fenol		Aumento no Ac _{Homo}
		(%)	(g L ⁻¹)	Inicial (mg L ⁻¹)	Final (mg L ⁻¹)	Inicial* (mg L ⁻¹)	Final (mg L ⁻¹)	Inicial (mg L ⁻¹)	Final (mg L ⁻¹)	Inicial (mg L ⁻¹)	Final (mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)
1	8,1	40	9	575	224	575	770	16.953	18.713	332	376	2.293
2	7,3	40	9	853	203	390	350	22.516	13.983	147	583	2.409
3	7,6	60	9	378	202	620	269	17.797	12.317	351	594	2.402
4	7,0	60	9	868	240	675	772	21.875	24.913	189	496	2.558
5	7,7	40	15	578	220	470	304	19.656	15.450	155	610	3.106
6	7,4	40	15	695	274	665	748	21.375	23.750	212	492	1.735
7	7,5	60	15	550	267	795	628	18.422	21.713	146	410	1.890
8	7,3	60	15	780	266	850	693	22.203	26.813	202	489	1.610
9	5,8	50	12	735	376	580	413	20.859	22.188	118	489	2.449
10	7,5	50	12	523	331	780	623	23.156	22.850	168	435	1.915
11	7,9	33,18	12	795	347	625	480	25.906	25.167	223	582	2.024
12	7,5	66,82	12	743	351	635	417	27.188	25.146	447	600	2.905
13	7,8	50	6,95	1.210	365	815	837	24.297	25.135	315	466	3.066
14	7,8	50	17,05	1.290	366	550	658	23.109	23.438	232	476	1.299
15 PC	7,5	50	12	1.500	370	805	542	26.344	25.740	195	498	2.192
16 PC	7,5	50	12	1.010	398	805	628	25.984	27.490	218	489	1.425
17 PC	7,6	50	12	995	403	805	553	24.578	26.167	473	509	1.258

*início da etapa I. *PC* Ponto central, *SST* Sólidos suspensos totais, *DQO* Demanda química de oxigênio, *Ac_{Homo}* Ácido acético por homoacetogênese..

Figura 5.41. (a) Variação do H₂ acumulado, carboidratos dissolvidos e sólidos suspensos totais (SST) (b) Variação do H₂ acumulado, demanda química de oxigênio (DQO) e fenol dos reatores em batelada da etapa II de avaliação da homoacetogênese.

Ensaio 1) pH 8,1, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 2) pH 7,3, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 3) pH 7,6 *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 4) pH 7,0, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 5) pH 7,7, *headspace* 40%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 6) pH 7,4, *headspace* 40%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 7) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 8) pH 7,3, *headspace* 60%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 9) pH 5,8, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹, 10) pH 7,5, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 11) pH 7,9, *headspace* 33,18%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 12) pH 7,5, *headspace* 66,82%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 13) pH 7,8, *headspace* 50%, polpa e casca 6,95 g L⁻¹; 14) pH 7,8, *headspace* 50%, polpa e casca 17,05 g L⁻¹; 15, 16 e 17) pH 7,5-7,6, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹.

Nos ensaios da etapa II foi observado em relação ao pH inicial e redução de carboidratos, valor ligeiramente maior de 61% (575 mg L⁻¹ de carboidratos inicial, ensaio 1) para maior valor de pH de 8,1 e menor redução de 48% (735 mg L⁻¹ de carboidratos inicial, ensaio 9) em pH de 5,8. Sob tais condições provavelmente ocorreu homoacetogênese heterotrófica em todo o intervalo de pH estudado (5,8 a 8,1). Göbner et al., (2008) observaram o crescimento de bactérias homoacetogênicas isoladas de turfas, como *Clostridium drakei* em pH entre 3,6 e 7,4 a partir de substratos como celobiose, xilose, lactato, H₂ e CO₂. Provavelmente, bactérias similares podem ter crescido nos reatores deste estudo a partir do material lignocelulósico, ácidos orgânicos ou biogás.

Em relação a redução de carboidratos e *headspace* verificou-se ligeira variação na etapa II. Por exemplo, observou redução de 56% e 65 ± 8% em *headspace* menor de 33,18% (ensaio 11) e 40% (ensaios 1, 2, 5 e 6) e de 59 ± 12% e 53% para *headspace* maior de 60% (ensaios 3, 4, 7 e 8) e 66,8% (ensaio 12), respectivamente. A partir dessa observação pode-se inferir sobre a ocorrência da homoacetogênese heterotrófica em qualquer pH₂, possivelmente consequência das vantagens energéticas a partir de substrato orgânico.

A concentração de polpa e casca não influenciou a homoacetogênese heterotrófica durante a etapa II, uma vez que obteve-se redução de carboidratos de 71 ± 1% para 6,95 e 17,05 g L⁻¹ de polpa e casca (carboidratos inicial entre 1.210 e 1.290 mg L⁻¹, ensaios 13 e 14) e 62 ± 10% para 9 e 15 g L⁻¹ de polpa e casca (carboidratos inicial entre 378 e 868 mg L⁻¹, ensaios 13 e 14). Provavelmente foi consequência da capacidade das bactérias homoacetogênicas em alterar as suas vias metabólicas para utilizar vários substratos orgânicos (Saady, 2013).

Nos ensaios 2, 3, 5, 10, 11, 12 e 15 observaram-se diminuições da matéria orgânica de 23.223 ± 3.543 para 20.093 ± 5.918 mg DQO L⁻¹, provavelmente para a síntese da biomassa (Palomo-Briones et al., 2017). Nos ensaios 1, 4, 6, 7, 8, 9, 13, 14, 16 e 17 observaram-se aumento da matéria orgânica de 21.966 ± 2.770 para 24.032 ± 2.662 mg DQO L⁻¹, consequência tanto da homoacetogênese autotrófica, mediante a transformação de CO₂ e H₂ em ácido acético (Saady, 2013), quanto da atividade hidrolítica que leva à solubilização de material da lignocelulose da polpa e casca. No entanto, não se observou relação entre o consumo de H₂ e a concentração de matéria orgânica, uma vez que para redução de H₂ de 170 para 49 mL H₂ (ensaio 11) e de 178 para 41 mL H₂ (ensaio 7), observou-se, tanto diminuição (ensaio 11 de

25.906 para 25.167 mg DQO L⁻¹), quanto aumento da matéria orgânica (ensaio 7, de 18.422 para 21.713 mg DQO L⁻¹).

Observou-se aumento de fenol em todos os ensaios da etapa II e 118 e 473 mg L⁻¹ para 376 e 610 mg L⁻¹ (Tabela 5.23 e Figura 5.41), respectivamente, confirmando continuidade da hidrólise da lignina durante a etapa II. Capacidade de crescimento heterótrofo a partir de substâncias aromáticas tem sido observada em bactérias homoacetogênicas (Göbner et al., 2008), no entanto, o aumento das concentrações de fenóis em todos os ensaios não permite confirmar a presença desta rota nos reatores.

O crescimento da biomassa foi avaliado por meio dos SST desde o início da etapa I até o final da etapa II. Observou-se aumento de SST em 5 ensaios (ensaios 1, 4, 6, 13 e 14), inicial de 656 ± 104 e final de 757 ± 65 mg SST L⁻¹. No entanto, não foi possível determinar relação entre a produção de biomassa, síntese de biogás e homoacetogênese. Como discutido em seções anteriores, dificuldades na metodologia de determinação do crescimento celular podem ter conduzido a estes resultados.

Similarmente, não se obteve informação suficiente para verificar o efeito dos fatores pH, *headspace* ou concentração de polpa e casca no crescimento celular. A concentração inicial de SST para 9 g L⁻¹ de polpa e casca foi baixa (575 ± 124 mg L⁻¹, ensaios 1, 2, 3 e 4), enquanto nos ensaios com 12 (719 ± 101 mg L⁻¹, ensaios 9, 10, 11, 12, 15, 16 e 17) e 15 g L⁻¹ de polpa e casca (695 ± 169 mg L⁻¹, ensaios 5, 6, 7 e 8) os valores foram próximos. Provavelmente, sólidos provenientes da água residuária pode ter contribuído com a quantificação deste parâmetro.

Observou-se diminuição de SST no ensaio 3 (de 620 mg L⁻¹ no início para 269 mg L⁻¹ no final da etapa II), nos ensaios 15, 16 e 17 (de 805 mg L⁻¹ no início e 574 ± 47 mg L⁻¹ no final da etapa II). Estes ensaios foram conduzidos em condições experimentais diferentes (ensaio 3: pH 5,5, *headspace* 40% e polpa e casca 9 g L⁻¹; ensaios 15, 16 e 17: pH 6,5, *headspace* 50% e polpa e casca 12 g L⁻¹), pelo qual, não foi possível determinar as condições que conduziram a hidrólise de sólidos. Segundo Massanet-Nicolau et al. (2016), a quantificação de sólidos pode não representar adequadamente a degradação de substratos, uma vez que estes podem ser transformados em biomassa, dificultando a avaliação da capacidade hidrolítica dos microrganismos.

5.7.5. Ácidos orgânicos, álcoois e pH da Etapa II (Homoacetogênese)

Para a etapa II determinou-se as concentrações de etanol, n-butanol, metanol e ácidos acético, propiônico, butírico, láctico, valérico, isovalérico e capróico (Tabela 5.24 e Figura 5.35). Observou-se para os ácidos valérico, isovalérico e metanol concentrações muito próximas no início (105 ± 2 , 25 ± 2 e 21 ± 13 mg L⁻¹, respectivamente) e final da etapa II (101 ± 13 , 33 ± 6 e 47 ± 27 mg L⁻¹, respectivamente), pelo qual sua produção não foi considerada significativa. Para o ácido isobutírico observou-se as concentrações inferiores ao limite de detecção do método cromatográfico.

A quantificação destes ácidos e álcoois se faz importante para determinar as possíveis causas do consumo de H₂, e assim verificar o real impacto da homoacetogênese sobre a fermentação na etapa II. Segundo Shanmugam et al. (2014), na ausência de nitrato e sulfato, o H₂ pode ser consumido por arqueias metanogênicas, ou bactérias produtoras de ácido láctico, ácido propiônico ou homoacetogênicas. Diante da ausência de metano no biogás em todos os ensaios, rejeita-se a responsabilidade arqueias metanogênicas no consumo de H₂.

Consumo de H₂ para a produção de ácido láctico também foi descartado, uma vez que observou-se diminuição das concentrações desse ácido em todos os ensaios, de valores entre 31 e 2.848 mg L⁻¹ no início para 11 mg L⁻¹ ou inferior ao limite de detecção no final da etapa II. O ácido láctico pode ter sido utilizado por microrganismos homoacetogênicos ou produtores de ácido propiônico. Sob tais condições, pode-se inferir que a diminuição da sua concentração provavelmente propiciou a formação de ácidos acético (máxima de 5.811 mg L⁻¹ no ensaio 5) e propiônico (máxima de 237 mg L⁻¹ no ensaio 12).

Tabela 5.24: Ácidos orgânicos, álcoois e pH dos reatores em batelada da etapa II de avaliação da homoacetogênese.

Ensaio	Fase	pH	Etanol	n-Butanol	Ácido Acético	Ácido Propiónico	Ácido Butírico	Ácido Láctico	Ácido isovalérico	Ácido valérico	Ácido caprótico
1	Inicial	8,1	3.370	156	446	≤ LD	3.884	31	26	109	138
	Final II	4,8	911	414	4.964	47	3.660	≤ LD	36	102	146
2	Inicial	7,3	4.453	147	962	≤ LD	4.216	2.135	25	109	139
	Final II	5,0	987	388	4.819	39	3.688	≤ LD	38	116	261
3	Inicial	7,6	2.843	173	820	≤ LD	3.540	≤ LD	27	102	143
	Final II	4,9	651	450	4.769	60	2.465	≤ LD	30	106	156
4	Inicial	7,0	3.875	170	1.455	≤ LD	5.021	1.363	24	108	130
	Final II	5,1	644	352	5.725	61	3.341	≤ LD	33	97	146
5	Inicial	7,7	3.470	164	810	≤ LD	5.166	≤ LD	26	105	139
	Final II	4,8	594	442	6.621	139	3.964	≤ LD	35	98	140
6	Inicial	7,4	3.989	153	1.132	≤ LD	4.933	1.466	25	107	142
	Final II	5,1	390	271	3.688	≤ LD	2.526	≤ LD	29	107	163
7	Inicial	7,5	3.914	173	842	≤ LD	5.339	≤ LD	29	101	149
	Final II	4,9	783	423	3.961	33	2.794	≤ LD	29	101	164
8	Inicial	7,3	3.354	158	1.344	≤ LD	5.826	1.143	25	103	145
	Final II	5,1	577	295	3.503	≤ LD	2.2.34	≤ LD	17	108	174
9	Inicial	5,8	2.577	181	490	≤ LD	5.468	≤ LD	24	106	185
	Final II	4,7	483	455	4.895	158	4.682	≤ LD	29	110	157
10	Inicial	7,5	2.761	162	1.307	≤ LD	5.137	347	24	106	140
	Final II	5,0	504	277	4.061	3	3.079	≤ LD	34	54	158
11	Inicial	7,9	2.904	145	857	≤ LD	3.807	2.050	23	103	133
	Final II	5,0	510	350	4.317	57	3.184	≤ LD	34	104	186
12	Inicial	7,5	3.494	162	1.355	≤ LD	4.831	1.272	24	103	131
	Final II	5,0	1.255	504	5.309	237	5.446	≤ LD	33	105	186
13	Inicial	7,8	3.308	140	817	≤ LD	4.112	2.707	24	106	127
	Final II	5,1	1.383	425	5.961	200	5.234	≤ LD	36	103	183
14	Inicial	7,8	3.537	145	758	≤ LD	4.665	1.952	24	106	132
	Final II	5,0	586	306	2.600	≤ LD	2.783	≤ LD	30	101	164
15 PC	Inicial	7,5	4.398	141	648	≤ LD	4.870	2.848	24	108	128
	Final II	5,1	675	201	5.470	53	3.864	11	45	106	179
16 PC	Inicial	7,5	3.560	141	765	≤ LD	3.860	2.628	23	105	140
	Final II	5,1	1.799	492	6.205	203	2.186	≤ LD	35	101	169
17 PC	Inicial	7,6	3.823	141	707	≤ LD	4.124	2.825	24	106	129
	Final II	5,1	964	375	4.455	28	3.333	≤ LD	38	101	190

≤ LD Inferior ao limite de detecção, PC Ponto central. Ensaios 1) pH 8,1, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 2) pH 7,3, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 3) pH 7,6 *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 4) pH 7,0, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 5) pH 7,7, *headspace* 40%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 6) pH 7,4, *headspace* 40%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 7) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 8) pH 7,3, *headspace* 60%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 9) pH 5,8, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 10) pH 7,5, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 11) pH 7,9, *headspace* 33,18%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 12) pH 7,5, *headspace* 66,82%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 13) pH 7,8, *headspace* 50%, polpa e casca 6,95 g L⁻¹; 14) pH 7,8, *headspace* 50%, polpa e casca 17,05 g L⁻¹; 15, 16 e 17) pH 7,5-7,6, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹.

Capacidade de produção de ácido acético e propiônico a partir de ácido láctico foi confirmada por Boga et al. (2003) em bactérias homoacetogênicas como *Sporomusa aerivorans* sp. nov., a 30 °C e pH 7,0. Similarmente, Muri et al. (2016) observaram em reatores em batelada alimentados com carboidratos simples diminuição da concentração de ácido láctico de 1.470 para 89 mg L⁻¹ no final da fermentação, decorrente do desvio da rota metabólica, com o seu consumo para produção de ácido acético e propiônico por bactérias semelhantes a *Propionibacterium* sp. Neste estudo, pode ser inferido sobre a ocorrência dos mesmos processos reportados por Boga et al. (2003) e Muri et al. (2016), com consumo de ácido láctico para formação de ácido acético em todos os ensaios (entre 1.842 e 5.811 mg L⁻¹), ou para a formação de ácido propiônico nos ensaios 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 e 17 (entre 3 e 237 mg L⁻¹).

O consumo de H₂ também pode ser decorrente da produção de ácido propiônico, sendo observado valor inicial inferior ao limite de detecção final entre 3 a 237 mg L⁻¹ no final da etapa II (ensaios 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 e 17). A maior concentração de ácido propiônico de 237 e 200 mg L⁻¹ foi verificada nos ensaios 12 (pH 7,5, *headspace* 66,82%, polpa e casca 12 g L⁻¹) e 13 (pH 7,8, *headspace* 50%, polpa e casca 6,95 g L⁻¹), respectivamente, a partir de consumo de H₂ (entre 63 e 104 mL H₂), carboidratos (entre 53 - 70%, Equação 5.9) ou ácido láctico (de 1.272 – 2.707 mg L⁻¹ para inferior ao limite de detecção no final da etapa II), como citado no parágrafo anterior (Tabela 5.24).

A homoacetogênese autotrófica foi a rota predominante para o consumo de H₂, uma vez que, observou-se maior concentração de ácido acético em todos os ensaios, entre 1.824 e 5.811 mg L⁻¹, dos quais entre 1.258 e 3.106 mg L⁻¹ foram produzidos a partir de homoacetogênese (Tabela 5.22). Portanto, observou-se contribuição da homoacetogênese autotrófica entre 26 a 75% referente a produção de ácido acético na etapa II, sendo o restante consequência de rotas fermentativas ou homoacetogênese heterotrófica.

Nos ensaios 5 (pH 7,7, *headspace* 40%, polpa e casca 15 g L⁻¹) e 16 (pH 7,5, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹) observou-se as maiores concentrações de ácido acético de 5.811 e 5.440 mg L⁻¹, respectivamente. Para o ensaio 5, 53% da produção de ácido acético foi devido a homoacetogênese (3.106 mg L⁻¹), explicando a redução de 187 mL em H₂. Para o ensaio 16, somente 26% do ácido acético foi decorrente de homoacetogênese (1.425 mg L⁻¹), significando diminuição de 108 mL H₂ no final da etapa II. A homoacetogênese heterotrófica pode ter

contribuído com a formação de ácido acético nestes ensaios, uma vez que reduções de 61% nos carboidratos foram observadas nos ensaios 5 e 16.

Resultados similares foram reportados por Ryan et al. (2008) em reator UASB operado entre 37 e 55 °C, TDH de 48 h, inoculado com lodo anaeróbio de reator de processamento de leite, e alimentado com sacarose/acetato (60%/40%) e posteriormente com vanilato de sódio (10 g DQO L⁻¹). Os autores reportaram que bactérias homoacetogênicas isoladas do reator, como *Clostridium magnum*, *Morella thermoacetica* e *Eubacterium limosum*, foram responsáveis pelo consumo de glicose e produção de ácido acético heterotroficamente, a partir de afluente rico em sacarose. Adicionalmente afirmaram, que a composição de bactérias não modificou com a alteração de substrato ou temperatura (Ryan et al., 2008). Quando comparado com os resultados verificados no presente trabalho, foi possível inferir que durante a co-digestão de resíduos de café provavelmente estiveram presentes bactérias homoacetogênicas com capacidade de produção de ácido acético, tanto a partir de CO₂/H₂, quanto dos carboidratos liberados da hidrólise da polpa e casca.

Observou-se diminuição da concentração de etanol em todos os ensaios (de 3.508 ± 538 para 806 ± 376 mg L⁻¹) e de ácido butírico (ensaios 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16 e 17) do início para o final da etapa II (4.657 ± 692 para 3.185 ± 833 mg L⁻¹, Tabela 5.24). Caso contrário, foi observado para ácido capróico; ou seja aumento de 137 ± 7 para 173 ± 28 mg L⁻¹ em todos os ensaios (com exceção do ensaio 9), o qual pode estar relacionado com a rota de alongamento de cadeia em reatores anaeróbios. Segundo Spirito et al. (2014), ácido capróico pode ser produzido a partir de etanol e ácido butírico (Equação 5.20), mediante a rota de β oxidação reversa de bactérias anaeróbias, como *Clostridium kluyver*. O acontecimento desta rota é plausível, uma vez que foi observada abundância de compostos reduzidos (concentração inicial de etanol de 3.508 ± 538 mg L⁻¹) e alta pH₂ (consequência de *P* entre 55 e 244 mL H₂) nos diferentes ensaios, condições essas adequadas para a ocorrência da rota de β oxidação reversa (Spirito et al., 2014).

Observou-se ácido butírico somente nos ensaios 12 (pH 7,5, *headspace* 66,82%, polpa e casca 12 g L⁻¹) e 13 (pH 7,8, *headspace* 50%, polpa e casca 6,95 g L⁻¹) de 615 e 1.122 mg L⁻¹, respectivamente. No ensaio 13, observou-se aumento de H₂ de 41 para 47 mL após 256 h de fermentação (Figura 5.36), o que pode corresponder com a co-produção de H₂ e ácido butírico

(Equação 5.8). Para o ensaio 12, não verificou-se aumento de H_2 , portanto, o ácido butírico pode ter sido originado mediante a rota de alongamento de cadeia a partir de ácido láctico, etanol e ácido acético (Equações 5.16 e 5.21) (Spirito et al., 2014). No entanto, observou-se no ensaio 12 diminuição de ácido láctico (de 1.272 mg L^{-1} para inferior ao limite de detecção) e etanol (de 3.494 para 1.255 mg L^{-1}), enquanto para ácido acético observou-se aumento de 1.355 e 5.309 mg L^{-1} para o final da etapa II, pelo qual, não foi possível confirmar esta hipótese.

Etanol + Ácido acético $\rightarrow$ 5 Ácido butírico + H_2O (Eq. 5.21)

Entre 60 e 351 mg L^{-1} de n-butanol foram verificadas em todos os ensaios, com máximas nos ensaios 12 (pH 7,5, *headspace* 66,82%, polpa e casca 12 g L^{-1}) e 16 (pH 7,5, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L^{-1}) de 351 e 342 mg L^{-1} , respectivamente. Espécies de *Clostridium* sp. tem sido citadas por sua capacidade de produzir butanol e outros solventes em pH inferior a 5,0 e limitação de fosfato e ferro (Hawkes et al., 2002). pH final de 5,1 foi observado no final da etapa II dos ensaios 12 e 16, que junto com a limitação de substratos, após 236 horas de fermentação (remoção de carboidratos de 53% e 61%, ensaios 12 e 16), podem ter induzido o aparecimento desta rota.

A produção de ácidos entre 2.041 e 6.819 mg L^{-1} conduziu à diminuição de pH entre 5,8 e 8,1 para 4,7 e 5,1 na etapa II em todos os ensaios. A partir da composição de ácidos orgânicos, álcoois e carboidratos dissolvidos das etapas I e II, verificou-se para o balanço de massa, entre 40% e 114% (Figura 5.39). Similarmente, quando comparadas as etapas de fermentação, verificou-se predominância de ácido butírico (~38%) e etanol (~33%) na etapa I e de ácido butírico (~29%) e acético (~24%) na etapa II, confirmando a mudança nas rotas metabólicas. Também, observou-se diminuição gradual no teor de carboidratos do início (~10%), para o final da etapa I (~4%) e final da etapa II (~1%), pelo qual, a atividade fermentativa foi constante durante todo o processo biológico.

O ensaio 5 foi selecionado para a identificação dos carboidratos durante a fermentação, devido à alta produção de H_2 (etapa I: 244 mL H_2) e redução deste biogás (Etapa II: 187 mL H_2) para a produção de ácido acético via homoacetogênese (3.106 mg L^{-1}). Verificou-se aumento de arabinose (de 73 para 219 mg L^{-1}) e celobiose (de inferior ao limite de detecção para 26 mg L^{-1}) para o final da etapa I, o qual reflete atividade de celulasas e hemicelulasas sobre os polímeros da polpa e casca, com liberação de dímeros de celobiose e monômeros de arabinose (Cheng et al.,

2011a; Van Dyk and Pletschke, 2012). No entanto, no final da etapa II ambos os carboidratos foram consumidos completamente, (concentração inferior ao limite de detecção), o qual evidencia produção de ácido acético mediante homoacetogênese heterotrófica (Latif et al., 2013).

5.7.6. Caracterização taxonômica e funcional da comunidade microbiana (Etapa I e II)

Os ensaios do Desenho de Composto Central Rotacional (DCCR) consistiram de 17 condições diferentes, as quais foram divididos em duas etapas: na etapa I (2-9 d de operação) foi realizado o monitoramento da produção de H_2 até a sua estabilização e na etapa II (10-18 d de operação) foi feito o monitoramento da redução do H_2 até ocorrer a estabilização. As coletas das amostras para a análise da comunidade microbiana foram realizados no reator nas duas etapas (etapa I e II) para cada ensaio.

A análise da comunidade microbiana dos ensaios DCCR, foi realizada na etapa I para a comunidade de bactérias e fungos e na etapa II para comunidade de bactérias, por meio do coeficiente de similaridade (Correlação de Pearson), índice de diversidade (Shannon_H) e estimador de riqueza (Chao-1).

Na comparação da comunidade de bactérias entre as etapas I e II observou-se coeficiente de similaridade de 63% a 88%. Saady (2013) cita que alguns microorganismos acetogênicos podem alterar seu metabolismo para o crescimento a partir de H_2 e CO_2 , pelo qual, alta proporção das bactérias podem ter prevalecido em ambas as etapas da fermentação, sendo predominantemente produtoras de H_2 na etapa I e homoacetogênicas na etapa II.

O importante efeito da concentração de polpa e casca sobre a população de bactérias das etapas I e II pode ser elucidada mediante os argumentos de Saady (2013). Nesta revisão o autor concluiu que não há diferença filogenética entre os microorganismos acetogênicos e homoacetogênicos, sendo o esgotamento do substrato orgânicos o responsável pela mudança na rota predominante, portanto, enquanto o resíduo de polpa e casca seja abundante a alteração de rota será menos evidente.

Figura 5.42. Dendograma (Correlação de Pearson) do perfil de bandas de DGGE para Bactérias dos reatores em batelada da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H₂ e II de avaliação da homoacetogênese.

Ensaio 1) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 2) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 3) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 4) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 5) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 6) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 7) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 8) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 9) pH 4,82, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 10) pH 8,18, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 11) pH 6,5, *headspace* 33,18%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 12) pH 6,5, *headspace* 66,82%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 13) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 6,95 g L⁻¹; 14) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 17,05 g L⁻¹; 15, 16 e 17) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹.

Nas etapas I e II (Figura 5.42) observou-se a menor similaridade para o Domínio Bactéria de 63% entre os ensaios 3 I e 3 II. Desse modo, nessas condições ocorreu alteração das populações de bactérias, as quais provavelmente estiveram relacionadas diretamente com os metabólitos produzidos em cada etapa da fermentação; ou seja, H_2 na etapa I (203 mL H_2 , ensaio 3) e ácido acético por homoacetogênese na etapa II (2.402 mg L^{-1} , ensaio 3). Alterações no pH inicial, pH_2 e disponibilidade de substrato podem ter estimulado bactérias específicas. Por exemplo, o pH inicial foi de 5,5 e 7,6 na etapa I e II, respectivamente, sendo referenciado pH 5,5 como o ótimo para a produção de H_2 (Ruggeri et al., 2015), e pH próximo de 7,0 adequado para maximizar a produção de ácido acético por homoacetogênese (Dehning et al., 1989).

Similarmente, a pH_2 do ensaio 3 no início da etapa I foi baixa devido à ausência de H_2 no biogás, no entanto, o maior acúmulo de H_2 em 60% de *headspace*, conduziram a altas pH_2 no início da etapa II. Segundo Saady (2013), as bactérias acetogênicas crescem preferencialmente em baixa pH_2 , enquanto as homoacetogênicas suportam altas pH_2 . Portanto, a partir desse relato pode-se inferir sobre a alteração das populações da etapa I para a II. Adicionalmente, na etapa I observou-se alta disponibilidade de carboidratos dissolvidos para a fermentação (1.707 mg L^{-1}), os quais foram reduzidos em 87% para o início da etapa II (378 mg L^{-1}). O esgotamento de substrato orgânico estimula o crescimento de bactérias homoacetogênicas a partir de H_2 e CO_2 (Saady, 2013). Portanto, provavelmente, população predominantemente homoacetogênica pode ter sido favorecida na etapa II, condição na qual observou-se diminuição do H_2 de 203 para 9 mL H_2 e aumento do ácido acético de 820 para 4.769 mg L^{-1} na etapa II.

Verificou-se maior similaridade de 88% para o domínio Bactéria entre as populações dos reatores dos ensaios 7 I e 7 II. Alta concentração de polpa e casca (15 g L^{-1}) pode ter favorecido essa elevada similaridade, provavelmente devido ao favorecimento de populações de bactérias com metabolismo heterotrófico (a partir de compostos orgânicos) e autotrófo (a partir de CO_2 e H_2 por homoacetogênese). Isto porque na etapa II do ensaio 7 substratos dissolvidos continuaram sendo disponibilizados mediante hidrólise, processo confirmado pelo aumento na concentração de matéria orgânica (de 18.422 para 21.713 mg DQO L^{-1}) e fenol (de 146 para 410 mg L^{-1}). Além disso, com destaque também para a menor concentração de ácido acético por homoacetogênese (1.890 mg L^{-1}), menor consumo do H_2 no biogás (137 mL H_2) e similaridade de 88% entre as populações de bactérias da etapa I e II do ensaio 7.

Esta hipótese pode ser confirmada diante da comparação da etapa I e II dos ensaios 7 e 3 com similaridades de 88% e 63%, respectivamente, ambos realizados nas mesmas condições operacionais (pH inicial $\sim 7,5$ e *headspace* 60%). Verificou-se sob tais condições maior alteração das populações do ensaio 3, devido a menor concentração de polpa e casca (15 g L^{-1} para o ensaio 7 e 9 g L^{-1} para o ensaio 3).

A análise das populações de fungos foi realizada para os 15 ensaios da etapa I (Figura 5.43), levando em consideração a concentração de polpa e casca, *headspace* e pH. Os fungos são os principais responsáveis pela hidrólise e redução de resíduos lignocelulósicos mediante a síntese de enzimas hidrolíticas (Dashtban et al., 2009), motivo pelo qual são afetados pela concentração de polpa e casca.

Para os ensaios com 9 g L^{-1} de polpa e casca (1 I, 2 I, 3 I, 4 I), verificou-se similaridade entre 89% e 96% para as populações de fungos, sob condições de *headspace* entre 40% e 60% e pH entre 5,5 e 7,5, respectivamente. Neste contexto, o pH inicial e pH_2 (avaliada mediante o volume de *headspace*) provocaram pouca alteração na comunidade fúngica. O efeito do pH na comunidade de fungos foi observada na seção 5.5.2 (Figura 5.20) durante a co-digestão de resíduos de café (polpa, casca e água residuária) com consórcio de microrganismos autóctones, uma vez que pH entre 4,0 e 7,0 conduziram a alteração de até 70% na comunidade de fungos. No entanto, a síntese de ácidos orgânicos nos reatores 1 I, 2 I, 3 I e 4 I conduziram a meio com pH neutro no final da etapa I ($7,7 \pm 0,5$), diminuindo o efeito do pH sobre a estrutura da comunidade de fungos. Em relação a pH_2 , segundo Ciranna et al. (2014) este parâmetro afeta as enzimas associadas a hidrólise e produção de H_2 , uma vez que gera lenta difusão de metabólitos intermediários dissolvidos. No entanto, a pH_2 não alterou a comunidade de fungos dos ensaios reatores 1 I, 2 I, 3 I e 4 I, possivelmente porque não atingiu-se níveis suficientemente altos para causar efeito deletério sobre os microrganismos.

Figura 5.43. Dendograma (Correlação de Pearson) do perfil de bandas de DGGE para Fungos dos reatores em batelada da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H₂.

Ensaios 1) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 2) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 3) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 4) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 5) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 6) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 7) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 8) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 9) pH 4,82, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 10) pH 8,18, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 11) pH 6,5, *headspace* 33,18%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 12) pH 6,5, *headspace* 66,82%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 13) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 6,95 g L⁻¹; 14) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 17,05 g L⁻¹; 15, 16 e 17) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹.

Observou-se *P* entre 55 e 206 mL H₂ nos ensaios 1 I, 2 I, 3 I, 4 I, demonstrando produções de H₂ diferentes mediante população fúngica com alta similaridade (entre 89 e 96%). Isso indica que a produção da H₂ pode ter ocorrido por bactérias, uma vez que em reatores alimentados com resíduos de café utilizando microrganismos autóctones os genes funcionais associados a produção de H₂ corresponderam ao Domínio Bacteria (Seção 5.5.2 e Figura 5.28). Portanto, mudanças na comunidade de bactérias conduziram a diferentes produções de H₂.

Para os ensaios com 12 g L⁻¹ de polpa e casca (9 I, 10 I, 11 I, 12 I e 15-16-17 I) verificou-se a maior similaridade (95%) para fungos entre as populações dos ensaios 11 I e 15-16-17 I, com mesmo pH inicial de 6,5. Enquanto, para os ensaios 9 I e 10 I observou-se similaridade de somente 69% quando comparado com o primeiro grupo, provavelmente devido ao pH inicial diferente (de 4,82 e 8,18, respectivamente). A comunidade fúngica mudou com o pH inicial dos substratos, porque sob tais condições afeta diretamente a atividade das enzimas (Dashtban et al., 2009).

Em relação aos ensaios com 15 g L⁻¹ (5 I, 6 I, 7 I e 8 I) observou-se o maior coeficiente de similaridade (97%) entre as populações dos ensaios 7 I e 8 I com mesmo *headspace* de 60% e pH diferente (pH 5,5 e 7,5), enquanto a menor similaridade (71%) foi observada entre as populações do ensaio 5 I (*headspace* de 40% e pH 5,5) e aquelas dos demais ensaios. Sob tais condições pode-se inferir que *headspace* maior favoreceu o crescimento de populações de fungos semelhantes.

Os índices de diversidade de Shannon_H e estimador de riqueza de Chao-1 também foram utilizados para analisar as mudanças das comunidades microbianas com a alteração de rota da etapa I para a II (Figura 5.44).

Verificou-se no ensaio 9 a maior diversidade e riqueza de bactérias nos ensaios da etapa I (Shannon_H 2,53 e Chao-1 18). Nesse ensaio o pH inicial e final eram de 4,8 e 5,8, respectivamente. As condições deste ensaio favoreceram o crescimento de comunidade mais complexa, porque estimularam as bactérias celulolíticas em pH ótimo próximo de 5,0 (Lynd et al., 2002).

A menor diversidade e estimador de riqueza de bactérias da etapa I foi no ensaio 1 (Shannon_H 1,60 e Chao-1 6), ensaio operado em pH 5,5 e *headspace* 40% e concentração de polpa e casca de 9 g L⁻¹. Neste reator observou-se alta produção de H₂ (206 mL H₂) e ácidos orgânicos e álcoois (8.160 mg L⁻¹), e alta pH₂ (devido ao menor volume de *headspace* de 40%), condições que afetam negativamente a diversidade bacteriana. Isto porque altas pH₂ levam a inibição da hidrólise e acidogênese (Cazier et al., 2015), e o acúmulo de ácidos orgânicos permite diminuir a capacidade tamponante do meio (Khanal et al., 2004).

Para as bactérias durante a etapa II, verificou-se no ensaio 9 os valores máximos para estes estimadores (Shannon_H 2,31 e Chao-1 14), e para o ensaio 2, valores mínimos (Shannon_H 0,91 e Chao-1 4). A mesma tendência foi observada durante a etapa I, com diversidade e riqueza maior no ensaio 9 (Shannon_H 2,53 e Chao-1 18) e menor no ensaio 2 (Shannon_H 1,64 e Chao-1 7, Figura 5.44). Foi possível deduzir que os mesmos fatores afetam tanto a população de bactérias produtoras de H₂, como também as responsáveis pelo consumo do H₂ acumulado. Além disso, observou-se que a riqueza e diversidade bacteriana foram menores com a mudança de rota metabólica. Isto porque dentre a população de bactérias acetogênicas observadas durante a fermentação H₂, somente as homoacetogênicas suportam alta pH₂ e outras condições de estresse (Saady, 2013), selecionando algumas delas durante a etapa II.

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

Observou-se índices de diversidade (Shannon_H) e estimadores de riqueza (Chao-1) para bactérias da etapa I (Shannon_H 1,60 a 2,53; Chao-1 6 a 18) maiores em relação à etapa II (Shannon_H 0,91 a 2,31; Chao-1 4 a 14) na maioria dos ensaios, com exceção do ensaio 3 (Shannon_H 1,77 e Chao-1 10, Figura 5.44). Menor índice de diversidade provavelmente esteja relacionado a estabilização da produção de H_2 , ao acúmulo de ácidos orgânicos e H_2 que podem limitar o crescimento de algumas bactérias fermentativas na etapa II (Saady, 2013).

Figura 5.44. Índices ecológicos para bactérias e fungos dos reatores em batelada da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H₂ e II de avaliação da homoacetogênese.

Ensaio 1) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 2) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 3) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 4) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹; 5) pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 6) pH 7,5, *headspace* 40%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 7) pH 5,5, *headspace* 60%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 8) pH 7,5, *headspace* 60%, polpa e casca 15 g L⁻¹; 9) pH 4,82, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 10) pH 8,18, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 11) pH 6,5, *headspace* 33,18%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 12) pH 6,5, *headspace* 66,82%, polpa e casca 12 g L⁻¹; 13) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 6,95 g L⁻¹; 14) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 17,05 g L⁻¹; 15, 16 e 17) pH 6,5, *headspace* 50%, polpa e casca 12 g L⁻¹.

Para a população de fungos da etapa I verificou-se maior índice de diversidade e riqueza no ensaio 5 (Shannon_H 2,47 e Chao-1 19) com pH inicial de 5,5 e o menor no ensaio 6 (Shannon_H 1,90 e Chao-1 9) com pH inicial de 7,5. Sob tais condições pode-se inferir que as condições de pH interferiram na diversidade dos fungos, uma vez que em ambos os ensaios foram realizados com *headspace* de 40% e polpa e casca de 15 g L⁻¹. Meio com pH ácido favorece a diversidade e riqueza dos fungos, uma vez que a maior atividade das enzimas hidrolíticas está na faixa de pH entre 4,0 e 5,0 (Dashtban et al., 2009). Adicionalmente, a maior produção de H₂ observada no ensaio 5 foi consequência da maior diversidade e riqueza de fungos, que consequentemente favoreceram a hidrólise da polpa e casca, e com isto, a síntese de produtos gasosos. As amostras do ensaio 5 foram selecionadas para o sequenciamento do metagenoma do final da etapa I (2-9 dias de operação, produção de H₂ até estabilização) e II (10-18 dias de operação, consumo de H₂ até estabilização). Devido as condições de operação deste ensaio observou-se a máxima produção de H₂ (244 mL H₂) e aumento de ácido acético por homoacetogênese (3.106 mg L⁻¹, Tabela 5.22). O objetivo foi identificar as diferenças na comunidade microbiana e diversidade funcional para o mesmo reator quando o metabolismo mudou de produção (etapa I) para consumo de H₂ (etapa II).

Durante a análise do perfil taxonômico, foram desenhadas as curvas de rarefação para as famílias (Figura 5.45) e gêneros (Figura 5.46) identificados durante a etapa I e II do ensaio 5. Obteve-se para as curvas platô, pelo qual, foi possível representar adequadamente a diversidade taxonômica da comunidade microbiana das amostras mediante os dados coletados.

Observou-se estimador de riqueza de Chao-1 de 629,3 na etapa I e 652,5 na etapa II, por meio do qual tem-se quantidade de gêneros superior após a estabilização na produção de H₂. No entanto, observou-se para essa comunidade durante esta última etapa índice de diversidade Shannon_H inferior (1,88 e 1,38 etapa I e II, respectivamente), pelo qual, confirmou-se perda na diversidade como consequência da mudança do metabolismo de produção de H₂ para a homoacetogênese. Segundo Vasconcelos et al. (2016) diversidade inferior após a fermentação pode ser consequência do crescimento de espécies não detectadas ou microrganismos autóctones que competem ou inibem as bactérias produtoras de H₂, como as bactérias do ácido lático, as quais podem inibir *Clostridium* sp. mediante a produção de bacteriocinas.

Figura 5.45. Curvas de rarefação da riqueza de Famílias no ensaio 5 da (a) Etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H_2 e (b) Etapa II de avaliação da homoacetogênese.

Figura 5.46. Curvas de rarefação para descrever a riqueza de Gêneros no ensaio 5 da (a) Etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H₂ e (b) Etapa II de avaliação da homoacetogênese.

Por meio da classificação das famílias e gêneros de bactérias (Figura 5.47), evidenciou superior abundância relativa de Clostridiaceae (45,5%) Lactobacillaceae (20,7%) e Acetobacteraceae (14,5%) na etapa I. No entanto, para o ensaio 5 observou-se abundância relativa maior de Lactobacillaceae (63,1%), seguido de Clostridiaceae (23,8%) e Acetobacteraceae (1,0%) na etapa II. Mudança similar na população evidenciou-se para os gêneros de bactérias, sendo *Clostridium* sp. (41,3%), *Lactobacillus* sp. (20,4%) e *Acetobacter* sp. (14%) os principais microrganismos identificados no final da etapa I, com alteração para

Lactobacillus sp. (62,8%), *Clostridium* sp. (20,9%) e *Acetobacter* sp. (1%) no final da etapa II (Figura 5.47).

Figura 5.47. Grupos taxonômicos para (a) Famílias e (b) Gêneros de Bactérias no ensaio 5 da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H₂ e II de avaliação da homoacetogênese.

Em função do perfil taxonômico verificou-se que *Clostridium* sp. (41,2%) foi o principal gênero na etapa I, por conseguinte relacionado com a produção de H₂ (244 mL) e ácido butírico observada (inicial de 980 e final de 3.939 mg L⁻¹), e a atividade hidrolítica da polpa e casca. Este gênero é caracterizado pela presença de celulosoma, o qual contém enzimas celulolíticas e

hemicelulolíticas, produção de ácido butírico e H_2 com alto rendimento de H_2 (Dashtban et al., 2009). Este resultado corresponde ao observado por Ratti et al. (2013) em reatores em batelada alimentados com celulose (10 g L^{-1}), pH 7,0, 37°C e inoculados com lixiviado de aterro sanitário. Os autores verificaram abundância relativa superior ao 98% para *Clostridium* sp. e máxima produção de H_2 de $51.520 \text{ mL } H_2 \text{ mol}_{\text{celulose}}^{-1}$ ($2,3 \text{ mol } H_2 \text{ mol}_{\text{celulose}}^{-1}$), com degradação da celulose de 44,7% e ácido butírico ($1492,9 \text{ mg L}^{-1}$) como principal metabólito dissolvido.

Similarmente, associações entre bactérias do ácido láctico e produtoras de H_2 podem explicar alta abundância relativa de *Lactobacillus* sp. (20,4%) em reatores com alta produção de H_2 ($244 \text{ mL } H_2$) e consumo de ácido láctico (concentração inicial 3596 mg L^{-1} e inferior ao limite de detecção no final) na etapa I, uma vez que bactérias do gênero *Clostridium* sp. tem a capacidade de produzir ácido butírico e H_2 a partir de ácido láctico (Sikora et al., 2013). Esse resultado foi similar ao observado por Chojnacka et al. (2011), ou seja, com o aumento da produção de H_2 de 62.720 para $120.960 \text{ mL } H_2 \text{ mol}_{\text{sacarose}}^{-1}$ (de 2,8 para $5,4 \text{ mol } H_2 \text{ mol}_{\text{sacarose}}^{-1}$) e ácido butírico de 4.331 para 7.641 mg L^{-1} em reator enriquecido com bactérias heteroláticas. Para isto, os autores operaram reator de leito empacotado em temperatura ambiente, TDH de 10 – 18 h, inóculo de lodo granular e substrato a base de melaço (54 g DQO L^{-1}) (Chojnacka et al., 2011).

No final da etapa II verificou-se aumento das concentrações de ácido acético (de 810 para 6621 mg L^{-1}), propiônico (de limite de detecção para 139 mg L^{-1} , respectivamente) e n-butanol (de 173 para 450 mg L^{-1} , respectivamente), levando a concluir que consumo de H_2 foi consequência da homoacetogênese, rota do ácido propiônico e solvetogênese. No entanto, *Lactobacillus* sp. foi o gênero identificado com abundância relativa maior (62,8%), reconhecido pela capacidade de síntese de ácido láctico, o qual não foi produzido nesta etapa (concentração inicial e final inferior ao limite de detecção). A síntese de bacteriocinas pode explicar este resultado, uma vez que estes peptídeos inibem microrganismos produtores de H_2 , como foi observado por Rosa et al. (2016). Os autores isolaram 47 cepas de bactérias do ácido láctico (como *Lactobacillus* sp.), das quais 46,6% demonstraram atividade inibitória mediante síntese de peptídeos antimicrobianos (bacteriocinas) durante testes de atividade antimicrobiana (formação de zonas claras de inibição em meio sintético contendo microrganismos previamente crescidos).

No entanto, o consumo de H_2 durante a etapa II foi devido a homoacetogênese e não a produção de ácido láctico, uma vez que, mesmo com abundância maior de *Lactobacillus* sp.

(62,8%, bactéria do ácido láctico) em relação a *Clostridium* sp. (20,9%, bactéria homoacetogênica), o principal metabólito dissolvido observado foi ácido acético, isto porque abundância relativa de uma população não é indicativo da maior atividade metabólica (Park et al., 2018). Por exemplo Park et al. (2018) observaram abundância relativa maior de *Clostridium* sp. em todos os reatores, no entanto, a atividade de *Clostridium butyricum* foi superior somente nas condições com $3,7 - 5,8 \text{ g}_{\text{glicose}} \text{ L}^{-1}$ devido a maior velocidade de crescimento. Em relação a *Lactobacillus casei* os autores verificaram que foi mais competitiva em menor concentração de glicose ($0,2 - 1 \text{ g}_{\text{glicose}} \text{ L}^{-1}$) consequência do maior ganho energético e afinidade pelo substrato (Park et al., 2018). Os reatores em batelada utilizados pelos pesquisadores foram operados a 35 °C, pH 7,0, 200 rpm, e inoculados com culturas puras de *Clostridium butyricum* KCCM 35433 e *Lactobacillus casei* KCCM 12452.

Bactérias semelhantes a *Acetobacter* sp. foram identificadas no reator do ensaio 5, no entanto, verificou-se diminuição da abundância relativa de 14% na etapa I para 1% na etapa II. *Acetobacter* sp. foi identificada em amostra de processamento pós-coleta de café, sendo associada com a remoção de pectina e a mucilagem que rodeia os grãos (De Bruyn et al., 2017). No entanto, trata-se de bactéria aeróbia (Yamada et al., 2017), cuja origem na etapa I foi a partir dos resíduos de café, e em menor proporção na etapa II devido ao estabelecimento das condições anaeróbias do processo fermentativo.

Em relação aos fungos verificou-se para a etapa I 100% de abundância relativa para representantes do filo Ascomycota, enquanto para a etapa II obteve-se 99,83% de Ascomycota e 0,17% de Basidiomycota (Figura 5.48). A abundância relativa maior de Ascomycota durante toda a operação dos reatores do ensaio 5, deveu-se a capacidade de liberação de enzimas como celulase, β -1,3-glucanase, xilanase, lacase e hemicelulase (Dashtban et al., 2009), as quais facilitam a degradação do material polimérico na polpa e casca de café, mas também crescimento de leveduras a partir de carboidratos mais simples como glicose, sacarose, frutose ou maltose (Kurtzman et al., 2011). O aumento da porcentagem de representantes de Basidiomycota na etapa II consequência da redução dos carboidratos dissolvidos (de 1.643 para 578 mg L^{-1}), uma vez que representantes desse filo possui sistema oxidativo único por meio do qual ocorre a degradação da lignocelulose (Dashtban et al., 2009), o qual, pode ter se somado com a capacidade celulolítica e hemicelulolítica de Ascomycete favorecendo a hidrólise da polpa e casca de café.

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

Os principais gêneros de fungos identificados foram *Saccharomyces* sp. (19,1% e 20,1% para a etapa I e II, respectivamente), *Kazachstania* sp. (16,6% e 18% para a etapa I e II, respectivamente) e *Naumovozyma* sp. (7,9% e 8% para a etapa I e II, respectivamente). Observou-se abundância relativa similar para os gêneros de fungos identificados em ambas as amostras. Portanto, as diferenças nas condições de fermentação das etapas I e II não alteraram as populações de fungos especificamente relacionadas aos gêneros identificados. As leveduras podem ter sido originadas do processamento dos grãos de café (De Bruyn et al., 2017), permanecendo nos reatores mediante associações com bactérias do ácido lático, devido à capacidade de *Saccharomyces* sp., *Kazachstania* sp. e *Naumovozyma* sp. de crescer a partir de carboidratos simples e ácido lático, possivelmente para a produção de etanol e CO₂ (Hittinger et al., 2018).

Figura 5.48. Grupos taxonômicos para (a) Filos e (b) Gêneros de Fungos no ensaio 5 durante a etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H₂ e II de avaliação da homoacetogênese.

A mudança na população de bactérias e fungos da etapa I para a II foi estudada mediante diagrama de Venn (Figura 5.49). Verificou-se que 479 gêneros estiveram em ambos os casos (75% da população) e 171 gêneros diferentes foram observados no final da etapa II. Especificamente em relação as abundâncias relativas de *Clostridium* sp. observadas de 41,3% na

etapa I e 20,9% na etapa II, associada a sua capacidade metabólica heterotrófica (com compostos orgânicos) e autotrófica (com CO_2 e H_2), além de realizar rotas metabólicas de produção de ácido propiônico e butanol (Ruggeri et al., 2015; Saady, 2013), inferiu-se sobre a possibilidade de representantes deste gênero como um dos principais responsáveis pela mudança de metabolismo observados na etapa I e II das condições dos reatores do ensaio 5.

Figura 5.49. Diagrama de Venn dos gêneros de microorganismos do ensaio 5 da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H_2 e II de avaliação da homoacetogênese.

O perfil funcional foi estudado a partir da pesquisa de KOs (Ortologias do KEGG) encontrados na *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG). Obteve-se platôs para as curvas de rarefação dos KOs (Figura 5.50), pelo qual, a diversidade metabólica e funcional das amostras foi adequadamente representada. Verificou-se que em função da mudança de metabolismo da etapa I para a etapa II ocorreu aumento do estimador de riqueza de Chao-1 (4.816 e 5.176 na etapa I e II, respectivamente), mas diminuição da diversidade de Shannon_H (de 7,33 e 7,26 na etapa I e II, respectivamente). Portanto, as condições fermentativas da etapa II conduziram a diminuição do índice de diversidade metabólica. Isto porque a maior produção de H_2 (244 mL H_2), diminuição do pH (de 7,7 para 4,8) e acúmulo de ácidos orgânicos (principalmente ácido acético, inicial de 810 e final de 6.621 mg L^{-1}) observados na etapa II, provavelmente, limitaram a atividade metabólica de alguns grupos de microrganismos, uma vez

que a maioria das reações acetogênicas são termodinamicamente desfavoráveis em condições de acúmulo de ácidos orgânicos e alta pH_2 (Saady, 2013). Por exemplo, Zhou et al. (2017) observaram efeito da pH_2 sobre a diversidade e riqueza da população em reator em batelada com glicose (20 g L^{-1}), a 37°C e inóculo oriundo de lodo de estação de tratamento de água residuária pré-tratado a 105°C por 2 h. O índice de diversidade de Shannon_H foi superior em experimentos com menor pH_2 mediante remoção do *headspace* (1,047), injeção de CO_2 (1,27) e injeção de $\text{H}_2:\text{CO}_2$ (1,158), quando comparado com reator sem estratégia de redução da pressão do *headspace* (1,0173) (Zhou et al., 2017).

Figura 5.50. Curvas de rarefação para descrever a riqueza de KOs da (a) Etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H_2 e (b) Etapa II de avaliação da homoacetogênese.

Os KOs estudados estiveram relacionados com metabolismo de carboidratos (entre 7,2% e 8,1%), metabolismo de energia (entre 3,5% e 4,4%), metabolismo/famílias de enzimas (entre 5,8% e 6,6%), degradação de xenobióticos (entre 0,9% e 1%), entre outros (Figura 5.51), os quais permitem analisar as mudanças metabólicas ocorridas no reator durante a fase de produção e consumo de H_2 . Quando comparado o metabolismo de carboidratos com outros sistemas de produção de H_2 , observou-se relação com o tipo de substrato. De tal modo, resultados similares entre 7,9% e 10% foram observados durante a co-digestão de resíduos de café no presente projeto, operando reatores em batelada com água residuária ($7-18,5 \text{ g DQO L}^{-1}$) e polpa e casca de café ($4-6 \text{ g L}^{-1}$), a $30-40 \text{ }^\circ\text{C}$ e consórcio microbiano autóctone dos resíduos. No entanto, valores superiores de 16,2% para metabolismo de carboidratos foram descritos durante a fermentação de cana de açúcar (5 g L^{-1}) em reator em batelada a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, e inóculo oriundo de resíduo de compostagem (Soares et al., 2018).

Figura 5.51. Composição da categoria Kegg de nível 2 para o ensaio 5 da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H_2 e II de avaliação homoacetogênese.

Inicialmente, analisou-se o potencial metabólico para as rotas de digestão anaeróbia da comunidade microbiana do ensaio 5 (Figura 5.52), com foco especificamente na degradação de polissacarídeos (Sikora et al., 2018). Valores similares de abundância relativa de enzimas

hidrolíticas (etapa I: 2% e II: 2,4%), acidogênicas (etapa I: 5% e II: 4,7%) e acetogênicas (etapa I: 0,6% e II: 0,3%) foram observadas em comunidades produtoras (etapa I) e consumidoras de H_2 (etapa II). Como referenciado anteriormente, este resultado pode ser consequência da permanência de aproximadamente 75% da população de microrganismos durante as etapas I e II (Figura 5.49). Destaca-se na Figura 5.52 abundância relativa de 92,5% para metabolismos diferentes da hidrólise, acetogênese e acidogênese, que corresponderam a maior parte do metagenoma das amostras do ensaio 5 na etapa I e II. Isso devido a KOs relacionados à genes funcionais do metabolismo de biossíntese, lipídeos, nucleotídeos, aminoácidos, cofatores, vitaminas, reprodução celular, processos celulares, transporte celular, adaptação ambiental e comunidade celular, que representaram maior porcentagem do metagenoma quando comparado aos genes funcionais do metabolismo de energia e de carboidratos associados as etapas de hidrólise, acetogênese e acidogênese.

Figura 5.52. Abundância relativa* de KOs relacionados com as etapa de Hidrólise, Acidogênese e Acetogênese para o ensaio 5 da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H_2 e II de avaliação da homoacetogênese.

*A abundância relativa foi calculada considerando somente os KOs para as enzimas dos metabolismos estudados, com total reads de 3567997 e 4840708 para a etapa I e II, respectivamente.

Diante destes resultados, aprofundou-se na pesquisa das enzimas relacionadas com a produção e consumo de H_2 (Figura 5.53 e 5.54 e Tabela 5.25). Baseado na análise dos metabólitos dissolvidos e gasosos, na etapa I observou-se predomínio da produção de H_2 mediante a fermentação ácido-butírica (Tipo Clostridial, Figura 3.5), uma vez que, verificou-se

aumento de ácido butírico de 8% para 48% (Figura 5.39). Por outro lado, o aumentou na concentração de ácido acético (de 4 para 40%), propiônico (de inferior ao limite de detecção para 1%) e n-butanol (de 2% para 7%) na etapa II, levou a considerar a homoacetogênese, produção de ácido propiônico e n-butanol entre as rotas de consumo de H_2 . Síntese de ácido láctico não foi observada durante a operação do ensaio 5 (18% no início da etapa II, e inferior ao limite de detecção no final da etapa I e II), no entanto, esta rota foi estudada devida a abundância relativa entre 20,4% e 62,8% de bactérias lácticas, tais como *Lactobacillus* sp. nas etapas I e II, respectivamente.

Verificou-se 38% e 40% de enzimas relacionadas com a produção de H_2 na etapa I e II, respectivamente (Figura 5.53). Identificou-se genes com abundância relativa maior no ensaio 5 relacionados a piruvato ferredoxina/flavodoxina oxidorreductase (EC 1.2.7.1 1.2.7.-, K03737) de 8,2% e 5% na etapa I e II, respectivamente. Identificação de genes maior relacionados com esta enzima na etapa I foi decorrente da maior produção de H_2 (244 mL H_2), uma vez que a piruvato ferredoxina/flavodoxina oxidorreductase realiza a conversão de ácido pirúvico em acetil-CoA, transferindo elétrons para a síntese de hidrogênio mediante a enzima hidrogenase (Hallenbeck and Benemann, 2002). Bactérias semelhantes a *Clostridium* sp. (etapa I: 18,82% e II: 11,26%) e *Bacillus* sp. (etapa I: 0,16% e II: 0,10, Tabela 5.25) foram os principais gêneros associados as enzimas de produção de H_2 em ambas as etapas, e com a mesma tendência de redução da etapa I para a II. Lee et al. (2010) mencionam que microrganismos anaeróbios estritos, tais como *Clostridium* sp. obtém elétrons do ácido pirúvico em reação mediada pela ferredoxina, enquanto os anaeróbios facultativos como *Bacillus* sp. a partir da oxidação do ácido fórmico pela ação da piruvato formiato liase (Lee et al., 2010). Portanto, dessas alterações metabólicas podem estar relacionadas com mudança populacional.

Figura 5.53. Abundância relativa* de enzimas e KOs do ensaio 5 da (a) Etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H_2 e (b) Etapa II de avaliação da homoacetogênese.

* A abundância relativa foi calculada considerando somente os KOs para as enzimas dos metabolismos estudados, com total reads de 143276 e 188283 para a etapa I e II, respectivamente.

Figura 5.54. Proposta de rota metabólica para produção de H₂ e consumo via homoacetogênese, produção de butanol, ácido propiônico e lático.

Abundância relativa* para enzimas do ensaio 5 da etapa I (Número azul) e II (Número vermelho). Ácidos orgânicos, álcoois e gases observados no reator da etapa I (→) e II (→). Ácido lático não foi observado no reator da etapa I (- →) e II (- →). Enzimas (EC): 1.1.1.27) L-lactato desidrogenase, 1.1.1.28) D-lactato desidrogenase, 1.2.1.10 1.1.1.1) Acetaldeído desidrogenase/álcool desidrogenase, 1.1.1.157) 3-hidroxibutírico-CoA desidrogenase, 1.2.7.1 1.2.7.-) Piruvato-ferredoxina/flavodoxina oxidoreductase, 2.7.2.3) Fosfoglicerato quinase, 4.2.1.11) Enolase, 2.3.1.8) Fosfato acetiltransferase, 1.2.7.4) Monóxido de carbono desidrogenase anaeróbia subunidade catalítica, 6.3.4.3) Formiato-tetrahydrofolato ligase, 1.1.1.1) Álcool desidrogenase - preferência por propanol, 2.7.2.7) Butirato quinase, 1.3.8.1) Butiril-CoA desidrogenase, 2.3.1.19) Fosfotransbutirilase, 2.8.3.1) Propionato CoA-transferase, 1.1.1.157) 3-hidroxibutírico-CoA desidrogenase, 1.2.1.87) Propionaldeído desidrogenase. *Abundância relativa calculada considerando o total de KOs nas amostras do ensaio 5 na etapa I (3.567.997) e II (4.840.708).

Tabela 5.25: Metabolismos relacionados com a produção e consumo de H₂ do ensaio 5 da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H₂ e II de avaliação da homoacetogênese.

Metabolismo	Microorganismos	Etapa I* (%)	Etapa II* (%)
Produção de Hidrogênio	<i>Clostridium</i> sp.	18,82	11,26
	<i>Bacillus</i> sp.	0,16	0,10
	<i>Pantoea</i> sp.	0,01	0
	<i>Hungatella</i> sp.	0,03	0,02
	<i>Caloramator</i> sp.	0,02	0,02
	N.D	8,13	7,40
	Outros	10,81	21,17
Homoacetogênese autotrófica	<i>Clostridium</i> sp.	5,88	4,99
	<i>Eubacterium</i> sp.	0	0,01
	<i>Hungatella</i> sp.	0,01	0
	<i>Prevotella</i> sp.	0,03	0,04
	N.D	2,64	2,27
	Outros	4,45	7,67
Homoacetogênese heterotrófica	<i>Clostridium</i> sp.	14,48	6,96
	<i>Eubacterium</i> sp.	0,91	0,18
	<i>Prevotella</i> sp.	0,11	0,19
	<i>Sporomusa</i> sp.	0,00	0,04
	N.D	4,57	5,46
	Outros	9,69	13,09
Produção de ácido lático	<i>Lactobacillus</i> sp.	4,11	11,29
	<i>Enterococcus</i> sp.	0,19	0,26
	<i>Bacillus</i> sp.	0,05	0,04
	N.D	3,40	0,86
	Outros	4,56	1,77
Produção de n-butanol	<i>Clostridium</i> sp.	1,48	0,66
	N.D	0,18	0,35
	Outros	0,14	0,71
Produção de ácido propiônico	<i>Clostridium</i> sp.	3,81	1,16
	N.D	1,13	1,30
	Outros	0,22	0,73

*A abundância relativa foi calculada considerando somente os KOs para as enzimas dos metabolismos estudados, com total reads de 143276 e 188283 para a etapa I e II. N.D Não disponível na base de dados KEGG.

Outras bactérias como *Pantoea* sp. (~0,01%), *Hungatella* sp. (~0,02%) e *Caloramator* sp. (~0,02%), foram associadas a genes funcionais para a produção de H₂, sendo observada abundância relativa próxima nas etapas I e II. Jung et al. (2012) observaram *Pantoea ananatis*,

Pantoea agglomerans, *Caloramator viterbiensis* e *Caloramator viterbiensis*, em reatores para produção de H_2 a partir de água residuária de café, as quais foram associados com a degradação de glicose, frutose e sacarose, além de produção de H_2 em condição termofílica. Kaur et al. (2014) isolaram *Hungatella* sp. de efluente de digestor anaeróbio de indústria de probióticos, que sendo representante da família Clostridiaceae, tem capacidade de degradar matéria orgânica complexa para a produção de ácidos orgânicos, álcoois e H_2 . Portanto, diversidade de gêneros participaram da rota de produção de H_2 , com a identificação de genes funcionais para este metabolismo na etapa I e II.

Destaca-se alta abundância relativa de gêneros não disponibilizados pela base de dados KEEG para a produção de H_2 (7,4 – 8,3%), homoacetogênese autotrófica (2,27 - 2,64%), homoacetogênese heterotrófica (4,57 – 5,46%) e produção de ácido láctico (0,86 – 3,40%), o qual impossibilitou maior conhecimento dos grupos de bactérias associadas à esses metabolismos.

Identificou-se genes relacionados as enzimas da a homoacetogênese autotrófica com abundância relativa maior na etapa II (etapa I: 13% e II: 15%), principalmente para a formiltetrahidrofolato sintetase (etapa I: 3,1% e II: 3,2%, EC 6.3.4.3, K01938) e acetato quinase (etapa I: 1,6% e II: 2,8%, EC 2.7.2.1, K00925). Essas enzimas são sintetizadas em bactérias homoacetogênicas, tais como *Clostridium ljungdahlii* mediante a rota de Wood-Ljungdahl, que se caracteriza por permitir a fixação de CO_2 com H_2 como doador de elétrons (Latif et al., 2013). Similarmente, a identificação de genes relacionados as estas enzimas em *Eubacterium* sp. foi maior na etapa II (etapa I: 0% e II: 0,01%), gênero com reconhecida capacidade de crescimento homoacetogênico, sendo reportada por ser responsável por até 98% do consumo de H_2 em reatores em batelada com glicose (5 g L^{-1}), pH 5,5, 37 °C e inóculo anaeróbio misto do tratamento de água residuária de cervejaria (Shanmugam et al., 2016). Genes funcionais associados a homoacetogênese autotrófica também foram identificados em *Hungatella* sp. (etapa I: 0,01% e II: 0%) e *Prevotella* sp. (etapa I: 0,03% e II: 0,04%). *Hungatella* sp. não tem sido reportada na literatura como bactéria homoacetogênica, no entanto, tem sido verificada alta similaridade (97,84%) com o gênero *Clostridium* sp. (Kaur et al., 2014), pelo qual, pode apresentar genes funcionais para esta rota. Do mesmo modo, *Prevotella* sp. foi referenciada por

competir por substrato para a transformação em ácido acético ou lático, afetando negativamente a produção de H_2 , no entanto, metabolismo homoacetogênico autotrófico não tem sido evidenciado (Castelló et al., 2018). Por meio destes resultados pode-se destacar que o consumo de H_2 foi principalmente decorrente do aumento do potencial metabólico da comunidade homoacetogênica autotrófica na etapa II.

Caso contrário foi observado em relação a homoacetogênese heterotrófica; ou seja maior na etapa I (etapa I: 29,9% e II: 25,9%), possivelmente devido a maior disponibilidade de substrato orgânico quando comparado com a etapa II (carboidratos iniciais da etapa I: 1.643 mg L^{-1} e II: 578 mg L^{-1}). Assim, identificou-se maior proporção de genes relacionados as enzimas como enolase (etapa I: 5,1% e II: 4,6%, EC 4.2.1.11, K01689) e fosfoglicerato quinase (etapa I: 4,6% e II: 3,5%, EC 2.7.2.3, K00927) na etapa I, as quais catalisam reações do metabolismo heterotrófico de bactérias homoacetogênicas por meio da via glicolítica (Latif et al., 2013). Os genes destas enzimas foram identificados principalmente em *Clostridium* sp. (etapa I: 14,48% e II: 6,96%) e *Eubacterium* sp. (etapa I: 0,91% e II: 0,18%). Observou-se que *Clostridium* sp. aportou maior potencial metabólico para a síntese de H_2 (18,8%), mas também maior capacidade enzimática para utilizar o substrato orgânico em rotas homoacetogênicas (14,5%), confirmando a versatilidade destes microrganismos para se adaptar a diferentes fontes de substratos. *Sporomusa* sp. foi identificada também na etapa II da fermentação (0,04%), a qual reporta atividade homoacetogênica autotrófica e heterotrófica. Por exemplo, Blanchet et al., (2015) reportaram a produção de até 2.904 mg L^{-1} de ácido acético por *Sporomusa ovata* a partir de CO_2 e H_2 em reator eletroquímico microbiano. Do mesmo modo, verificou-se o crescimento do isolado de *Sporomusa malonica* em diferentes fontes de substrato, sendo observada capacidade de crescer a partir de ácidos orgânicos, álcoois, frutose e H_2/CO_2 para a produção de ácido acético (Dehning et al., 1989).

Para a produção de ácido lático, obteve-se potencial enzimático de 12,3% na etapa I e 14,2% na etapa II, principalmente devido à alta abundância relativa da L-lactato desidrogenase (etapa I: 3,2% e II: 4,1%, EC1.1.1.27, K00016) e D-lactato desidrogenase (etapa I: 1,2% e II: 2,9%, EC 1.1.1.28, K03778). Estas enzimas permitem a síntese de diferentes estereoisômeros de ácido lático (L ou D) a partir do ácido pirúvico (Holzapfel and Wood, 1995; Martinez et al., 2013), sendo identificados genes dessas enzimas em *Lactobacillus* sp. (etapa I: 4,11% e II:

11,29%,) e *Enterococcus* sp. (etapa I: 0,19% e II: 0,26%,), principalmente na etapa II. No entanto, potencial metabólico alto para a produção de ácido láctico deu-se à predominância de *Lactobacillus* sp. na etapa II (62,8%), mas não a maior atividade enzimática destas bactérias, uma vez que ácido láctico não foi produzido.

Para a síntese de n-butanol observou-se similar abundância relativa dos genes das enzimas relacionadas com este metabolismo na etapa I (1,8%) e II (1,7%), principalmente para 3-hidroxi-butirilo-CoA desidrogenase (EC 1.1.1.157, K00074). Por meio da ação desta enzima tem-se a síntese de butiril-CoA, molécula intermediária para a geração de butanol ou ácido butírico. Por meio da ação da butanol desidrogenase ocorre o passo final de síntese de butanol (Stams, 1994; Waldron, 2010), no entanto, genes relacionados a essa enzima não foram identificados nas amostras. Entre 0,66% e 1,48% de genes dessa enzima foram associados a *Clostridium* sp., principalmente devido a sua capacidade de alterar a rota para a síntese de butanol sob condições de alta pH_2 . Por exemplo, Yerushalmi et al. (1985) verificaram aumento da relação de produção de butanol/acetona de 2,67 para 4,12 por *Clostridium acetobutylicum*, para maior pressão de H_2 de 274 para 1.479 kPa, durante a operação de reatores em batelada em meio sintético com glicose (20 g L^{-1}), a $38\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 6,2-6,4 e cultura pura (*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824).

Maior potencial enzimático da síntese de ácido propiônico foi observado na etapa I (etapa I: 5,2% e II: 3,2%), uma vez que foram identificados genes com abundância relativa maior e relacionados as enzimas propionato CoA-transferase (etapa I: 2,5% e II: 1,2%, EC 2.8.3.1, K01026) e propionaldeído desidrogenase (etapa I: 0,8% e II: 0,3%, EC 1.2.1.87, K13922). Por meio da ação da propionato CoA-transferase tem-se a transformação de ácido láctico em ácido propiônico em bactérias como *Clostridium propionicum* (Selmer et al., 2002). A propionaldeído desidrogenase catalisa a síntese de propionil-CoA a partir de propionaldeído, passo intermediário para a síntese de ácido propiônico (Leal et al., 2003). Genes relacionados a estas enzimas foram identificados principalmente em *Clostridium* sp. (entre 1,16 e 3,81%), possivelmente pela presença de espécies semelhantes a *C. propionicum* que propiciaram a síntese de ácido propiônico (inicial inferior ao limite de detecção e após ~ 24 h de fermentação 40 mg L^{-1}) e com

redução do ácido láctico na etapa I (inicial 3.596 mg L⁻¹ e após ~ 24 h de fermentação 2.557 mg L⁻¹).

Por meio da baixa abundância relativa de genes relacionados as enzimas de síntese de n-butanol (0,7%) e ácido propiônico (1,2%) quando comparado com a homoacetogênese autotrófica (5%) durante a etapa II pode-se inferir que o consórcio microbiano do ensaio 5 possuía maior potencial enzimático para o consumo de H₂ via homoacetogênese. Por isso, comparou-se a mudança do perfil funcional nas etapas I e II mediante diagrama de Venn (Figura 5.55), sendo verificado 4.230 KOs iguais em ambas as etapas, e portanto mudança metabólica de somente 15%. Do mesmo modo, identificou-se 54 genes de enzimas iguais em rotas de produção e consumo de H₂ durante as etapas I e II, pelo qual, ~96% destes genes de enzimas foram responsáveis, tanto pela maior síntese de H₂ (etapa I), quanto em relação à homoacetogênese (etapa II). Isto porque, algumas das enzimas podem fazer parte de rotas de produção de H₂ e homoacetogênese autotrófica e heterotrófica, como por exemplo a piruvato ferredoxina oxidorreductase (Hallenbeck and Benemann, 2002; Latif et al., 2011).

Figura 5.55. Diagrama de venn relacionanado (a) KOs (b) Enzimas de produção e consumo de hidrogênio* para o ensaio 5 da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H₂ e II de avaliação da homoacetogênese.

*Considerando somente os KOs para as enzimas dos metabolismos estudados.

O perfil funcional associado aos fungos foi estudado mediante a Figura 5.56, sendo observados 13 KOs de genes de enzimas relacionadas a representantes dos filos Ascomycota e Basidiomycota, sendo verificado abundância maior para genes da enolase (etapa I: 25,1% e II: 20,7%, EC 4.2.1.11, K01689) e frutose-bisfosfato aldolase - classe II (etapa I: 14,8% e II: 19,9%, EC 4.1.2.13, K01624). Ambas fazem parte da glicólise, sendo a primeira delas, enzima com atividade glicolítica principalmente presente na parede celular de leveduras como *Saccharomyces* sp. (Edwards et al., 1999), e a segunda responsável pelo rompimento da frutose bifosfato em dihidroxiacetona fosfato mais gliceraldeído-3-fosfato (Cooper et al., 1996). Sabendo-se que ambas as enzimas fazem parte da glicólise, rota importante, tanto para a produção de H_2 , quanto para a homoacetogênese, não foi observado diferenças importantes na sua abundância relativa entre as etapas I e II.

Figura 5.56. Abundância relativa* de genes de enzimas relacionados com o metabolismo de fungos para o ensaio 5 da etapa I de seleção das condições de otimização da produção de H_2 e II de avaliação da homoacetogênese.

*Considerando somente os KOs para as enzimas dos metabolismos estudados (total reads 29135 e 41710 para a etapa I e II, respectivamente).

Contrariamente, na etapa I observou-se abundância maior de genes relacionados as enzimas álcool desidrogenase, cuja preferência está diretamente relacionada ao propanol (etapa I: 4,9% e II: 3,9%, EC 1.1.1.1, K13953) e aldeído desidrogenase (NAD⁺) (etapa I: 3,5% e II: 0,4%, EC 1.2.1.3, K00128). Verificou-se aumento da concentração de etanol da etapa I (de 2.496 para 3.470 mg L⁻¹) e diminuição na etapa II (de 3.470 para 94 mg L⁻¹). Provavelmente, a partir desses resultados possa-se explicar esta ocorrência, uma vez que estas enzimas são importantes para a rota de fermentação alcoólica de leveduras (Bennetzens and Hall, 1982), e adicionalmente justifica a contribuição dos fungos na síntese deste metabólito durante a co-digestão de resíduos de café.

5.7.7. Validação do modelo para a produção de hidrogênio

Obteve-se modelo matemático (Modelo 4, Tabela 5.18), superfície de resposta e curvas de contorno para a produção de H₂ (Figura 5.37). Em relação a região de otimização escolheu-se aquelas condições experimentais de pH inicial 7,0, *headspace* 30% e 7 g L⁻¹ de polpa e casca para a validação experimental do modelo, para o qual determinou-se a cinética de produção de H₂ (Figura 5.57). Obteve-se para as condições de operação do reator otimizado (Tabela 5.26) 3,04 L H₂ L⁻¹ d⁻¹, que foi próximo ao valor previsto mediante o modelo de 3,56 L H₂ L⁻¹ d⁻¹. Assim, os valores experimentais correlacionam-se adequadamente com os valores previstos, em função da precisão deste modelo determinada mediante o desvio padrão de 0,37 L H₂ L⁻¹ d⁻¹.

Figura 5.57. Cinética de produção de H_2 e ajuste ao modelo de Gompertz modificado do ensaio de validação do modelo otimizado de produção de H_2 a partir de resíduos de café.

Os valores obtidos para a produção de H_2 (P) de 240 mL, R_m de $19 \text{ mL } H_2 \text{ h}^{-1}$ e λ de 12,1 h (Tabela 5.26), sendo verificado potencial de produção similar ao ensaio 5 (P : 244 mL), mas com velocidade de produção 6 vezes maior (R_m : $3,1 \text{ mL } H_2 \text{ h}^{-1}$, ensaio 5), pelo qual, pode ser considerado que a seleção das condições de fermentação mediante a análise da superfície de resposta permitiu aprimorar os resultados.

Tabela 5.26: Validação do modelo de produção de hidrogênio e resultados da operação do reator otimizado a partir de resíduos de café.

Validação do modelo			
Condições:		Produção de Hidrogênio (L H₂ L⁻¹ d⁻¹)	
		Valor previsto	Valor experimental
pH	7,0	3,56	3,04 ± 0,37
Volume de <i>headspace</i>	30%		
Concentração de polpa e casca	7 g L ⁻¹		
Operação do reator otimizado			
		Inicial	Final
<i>P</i>	mL H ₂		240
<i>Rm</i>	mL H ₂ h ⁻¹		19,0
λ	h		12,1
pH		7,0	6,4
Redução de carboidratos dissolvidos	%		69
Celobiose	mg L ⁻¹	≤ LD	3
Arabinose	mg L ⁻¹	144	307
DQO dissolvida	mg L ⁻¹	22.000	22.600
Fenol	mg L ⁻¹	383	517
SST	mg L ⁻¹	312	408
Ácido acético	mg L ⁻¹	843	508
Ácido propiônico	mg L ⁻¹	153	251
Ácido isobutírico	mg L ⁻¹	65	571
Ácido butírico	mg L ⁻¹	1.734	5.572
Ácido valérico	mg L ⁻¹	58	176
Ácido isovalérico	mg L ⁻¹	238	72
Ácido láctico	mg L ⁻¹	4.550	1.510
Ácido fórmico	mg L ⁻¹	217	66
Etanol	mg L ⁻¹	3.442	3.323
Metanol	mg L ⁻¹	≤ LD	226
n-Butanol	mg L ⁻¹	≤ LD	156

P Potencial máximo de produção de H₂, *Rm* Velocidade máxima de produção, λ Tempo de início da fermentação, *DQO* Demanda química de oxigênio, *SST* Sólidos suspensos totais.

Durante a operação do reator sob as condições otimizadas, observou-se redução de carboidratos de 69% para a síntese de biomassa (aumento de SST de 96 mg L⁻¹), metabólitos gasosos (240 mL H₂) e dissolvidos (1.282 mg L⁻¹ de ácidos orgânicos + álcoois, Tabela 5.26).

Observou-se aumento no final da fermentação dos carboidratos, como celobiose e arabinose, (de inferior ao limite de detecção e 144 mg L^{-1} para 3 e 307 mg L^{-1} , respectivamente), o qual confirma a atividade de enzimas hidrolíticas de bactérias e fungos no consórcio microbiano sobre a celulose e hemicelulose na polpa e casca, com liberação de açúcares mais simples (Van Dyk and Pletschke, 2012). Observou-se para matéria orgânica dissolvida (inicial de 22.000 e final de 22.600 mg L^{-1}) e fenol (inicial de 312 e final de 408 mg L^{-1}) aumento no final da fermentação, pelo qual, pode ser considerado que processos de hidrólise como solubilização de matéria orgânica, e deslignificação com liberação de fenóis, os quais predominaram no reator otimizado.

Em relação aos ácidos orgânicos e álcool observou-se ácido butírico (3.838 mg L^{-1}), ácido isobutírico (571 mg L^{-1}) e em menor proporção ácido propiônico (98 mg L^{-1}), ácido valérico (118 mg L^{-1}), metanol (226 mg L^{-1}) e n-butanol (156 mg L^{-1}). Por meio desses resultados pode-se inferir em predomínio da rota de fermentação ácido butírica, com rendimento de 2 mol H_2 para cada mol de glicose (de Sá et al., 2014). Verificou-se diminuição dos ácidos acético e láctico no final da fermentação (de 843 e 4.550 mg L^{-1} para 508 e 1.510 mg L^{-1} , respectivamente), pelo qual, a reação de consumo de ácido láctico e acético para a síntese de ácido butírico (Equação 5.16) pode explicar o aumento de ácido butírico e isobutírico (de 1.734 e 65 mg L^{-1} para 5.572 e 571 mg L^{-1} , respectivamente).

A produção de H_2 de $0,13 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a partir da co-digestão de polpa, casca e água residuária de café foi comparada com outras pesquisas utilizando resíduos desta indústria (Tabela 3.3). Jung et al. (2012) obtiveram produção maior de $1,65 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ com água residuária de café (31 g DQO L^{-1}), durante a operação de reatores UASB a 35°C e TDH de 6 h , inoculado com grânulos de microrganismos autóctones do resíduo.

Similarmente, Hernández et al. (2014) obtiveram maior produção em relação ao presente trabalho, com $0,31 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ durante a co-digestão de mucilagem de café e dejetos de suinocultura ($9,8 \text{ g DQO L}^{-1}$), em reatores em batelada a 55°C e tempo de fermentação de 30 dias. A degradabilidade inferior dos resíduos lignocelulósicos (polpa e casca de café) quando comparado com os substratos utilizados pelos autores, pode ter influenciado a inferior transformação em biogás.

No entanto, obteve-se $98 \text{ mL H}_2 \text{ g}^{-1}$ de polpa e casca, valor superior ao reportado por Dos santos et al. (2018) de $19 \text{ mL H}_2 \text{ g}^{-1}$ de casca a partir da fração líquida do pré-tratamento de

casca de café com ozônio ($39,5 \text{ g DQO L}^{-1}$), em reator de mistura completa a $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$, inoculado com lodo de esterco bovino. Isto porque a polpa e casca possuem maior teor de material fermentável (celulose e hemicelulose) quando comparado com a fração líquida, provendo maior quantidade de substratos propícios para a produção de H_2 no presente trabalho.

5.7.8. Caracterização taxonômica e funcional da comunidade microbiana do reator otimizado

Estudou-se o metagenoma associado à máxima produção de H_2 obtida mediante a co-digestão de resíduos de café, com o intuito de analisar a estrutura da comunidade microbiana e potencial metabólico que conduziram a esse resultado. Para o perfil taxonômico foram desenhadas as curvas de rarefação para as famílias e gêneros de microrganismos identificados na amostra (Figura 5.58). Observou-se platô para ambas as curvas, pelo qual, a diversidade taxonômica foi adequadamente representada.

A diversidade de Shannon_H e estimador de riqueza Chao-1 para os gêneros do reator otimizado foi superior (0,689 e 578,3) quando comparado com o consórcio microbiano utilizado para a bio-aumentação dos diferentes reatores (0,887 e 442,4, respectivamente). Isso foi provavelmente, relacionado a maior complexidade dos resíduos de café favorecendo maior diversidade e riqueza de populações microbianas durante a produção de H_2 . Caso contrário foi observado por Si et al. (2015); ou seja, observaram processo de seleção dos microrganismos após a produção de H_2 , com diversidade microbiana inferior em reatores UASB (6 filos) e reator de leite empacotado (7 filos) quando comparado com o inóculo (25 filos). Os autores alimentaram os reatores com glicose a COV $0,96 - 15,36 \text{ g DQO L}^{-1}$, TDH 12-24 h, pH $5,0 - 6,5$ e inóculo de planta de tratamento anaeróbio de esgoto sanitário pré-tratado a $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos. Em função da maior complexidade dos substratos do presente estudo pode-se explicar o aumento na diversidade e riqueza na comunidade microbiana do reator otimizado, quando comparado com os resultados de Si et al. (2015). Isso porque, observou-se nos resíduos de café (polpa, casca e água residuária) componentes como lignina, celulose, hemicelulose, pectina, fenol, carboidratos dissolvidos e ácidos orgânicos, provavelmente com diversidade de microrganismos e enzimas

para sua degradação (Figura 5.28). Pelo contrário, inferior complexidade da estrutura da comunidade microbiana pode permitir a fermentação de carboidratos simples, como a glicose utilizada para a produção de H_2 (Si et al., 2015).

Figura 5.58. Curvas de rarefação para descrever a riqueza de (a) Famílias e (b) Gêneros do ensaio de validação do modelo otimizado de produção de H_2 a partir de resíduos de café.

Obteve-se para representantes dos domínios Bacteria, Eukarya e Archaea abundâncias relativas de 97,2%, 0,10% e 0,002%, respectivamente, com abundância relativa de 0,032% para os fungos. Sendo assim, as bactérias e fungos foram os principais responsáveis pela hidrólise e produção de H_2 no reator. No entanto, verificou-se aumento da abundância para as bactérias (de

94,7% para 97,2%) e diminuição para os fungos em relação ao consórcio microbiano utilizado para a bio-aumentação dos reatores (de 0,092% para 0,032%). Possivelmente, as condições de fermentação utilizadas no reator otimizado favoreceram maior crescimento de bactérias produtoras de H_2 .

Representantes das principais famílias de bactérias foram Clostridiaceae (91,7%), Lactobacillaceae (1,79%) e Enterococcaceae (0,18%, Figura 5.59), pelo qual, pode concluir-se que as condições de fermentação maximizaram tanto a produção de H_2 quanto o crescimento da família Clostridiaceae. Este resultado foi similar ao observado por Si et al. (2015), os quais obtiveram 93,3% de representantes da família Clostridiaceae nas condições de maior rendimento H_2 de $1,44 \text{ mol } H_2 \text{ mol}^{-1}$, em reator UASB alimentado com glicose a COV $15,36 \text{ g DQO L}^{-1}$, pH 5 – 6,5, 37°C , e inoculado com lodo do tratamento anaeróbio de esgoto (pré-tratamento 100°C por 15 min) (Si et al., 2015).

Figura 5.59. Grupos taxonômicos para (a) Famílias e (b) Gêneros de Bactérias do ensaio de validação do modelo otimizado de produção de H₂ a partir de resíduos de café.

Este resultado corresponde a abundância relativa maior para o gênero *Clostridium* sp. (87,91%), seguido de *Lactobacillus* sp. (1,75%) e *Enterococcus* sp. (1,52%, Figura 5.59). Quando analisada a determinação de *Clostridium* sp. em outros sistemas com resíduos de café, observou-se valores maiores no reator otimizado (pH 7,0, 30 °C, sem agitação, *headspace* 30%, bio-aumentação 10%, polpa e casca 7 g L⁻¹, água residuária 30 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura) quando comparado com o consórcio microbiano utilizado para a bio-aumentação (76,9%), reatores com produção de etanol (22,6% no ensaio 13-14-15 do PB12, pH 5,5, 40 °C, 90 rpm,

headspace 60%, bio-aumentação 10%, polpa e casca 4 g L⁻¹, água residuária 18,5 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 1 g L⁻¹), ácido láctico (2,7% no ensaio 9 do PB12, pH 4,0, 30 °C, sem agitação, *headspace* 70%, bio-aumentação 20%, polpa e casca 6 g L⁻¹, água residuária 7 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹) ou ácido acético por homoacetogênese (20,9% no ensaio 5 etapa II do DCCR, pH 7,7, 30 °C, sem agitação, *headspace* 40%, bio-aumentação 10%, polpa e casca 15 g L⁻¹, água residuária 30 g DQO L⁻¹, sem extrato de levedura).

Portanto, a adequada escolha das condições de fermentação foi mais importante para a seleção de gêneros com maior potencial para a produção de H₂, que a origem dos substratos ou do inóculo. Por exemplo, Boboescu et al. (2014), verificaram que somente com mudança no pH foi possível diferenças tanto na comunidade microbiana como no rendimento da fermentação, observando 50% de *Lactobacillus* sp. em pH 4,56 e 2,97 mL H₂, e 89% de *Clostridium* sp. em pH 6,47 com aumento na produção de H₂ para 27,18 mL H₂, para reatores em batelada com água residuária de cervejaria (6558 mg DQO L⁻¹), em pH 4,56 – 6,74, 23,28 – 38,72 °C, adição de glicose de 3,56 – 16,44 g L⁻¹, e inóculo biomassa de sistema de desnitrificação de planta de tratamento de água residuária pré-tratada a 70 °C por 1 h.

Os fungos identificados no reator otimizado pertenceram ao Filo Ascomycota (99,76%) e Basidiomycota (0,24%), sendo os principais gêneros *Kazachstania* sp. (18,6%), *Saccharomyces* sp. (16,3%) e *Naumovozyma* (10,4%, Figura 5.60). A participação de leveduras em reatores para a produção de H₂ com outros resíduos é um tema com limitada informação na literatura, sendo encontradas principalmente para a fermentação alcoólica (Marsh et al., 2014), produção de alimentos como o kefir (Hittinger et al., 2018), ou para a degradação de fenol (Najafpoor et al., 2015).

Figura 5.60. Grupos taxonômicos para (a) Filos e (b) Gêneros de Fungos do ensaio de validação do modelo otimizado de produção de H₂ a partir de resíduos de café.

Para a co-digestão de resíduos de café a presença dos fungos foi importante para diminuir o tempo da fermentação e aumentar a síntese de H₂, uma vez que durante testes iniciais (dados não reportados) tentou-se elimina-los mediante filtração da água residuária previamente a fermentação (0,45 µm, sem bio-aumentação), ou filtração da água residuária + bio-aumentação com consórcio microbiano pré-tratado termicamente (100 °C por 1 h), obtendo-se produção de H₂

após 20 d de operação de somente 12,4 e 6,8 mL H₂, respectivamente. Estes reatores foram operados em batelada com 2 g L⁻¹ polpa e casca de café pré-tratada em sistema hidrotérmico (200 °C por 10 min), 3,5 g DQO L⁻¹ de água residuária, 1 g L⁻¹ de extrato de levedura, 10% de bio-aumentação com consórcio microbiano, *headspace* 50% e pH inicial 5,0. Similarmente, a presença de leveduras nos resíduos de café originados do processamento por coleta dos grãos foi reportada em pesquisas prévias (Vilela et al., 2010). Por tanto, estes microrganismos estarão sempre presentes nos substratos e a fermentação, possivelmente pela associação com as bactérias do ácido láctico e a capacidade de hidrólise e fermentação dos resíduos. Isto porque as leveduras permitem a síntese de vitaminas e fatores de crescimento quando crescem junto a bactérias do ácido láctico (Narvhus and Gadaga, 2003).

Outros fungos identificados em menor proporção foram *Fusarium* sp. (0,8%), *Hanseniaspora* sp. (0,4%), *Kluyveromyces* sp. (1,2%) ou *Zygosaccharomyces* sp. (4,4%), os quais possuem enzimas para a degradação de celulose, hemicelulose e pectina, (Lynd et al., 2002; Sun and Cheng, 2002), contribuindo com a hidrólise da polpa e casca.

Analisou-se o perfil funcional mediante os KOs (Ortologias do KEGG) encontrados na *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG). Obteve-se platôs para a curva de rarefação dos KOs (Figura 5.61), portanto, a diversidade funcional foi adequadamente representada. No reator otimizado, a diversidade de Shannon_H foi similar (7,115 e 7,180, respectivamente) e o estimador de riqueza de Chao-1 foi maior (4.997 e 3.760, respectivamente), quando comparou-se com o consórcio microbiano. Desse modo, verificou-se aumento da diversidade de genes funcionais com a fermentação. Segundo Lui e Wang (2017), comunidade mais diversa permite maior variedade de produtos da fermentação e coexistência de rotas metabólicas. No entanto, no reator otimizado predominou a produção do metabólito desejado (hidrogênio) para diversidade microbiana e funcional alta. Como explicado na Figura 5.28, maior diversidade de microrganismos e enzimas podem ser necessárias para a degradação de resíduos de café (polpa, casca e água residuária), devido à complexidade da sua composição.

Figura 5.61. Curvas de rarefação para descrever a riqueza de KOs do ensaio de validação do modelo otimizado de produção de H₂ a partir de resíduos de café.

Verificou-se que 11% dos KOs estiveram relacionados com o metabolismo de carboidratos, 6,6% com o metabolismo/famílias de enzimas, 4,4% com o metabolismo de energia e 16,2% com o transporte de membrana/transporte e catabolismo (Figura 5.62), não diferenciando-se do obtido para o consórcio microbiano (10%, 6,5%, 4,7% e 16,1%, respectivamente). Por meio deste resultado pode-se inferir que a identificação de um gene não reflete necessariamente que esteja ativo, se fazendo importante associar o metagenoma com o monitoramento do reator.

Similarmente, verificou-se que 3,2% dos KOs corresponderam a enzimas associadas com a hidrólise, 4,7% com a acidogênese e 0,4% com a acetogênese (Figura 5.63), por tanto, o 8,3% do potencial metabólico correspondeu a enzimas para a degradação anaeróbia dos resíduos de café, principalmente, para a produção de ácidos orgânicos e álcoois. Abundância maior de enzimas acetogênicas pode estar associada com a capacidade de *Clostridium* sp. (89,7% da população) de produzir ampla diversidade de ácidos orgânicos e álcoois, como ácido butírico, acético, propiônico, etanol, metanol, butanol ou 1,3-propanodiol (Schink e Zeikus, 1980; Yerushalmi et al., 1985; Sikora et al., 2013).

Figura 5.62. Composição da categoria Kegg de nível 2 do ensaio de validação do modelo otimizado de produção de H_2 a partir de resíduos de café.

Figura 5.63. Abundância relativa* de KOs relacionados com as etapa de Hidrólise, Acidogênese e Acetogênese do ensaio de validação do modelo otimizado de produção de H_2 a partir de resíduos de café.

*A abundância relativa foi calculada considerando somente os KOs (total reads 7228868) para as enzimas dos metabolismos estudados.

Entre estes metabolismos, as enzimas que contribuíram com maior produção de H_2 foram estudadas com maior profundidade, uma vez que neste sistema obteve-se a máxima produção deste biogás a partir de resíduos de café (Figura 5.64 e 5.65). Segundo a composição dos resíduos de café descrito nas Tabelas 5.1 e 5.2, no início observou-se diversos substratos para a fermentação, tais como celulose, hemicelulose e lignina na polpa e casca, e carboidratos dissolvidos, ácidos orgânicos e álcoois na água residuária. Em função do aumento da concentração de celobiose (de inferior ao limite de detecção para 3 mg L^{-1}) e arabinose (de 144 para 307 mg L^{-1}) verificou-se atividade de enzimas que agem sobre a celulose e hemicelulose para a formação de glicose e outros carboidratos simples, tais como as endoglucanase (EC: 3.2.1.4, K01179 e K20542), beta-glucosidase (EC 3.2.1.21, K05349 e K05350), 6-fosfo-beta-glicosidase (EC 3.2.1.86, K01222 e K01223), glucano 1,6-alfa-glicosidase (EC 3.2.1.70, K01215), arabinoxilano arabinofuranohidrolase (EC 3.2.1.55, K01209 e K15921) e arabinana endo-1,5-alfa-L-arabinosidase. (EC 3.2.1.99, K06113).

Do mesmo modo, verificou-se aumento de fenol de 383 para 517 mg L^{-1} , em função da degradação da lignina mediante ação das enzimas acetil-CoA C-acetiltransferase (EC 2.3.1.9, K00626) e desidrogenase de álcool arílico (EC 1.1.1.90, K00055). O principal microrganismo hidrolítico identificado foi *Clostridium* sp. com participação sobre a degradação da celulose, hemicelulose e lignina em abundâncias relativas entre $0,051\%$ e $0,784\%$.

Identificou-se 37 KOs associados com a síntese de H_2 , destacando-se as enzimas piruvato-ferredoxina/flavodoxina oxidoredutase ($25,36\%$, EC 1.2.7.1 1.2.7.-, K03737), monóxido de carbono desidrogenase anaeróbia subunidade catalítica ($10,07\%$, EC 1.2.7.4, K00198), formiato desidrogenase (Receptor) ($5,35\%$, EC 1.17.99.7, K22015) e ferredoxina hidrogenase ($0,19\%$, EC 1.12.7.2, K00532).

Figura 5.64. Abundância relativa* de enzimas e KOs relacionados com a produção de hidrogênio do ensaio de validação do modelo otimizado de produção de H₂ a partir de resíduos de café.

*A abundância relativa foi calculada considerando somente os KOs (119448) para as enzimas do metabolismo estudado.

A piruvato-ferredoxina/flavodoxina oxidoredutase é considerada uma das enzimas que catalisa a síntese de H₂ (Hallenbeck and Ghosh, 2009), a partir do ácido pirúvico derivado dos carboidratos (Equação 5.22) (Wang e Wan, 2009; Sikora et al., 2013). Segundo esta informação, a máxima produção de H₂ observada neste reator deveu-se a alta abundância relativa de 25,36% de genes relacionados a esta enzima.

Figura 5.65. Proposta de rota metabólica para produção de H₂ a partir de resíduos de café sob condições otimizadas.

Abundância relativa* para as enzimas 1.1.1.2) L-lactato desidrogenase, 1.2.1.10 1.1.1.1) Acetaldeído desidrogenase/álcool desidrogenase, 1.17.99.7) Formiato desidrogenase, 1.2.7.4) Monóxido de carbono desidrogenase anaeróbia subunidade catalítica, 3.2.1.4) Endoglucanase, 3.2.1.21) Beta-glucosidase, 3.2.1.86) 6-fosfo-beta-glicosidase, 3.2.1.70) Glucano 1,6-alfa-glicosidase, 3.2.1.55) Arabinosilano arabinofuranohidrolase, 3.2.1.99) Arabinana endo-1,5-alfa-L-arabinosidase, 2.3.1.9) Acetil-CoA C-acetiltransferase, 1.1.1.90) Desidrogenase de álcool arílico, 1.2.7.1 1.2.7.-) Piruvato-ferredoxina/flavodoxina oxidoreductase, 1.12.7.2) Ferredoxina hidrogenase, 2.7.2.7) Butirato quinase, 1.3.8.1) Butiril-CoA desidrogenase e 2.3.1.19) Fosfotransbutirilase. *Abundância relativa calculada considerando o total de KOs na amostras (7.881.692).

A monóxido de carbono desidrogenase anaeróbia subunidade catalítica (EC 1.2.7.4, K00198) tem sido referenciada por permitir a síntese de ácido acético a partir de CO₂ e H₂ em microrganismos homoacetogênicos (Diekert and Wohlfarth, 1994). No entanto, foi interessante observar a diminuição de ácido acético de 843 para 508 mg L⁻¹ no reator otimizado, provavelmente devido a esta enzima, uma vez que ela tem a capacidade de realizar a rota reversa, de conversão do ácido acético em H₂ e CO₂ (Lee and Zinder, 1988).

A formiato desidrogenase (EC 1.17.99.7, K22015) permite a conversão reversível de ácido fórmico em CO₂ e H₂, sendo encontrada em bactérias aeróbias e anaeróbias, arqueias e leveduras (Ferry, 1990), pelo qual, diferentes tipos de microorganismos identificados no reator podem ter contribuído com a síntese de H₂ observada neste reator.

Via ferredoxina hidrogenase (EC 1.12.7.2, K00532) tem-se a produção de H₂ mediante as reações das equações 5.23 e 5.24 (Show et al., 2011). Genes relacionados a esta enzima foram identificados com baixa abundância (0,19%) no reator otimizado. No entanto, pode inferir-se importante atividade da mesma no reator devido à alta produção de H₂ observada (240 mL H₂).

Outros genes identificados foram relacionados com enzimas interessantes, tais como L-lactato desidrogenase (9,13%, EC 1.1.1.27, K00016) e acetaldeído desidrogenase / álcool desidrogenase (8,7%, EC 1.2.1.10 1.1.1.1, K04072) uma vez que estão associadas, tanto a síntese de ácido láctico e álcool, quanto a rota inversa que permite a produção de H₂ a partir destes metabólitos. Por exemplo, a lactato desidrogenase pode transformar o ácido láctico em ácido pirúvico, para a posterior transformação em H₂, CO₂ e ácido butírico (Sikora et al., 2013). Do mesmo modo, a acetaldeído desidrogenase/álcool desidrogenase pode oxidar etanol em acetaldeído, que posteriormente é transformado em acetil-CoA, ($\Delta G_0' = 6,2 \text{ kJ mol}^{-1}$) permitindo o crescimento de algumas bactérias como *Clostridium kluyveri* a partir de etanol, para a síntese final de ácido butírico, capróico e H₂ (Thauer et al., 1968). A identificação de genes relacionados a estas enzimas pode auxiliar no entendimento sobre a diminuição da concentração de ácido

lático de 4.550 para 1.510 mg L⁻¹ e do etanol de 3.442 para 3.323 mg L⁻¹, com o aumento da produção de H₂ para 240 mL H₂ (Tabela 5.26).

Genes relacionados a estas enzimas foram identificados principalmente em *Clostridium* sp., uma vez que foi o mais abundante no reator otimizado (87,9%), o qual tem sido referenciado por possuir diversas enzimas responsáveis pela síntese de H₂, como a ferredoxina hidrogenase, piruvato-ferredoxina/flavodoxina oxidorreductase, monóxido de carbono desidrogenase ou formiato desidrogenase (Diekert and Wohlfarth, 1994; Lee and Zinder, 1988; Show et al., 2011). A abundância relativa em outros gêneros de bactérias foi inferior ao 1%, como por exemplo, de 0,75%, em *Hungatella* sp., 0,51% em *Bacillus* sp., 0,31% em *Lachnoclostridium* sp. ou 0,14% em *Enterobacter* sp.

Em relação as enzimas de fungos, obteve-se abundância relativa maior de genes para a piruvato quinase (23,1%, EC 2.7.1.40, K00873) e piruvato carboxilase (19,6%, EC 6.4.1.1, K01958, Figura 5.66). Estas enzimas são importantes para a produção de etanol a partir de glicose por leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, agindo sobre o piruvato para a síntese de acetaldeído (pela piruvato quinase) e oxaloacetato (pela piruvato carboxilase) (Pronk et al., 1996). Outras enzimas relevantes foram a frutose-bisfosfato aldolase- classe II (17,7%, EC 4.2.1.11, K01624) e enolase (11,4%, EC 4.1.2.13, K01689), que realizam algumas das etapas da glicólise (Cooper et al., 1996; Edwards et al., 1999). No entanto, síntese de etanol não foi observada no reator otimizado (inicial de 3.442 mg L⁻¹ e final de 3.323 mg L⁻¹), evidenciando que ainda tendo potencial para a fermentação alcoólica com fungos, os genes destas enzimas possivelmente não estiveram ativos.

Figura 5.66. Abundância relativa* de genes de enzimas relacionados com o metabolismo de fungos do ensaio de validação do modelo otimizado de produção de H_2 a partir de resíduos de café.

*Considerando somente os KOs para as enzimas dos metabolismos estudados (total reads 54900).

5.7.3. Considerações parciais

A hipótese 6 “A seleção das condições de fermentação permite otimizar a produção de H_2 e diminuir o consumo de H_2 por homoacetogênese” foi aceita uma vez que:

- Condições de fermentação de pH inicial 7,0, concentração de polpa e casca 7 g L⁻¹ e volume de *headspace* 30% permitiram otimizar a produção de H_2 para máximo de 3 L H_2 L⁻¹ d⁻¹.
- O consumo de H_2 por homoacetogênese pode ser diminuído mediante pH próximo à neutralidade (entre 6,5 e 7,5) e alto volume de *headspace* (maior que 50%).

Outras conclusões importantes são:

- A aplicação de consórcio microbiano misto, como microorganismos autóctones de resíduos de café, pode facilitar o aparecimento de bactérias homoacetogênicas.

- Longos tempos de fermentação facilitam o estabelecimento da atividade homoacetogênica em reatores para a produção de H_2 independente das condições de operação como pH, pH_2 e concentração de substrato.
- As bactérias homoacetogênicas são amplamente versáteis, crescendo a partir de CO_2/H_2 , carboidratos, álcoois, fenol e ácidos orgânicos, pelo qual, se adaptam a ampla variedade de condições de fermentação como pH entre 5,1 e 4,8, alta pH_2 , contração de polpa e casca entre 6,95 e 17,05 g L^{-1} , concentração de carboidratos inferior ao 4%, acúmulo de ácidos orgânicos e álcoois e concentração de fenóis superior a 118 mg L^{-1} .
- Metabolismos como homoacetogênese, produção de ácido propiônico, produção de n-butanol e alongamento de cadeia de ácidos orgânicos (oxidação β reversa) podem ser estimulados sob condições de alta pH_2 .
- A comunidade de bactérias de reator para a produção de H_2 altera entre 12% e 37% para permitir a síntese de ácido acético via homoacetogênese, ácido propiônico e n-butanol. Isto porque nas condições de maior produção de H_2 , a pH_2 conduz a menor diversidade e riqueza na comunidade de bactérias.
- Maior produção de H_2 a partir de resíduos de café foram consequência de comunidade microbiana com predominância de *Clostridium* sp., uma vez que tais bactérias possuem potencial metabólico abundante em enzimas para a produção de H_2 , como a piruvato-ferredoxina/flavodoxina oxidoredutase ou a ferredoxina hidrogenase.
- Populações de bactérias dos reatores submetidos a alta pH_2 podem alterar a rota de produção para consumo de H_2 mediante homoacetogênese. Esta mudança metabólica foi consequência do potencial metabólico de *Clostridium* sp. em adaptar-se a diversos substratos, condições de estresse ou crescimento de bactérias do ácido lático produtoras de bacteriocinas, uma vez que algumas das suas enzimas podem participar tanto nas rotas de produção como de consumo de H_2 .
- Em relação a comunidade de fungos não verificou-se alteração em reatores das etapas de produção de H_2 e homoacetogênese, sendo identificados fungos semelhantes a *Saccharomyces* sp., *Kazachstania* sp., e *Naumovozyma* sp. Os principais genes funcionais de fungos foram relacionadas a glicólise (como a enolase e frutose-bisfosfato aldolase -

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

classe II) e fermentação alcoólica (como piruvato quinase e piruvato quinase), permitindo adaptação a diferentes condições operacionais.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados de produção de H_2 de todas as fases experimentais desenvolvidas foram comparados na Tabela 6.1. Em relação a hipótese 3 sobre “*Avaliação do efeito da co-digestão de resíduos de café brutos e pré-tratados na produção de H_2* ” foi possível verificar o aumento na degradabilidade dos resíduos brutos mediante o pré-tratamento hidrotérmico da polpa e casca a 180 °C por 15 min (Seções 5.3 e 5.4). Assim, para a polpa e casca pré-tratada (*M 3,5*) obteve-se potencial máximo de produção (*P*) de 1,8 mL H_2 e velocidade máxima de produção (*Rm*) de 0,4 mL H_2 h⁻¹, valores superiores em relação aqueles obtidos para resíduo moído sem pré-tratamento (*P*: 0,8 mL H_2 e *Rm*: 0,2 mL H_2 h⁻¹, reator *M*). Similarmente, constatou-se as máximas *P* e *Rm* durante a co-digestão de água residuária e polpa e casca pré-tratada (*AM 3,5*) de 8 mL H_2 e 0,8 mL H_2 h⁻¹, respectivamente, quando comparado com resíduos individuais, tais como, polpa e casca moída (*P*: 0,8 mL H_2 e *Rm*: 0,2 mL H_2 h⁻¹, reator *M*), água residuária (*P*: 2,9 mL H_2 e *Rm*: 0,3 mL H_2 h⁻¹, reator *A*) e fração líquida do reator hidrotérmico (*P*: 1,8 mL H_2 e *Rm*: 0,2 mL H_2 h⁻¹, reator *L 3,5*), ou na co-digestão com polpa e casca sem pré-tratamento (*P*: 3 mL H_2 e *Rm*: 0,6 mL H_2 h⁻¹, reator *AM*) .

Diante da ausência de pesquisas sobre a co-digestão de resíduos de café para a síntese de H_2 , estudou-se a Hipótese 3 de “*Avaliação do efeito dos fatores da fermentação sobre a produção de H_2 , ácidos orgânicos e álcoois*” com os fatores pH inicial, *headspace*, temperatura, velocidade de agitação, concentração de bio-aumentação do consórcio microbiano, polpa e casca, água residuária e extrato de levedura. Por tanto, para direcionar adequadamente os intervalos destes fatores e permitir maximizar o *P* e *Rm* e minimizar o λ , foi importante a realização do planejamento Plackett-Burman para 12 fatores (Seção 5.5). Para tanto, avaliou-se amplo intervalo para cada fator (pH 4,0 – 7, temperatura 30 – 50 °C, agitação 0 – 180 rpm, *headspace* 50 – 70%, bio-aumentação 0 – 20%, polpa e casca 2 – 6 g L⁻¹, água residuária 7 – 30 g DQO L⁻¹, extrato de levedura 0 – 2 g L⁻¹). Sob tais condições obteve-se variedade de bio-produtos que permitiram constatar o potencial dos resíduos da indústria do café para a produção de metabólitos de interesse comercial, como H_2 (máxima de 82 mL H_2), ácido láctico (máxima de 171 mg L⁻¹), ácido acético (máxima de 2.086 mg L⁻¹) e etanol (máxima de 1.599 mg L⁻¹, Seção 5.5).

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

Tabela 6.1: Seleção das condições experimentais de maior produção de hidrogênio a partir da co-digestão de resíduos de café.

Fase experimental	Desenho experimental e substratos	Parâmetro cinético	Resultado	pH	Headspace (%)	Polpa e casca (g L ⁻¹)	Água Residuária (g L ⁻¹)	Temp. (°C)	Agitação (rpm)	Bio-aumentação (%)	Extrato Levedura (g L ⁻¹)
Seleção das condições de pré-tratamento	Uma variável por vez: Casca e polpa <i>in natura</i>	<i>P</i>	1,2 mL H ₂								
		<i>Rm</i>	0,1 mL H ₂ h ⁻¹	6,0	50	2	3,5	37	0	10	1
		λ	16,9 h								
	Casca pré-tratada (Severidade 3,5)	<i>P</i>	1,8 mL								
		<i>Rm</i>	0,4 mL H ₂ h ⁻¹	6,0	50	2	3,5	37	0	10	1
		λ	22,8 h								
Seleção das condições de co-digestão	Uma variável por vez: Água residuária, polpa e casca pré-tratada	<i>P</i>	8 mL H ₂	6,0	50	2	3,5	37	0	10	1
		<i>Rm</i>	0,8 mL H ₂ h ⁻¹	6,0	50	2	3,5	37	0	10	1
		λ	14,7 h	6,0	50	2	3,5	37	0	10	1
Avaliação dos fatores da fermentação na produção de H ₂ , ácidos orgânicos e álcoois	Plackett-Burman para 12 fatores	<i>P</i>	82 mL H ₂	7,0	50	2	30	30	180	0	2
		<i>Rm</i>	4 mL H ₂ h ⁻¹	7,0	50	2	30	30	180	0	2
		λ	16,1 h	7,0	50	6	30	30	0	20	0
Avaliação dos fatores da fermentação no consumo de H ₂ por homoacetogênese	Planejamento fracionado 2 ⁴⁻¹	<i>P</i>	189 mL H ₂	5,5	40	9	30				
		<i>Rm</i>	7 mL H ₂ h ⁻¹	7,5	40	3	30				
		λ	15,4 h	7,5	60	3	30				
Seleção condições de fermentação para otimizar a produção de H ₂ e reduzir a homoacetogênese	Desenho de composto central rotacional (DCCR)	<i>P</i>	244 mL H ₂	5,5	40	15					
		<i>Rm</i>	19,8 H ₂ h ⁻¹	7,5	40	9					
		λ	12,4 h	6,5	50	12					
Condições otimizadas	Superfície de resposta e validação	<i>P</i>	240 mL H ₂	7,0	30	7	30	30	0	10	0
		<i>Rm</i>	19 mL H ₂ h ⁻¹	7,0	30	7	30	30	0	10	0
		λ	12,1 h	7,0	30	7	30	30	0	10	0

P Potencial máximo de produção de H₂, *Rm* Velocidade máxima de produção, λ Tempo de início da fermentação

Os resultados foram interessantes, pois sendo possível adequar as condições de 4 dos 8 fatores estudados (Tabela 6.1) e, por fim, estabelecer que, na co-digestão de resíduos de café em reatores em batelada não foi necessário incluir agitação nem adicionar extrato de levedura ao meio reacional, e que a temperatura e bio-aumentação podem ser fixados em 30 °C e 10% (v/v), respectivamente. Similarmente, obteve-se valores do P e R_m de 82 mL H₂ e 4 mL H₂ h⁻¹, respectivamente, correspondendo ao aumento no mínimo 7 vezes em relação aos ensaios iniciais de co-digestão com resíduos brutos (P : 3 mL H₂ e R_m : 0,6 mL H₂ h⁻¹ no reator *AM*), e 5 vezes em comparação com resíduo de polpa e casca pré-tratado (P : 8 mL H₂ e R_m : 0,8 mL H₂ h⁻¹ no reator *AM 3,5*). Em relação ao λ , o tempo de início da fermentação passou para 15,5 h, sendo similar aos primeiros ensaios (10,5 h para *AM* e 14,7 h para *AM 3,5*).

Adicionalmente, foi calculado o efeito de cada fator na produção de ácidos orgânicos e álcoois, redução de carboidratos e crescimento de biomassa. Tal resultado ampliou o conhecimento do processo, elucidando concentrações de substratos viáveis a serem adicionados, além de compreender um pouco mais sobre os microrganismos diante da variação das condições de fermentação. Assim, durante a co-digestão de resíduos de café a produção de ácido láctico (144 mg L⁻¹) e acético (351 mg L⁻¹) foi favorecida em pH 4,0 e 30 °C (ensaio 9), e de etanol (~2.098 mg L⁻¹) e ácido acético (~1.170 mg L⁻¹) em pH 5,5 e 40 °C (ensaios 13-14-15). A comunidade microbiana modificou-se com os fatores da fermentação, passando de 76,9% de *Clostridium* sp. no consórcio microbiano para a predominância de 67,8% para *Lactobacillus* sp. no ensaio 9 e 33,4% de *Lactobacillus* sp. e 22,6% de *Clostridium* sp. nos ensaios 13-14-15.

Os fatores da fermentação também alteraram as características funcionais dos reatores. Por exemplo, foi observado no ensaio 9 potencial metabólico superior para enzimas da rota do ácido láctico (como a L-lactato desidrogenase com 6%), degradação de pectina (como a pectato liase, ramnogalacturonana exoliase e ramnogalacturonana endoliase com 0,03% para cada uma delas) e enzimas associadas a fungos (como a álcool desidrogenase com 3%). Nos ensaios 13-14-15 maior número de genes funcionais para enzimas associadas com a produção de etanol (como a acetaldeído desidrogenase / álcool desidrogenase com 6,9%), ácido acético (como acetato quinase com 2,9%) e H₂ (como a piruvato-ferredoxina / flavodoxina oxidorreductase 7,4%).

Diante da necessidade de se ter no máximo 3 fatores para a aplicação de metodologias de construção de superfície de resposta, e de iniciar os estudos sobre o consumo de H_2 por homoacetogênese, avaliou-se a Hipótese 5 de “*Avaliação dos fatores da fermentação que conduzem ao consumo de H_2 por homoacetogênese*” mediante planejamento fracionado 2^{4-1} . Obteve-se também maior aproximação aos intervalos adequados para cada fator, aumentando-se a concentração dos resíduos nos reatores, e modificando-se a faixa de pH e *headspace* estudados (pH 5,5 – 7,5, *headspace* 40 – 60%, polpa e casca 3 – 9 g L^{-1} , água residuária 10 – 30 g DQO L^{-1}). Os melhores resultados foram obtidos utilizando água residuária sem diluição, portanto, este fator também foi aprimorado. Do mesmo modo, foi calculado o efeito dos fatores na via homoacetogênica, metabolismo indesejado durante a fermentação por consumir o produto de interesse (H_2). Identificou-se efeito do pH, volume de *headspace* e concentração de água residuária sobre a produção de ácido acético por homoacetogênese, observando-se a maior produção em *headspace* de 40% e água de 30 g DQO L^{-1} .

Posteriormente, aplicou-se a metodologia de desenho composto central rotacional (DCCR) para 3 fatores (pH 5,5 – 7,5, *headspace* 40 – 60% e polpa e casca 9 – 15 g L^{-1}), sendo otimizada a produção de H_2 e identificados os valores de cada fator que possibilita o aumento do P e Rm e diminuição do λ . O resultado foi o aumento do P e Rm para 244 mL H_2 e 19,8 mL $H_2 h^{-1}$, respectivamente. O λ foi maior, levando o dobro do tempo para início da fermentação (12,4 h). Sob tais condições, mesmo não otimizando todos os parâmetros da cinética de fermentação (P , Rm e λ) foi possível aumentar satisfatoriamente a obtenção de H_2 em tempo reduzido de início da fermentação. Além disso, a partir do DCCR selecionou-se a condição de maior produção de H_2 em pH inicial 7,0, *headspace* de 30% e concentração de polpa e casca de 7 g L^{-1} , a partir da qual validou-se o modelo de produção de H_2 para a obtenção de 3 L $H_2 L^{-1} d^{-1}$. Nesse caso, para a comunidade microbiana e genes funcionais do reator otimizado foi possível observar predomínio de *Clostridium* sp. (87,91%), para o qual observou-se 37 KOs associados a enzimas para a produção de H_2 que podem ter conduzido a maior produção de H_2 .

Estudou-se também a produção de ácido acético e diminuição do H_2 por homoacetogênese (Tabela 6.2). Observou-se que as condições de menor homoacetogênese com consumo de H_2

corresponderam em pH 6,5 - 7,5, *headspace* 50 - 60%, polpa e casca < 9 g L⁻¹ e água residuária 10g DQO L⁻¹, uma vez que 1299 – 2558 mg L⁻¹ de ácido acético foi observado mediante o consumo de 14 - 41 mL de H₂.

Tabela 6.2: Seleção das condições que permitem menor consumo de H₂ por homoacetogênese a partir da co-digestão de resíduos de café.

Fase experimental	Desenho experimental	Parâmetro	Resultado	pH	Headspace (%)	Polpa e casca (g L ⁻¹)	Água Residuária (g L ⁻¹)
Avaliação dos fatores da fermentação na produção de H ₂ , ácidos orgânicos e álcoois	Planejamento fracionado 2 ⁴ ₁	Produção de ácido acético	290 mg L ⁻¹	5,5	60	9	10
		Consumo de H ₂	8 mL H ₂	5,5	60	9	10
Avaliação dos fatores da fermentação no consumo de H ₂ por homoacetogênese	Desenho de composto central rotacional (DCCR)	Produção de ácido acético	1299 mg L ⁻¹	6,5	50	17,05	
		Consumo de H ₂	41 mL H ₂	7,5	60	9	
Condições selecionadas				6,5-7,5	> 60	< 9	10

Para a “Seleção das condições de fermentação para otimização da produção de H₂ e diminuição do consumo de H₂” verificou-se que ampla variedade de condições permitiu a produção de ácido acético por homoacetogênese (Seção 5.6), embora, tendo o H₂ como o produto metabólico de interesse, primou-se verificar as condições de menor síntese por via autotrófica, ou mediante consumo de H₂, correspondentes a pH 6,5 - 7,5, *headspace* > 60%, polpa e casca 9 g L⁻¹ e água residuária 10 g DQO L⁻¹. Com o intuito de realizar estudos de comunidade microbiana e identificar os microrganismos responsáveis pela homoacetogênese, estudou-se o reator com maior homoacetogênese autotrófica (correspondendo a condições de pH 5,5, *headspace* 40%, polpa e casca 15 g L⁻¹), para assim analisar as diferenças na composição da comunidade microbiana e diversidade funcional na fase de produção e consumo de H₂ que conduziram ao desenvolvimento destes metabolismos nos reatores. Concluiu-se que a comunidade microbiana modificou-se somente 25% em reatores com produção e consumo de H₂, uma vez que gêneros como *Clostridium* sp. foram importantes em ambas as condições, uma vez que gêneros semelhantes a *Clostridium* sp. foram importantes em ambas as condições, uma vez que possuem metabolismo versátil com genes funcionais para enzimas que permitem a realização de rotas de

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

produção de H_2 (como a piruvato-ferredoxina/flavodoxina oxidoredutase), homoacetogênese autotrófica (como a formiltetrahidrofolato sintetase) e heterotrófica (como a enolase), produção de n-butanol (como a 3-hidroxi-butirilo-CoA desidrogenase) e ácido propiônico (propionato CoA-transferase).

7. CONCLUSÕES

- Os principais fatores que afetaram a co-digestão de resíduos de café e a cinética de produção de H_2 foram a temperatura, pH, concentração de substratos (polpa e água residuária) e volume de *headspace*.
- As condições de temperatura de 30°C, 10% de bio-aumentação, pH 7,0, *headspace* 30% e polpa e casca 7 g L⁻¹, água residuária 30 g DQO L⁻¹ permitiram a obtenção de máxima produção de H_2 e maior aproveitamento de resíduos da indústria de café.
- Diminuição da produção de H_2 e aumento da concentração de ácido acético, após estabilização do H_2 foram observados em todos os ensaios, evidenciando metabolismo homoacetogênico durante a co-digestão de resíduos de café. Maior concentração de água residuária, menor volume de *headspace* e pH inferior a 5,5 foram favoráveis a obtenção de maior concentração de ácido acético e consumo de H_2 via homoacetogênese. No entanto, em reatores com produção de H_2 e homoacetogênese autotrófica e heterotrófica, verificou-se pouca alteração da comunidade devido a presença de bactérias como *Clostridium* sp. com capacidade de adaptação a diversidade de condições ambientais e substratos.
- As rotas metabólicas predominantes mudaram de acordo com as condições operacionais aplicadas. Metabolismo homolático e heterolático e rota do ácido propiônico predominaram nos ensaios cujo pH inicial foi 4,0 e 7,5, respectivamente. A maior produção de ácido butírico foi obtida para maior concentração de água residuária, enquanto ácido acético foi observado em todas as condições estudadas.
- Modificação na comunidade microbiana foi observada para permitir a predominância de gêneros de bactérias e fungos e genes funcionais específicos para cada rota metabólica de produção de ácido láctico, etanol, H_2 e ácido acético via homoacetogênese.
- No consórcio microbiano foram identificados genes funcionais para a degradação de lignina, fenol, celulose, hemicelulose e pectina, além de produção de H_2 , etanol, ácido acético e láctico. Algumas enzimas importantes foram identificadas, tais como, a desidrogenase de álcool arílico, beta e alfa galactosidase, pectato liase, ferredoxina desidrogenase, acetato quinase, álcool desidrogenase e L e D-lactato desidrogenase.

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

- Consórcio microbiano com microrganismos semelhantes a *Lactobacillus* sp., *Kazachstania* sp. e *Saccharomyces* sp. foram observados nas condições de fermentação de pH 4,0 e 30 °C. Verificou-se neste ensaio genes funcionais para enzimas como a L e D-lactato desidrogenase relacionadas com a formação de ácido láctico. Nestas condições também foram identificados genes relacionados a enzimas de degradação da pectina, como são a pectato liase, ramnogalacturonana exoliase e ramnogalacturonana.
- O pH alterou a produção de H₂, ácido acético e crescimento de biomassa, observando-se maior produção de H₂ em pH entre 5,5 e 7,5.
- O aumento da temperatura de 30 °C para 50 °C diminuiu a produção de H₂ e ácido acético, além do consumo de carboidratos, portanto, temperatura mesofílica (30 °C) é recomendável para a co-digestão de resíduos de café.
- Maior concentração de substrato permitiu maior produção de H₂, consumo de carboidratos e síntese de ácido butírico. No entanto, a natureza do substrato afetou a fermentação, uma vez que a insolubilidade do resíduo de polpa e casca limitou maior aproveitamento do mesmo.
- Maior produção de H₂ pode ser alcançada em condição de ausência de extrato de levedura ou agitação, e a partir da microbiota autóctone dos resíduos de água residuária e polpa de café.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Rahman, M., Tashiro, Y., Sonomoto, K., 2013. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnol. Adv.* 31, 877–902. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.002>
- Abreu, A.A., Danko, A.S., Costa, J.C., Ferreira, E.C., Alves, M.M., 2009. Inoculum type response to different pHs on biohydrogen production from L-arabinose, a component of hemicellulosic biopolymers. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 1744–1751. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.12.020>
- Abu Tayeh, H., Levy-Shalev, O., Azaizeh, H., Dosoretz, C.G., 2016a. Subcritical hydrothermal pretreatment of olive mill solid waste for biofuel production. *Bioresour. Technol.* 199, 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.138>
- Abu Tayeh, H., Levy-Shalev, O., Azaizeh, H., Dosoretz, C.G., 2016b. Subcritical hydrothermal pretreatment of olive mill solid waste for biofuel production. *Bioresour. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.138>
- Aburaya, S., Esaka, K., Morisaka, H., Kuroda, K., Ueda, M., 2015. Elucidation of the recognition mechanisms for hemicellulose and pectin in *Clostridium cellulovorans* using intracellular quantitative proteome analysis. *AMB Express* 1, 29. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0115-6>
- Ahmad, F., Silva, E.L., Varesche, A.M.B., 2018a. Hydrothermal processing of biomass for anaerobic digestion – A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 98, 108–124. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.09.008>
- Ahmad, F., Skamoto, I., Maria, S., Adorno, A., Montteran, F., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2018b. Methane Production from Hydrogen Peroxide Assisted Hydrothermal Pretreatment of Solid Fraction Sugarcane Bagasse. *Waste and Biomass Valorization* 1–20. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0452-1>
- Ahring, B.K., Biswas, R., Ahamed, A., Teller, P.J., Uellendahl, H., 2015. Making lignin accessible for anaerobic digestion by wet-explosion pretreatment. *Bioresour. Technol.* 175, 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.082>
- Angenent, L.T., Karim, K., Al-dahhan, M.H., Wrenn, B.A., Domí, R., 2004. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends Biotechnol.* 22. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.07.001>
- Antonopoulou, G., Gavala, H.N., Skiadas, I. V., 2011. Modeling of fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract based on modified ADM1. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 191–208. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.09.081>
- Antonopoulou, G., Vayenas, D., Lyberatos, G., 2016. Ethanol and hydrogen production from sunflower straw : The effect of pretreatment on the whole slurry fermentation. *Biochem. Eng. J.* 116, 65–74.
- Anzola-Rojas, M., Da Fonseca, S.G., Da Silva, C.C., De Oliveira, V.M., Zaiat, M., 2015. The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. *Biotechnol. Reports* 5, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.10.010>
- Anzola-Rojas, M. del P., Zaiat, M., 2015. A novel anaerobic down-flow structured-bed reactor for long-term stable H₂ energy production from wastewater. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/jctb.4754>
- APHA/AWWA/WEF, 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater, 22nd ed, Études Rabelaisiennes. <https://doi.org/10.1021/ed076p1069.2>
- Arooj, M.F., Han, S.K., Kim, S.H., Kim, D.H., Shin, H.S., 2008. Continuous biohydrogen production in a CSTR using starch as a substrate. *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 3289–3294. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.04.022>

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

- Baêta, B.E.L., Cordeiro, P.H. de M., Passos, F., Gurgel, L.V.A., de Aquino, S.F., Fdz-Polanco, F., 2017a. Steam explosion pretreatment improved the biomethanization of coffee husks. *Bioresour. Technol.* 245, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.110>
- Baêta, B.E.L., Cordeiro, P.H.D.M., Passos, F., Gurgel, L.V.A., De Aquino, S.F., Fdz-polanco, F., 2017b. Steam explosion pretreatment improved the biomethanization of coffee husks. *Bioresour. Technol.* 245, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.110>
- Bakonyi, P., Nemestóthy, N., Simon, V., Béafi-Bakó, K., 2014. Review on the start-up experiences of continuous fermentative hydrogen producing bioreactors. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 40, 806–813. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.08.014>
- Barca, C., Soric, A., Ranava, D., Giudici-Orticoni, M.T., Ferrasse, J.H., 2015. Anaerobic biofilm reactors for dark fermentative hydrogen production from wastewater: A review. *Bioresour. Technol.* 185, 386–398. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.063>
- Battista, F., Fino, D., Mancini, G., 2016. Optimization of biogas production from coffee production waste. *Bioresour. Technol.* 200, 884–890. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.020>
- Beckers, L., Masset, J., Hamilton, C., Delvigne, F., Toye, D., Crine, M., Thonart, P., Hiligsmann, S., 2015. Investigation of the links between mass transfer conditions, dissolved hydrogen concentration and biohydrogen production by the pure strain *Clostridium butyricum* CWBI1009. *Biochem. Eng. J.* 98, 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.01.008>
- Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N., Kumar, S., 2014. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 36, 91–106. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.047>
- Bennetzens, J.L., Hall, B.D., 1982. The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 267, 3018–3025.
- Blanchet, E.M., Duquenne, F., Raftafi, Y., Etcheverry, L., Erable, B., Bergel, A., 2015. Importance of the hydrogen route in up-scaling electrosynthesis for microbial CO₂ reduction. *Energy Environ. Sci.* 3731–3744. <https://doi.org/10.1039/C5EE03088A>
- Boboescu, I.Z., Ilie, M., Gherman, V.D., Mirel, I., Pap, B., Negrea, A., Kondorosi, É., Bíró, T., Maróti, G., 2014. Revealing the factors influencing a fermentative biohydrogen production process using industrial wastewater as fermentation substrate. *Biotechnol. Biofuels* 7, 1–15.
- Bondesson, E., 2015. A nutritional analysis on the by-product coffee husk and its potential utilization in food production.
- Bonilla, A.H., 2014. APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO SEMI-SECO DO CAFÉ PARA A PRODUÇÃO DE COMPOSTOS DE. Universidade Federal de Lavras.
- Burke, R.L., Tekamp-Olson, P., Najarian, R., 1983. The Isolation, characterization, and sequence of the pyruvate kinase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 258, 2193–2201.
- Cárdenas, E.L.M., Zapata-Zapata, A.D., Kim, D., 2019. Hydrogen production from coffee mucilage in dark fermentation with organic wastes. *Energies* 12, 1–12. <https://doi.org/10.3390/en12010071>
- Castelló, E., Braga, L., Fuentes, L., Etchebehere, C., 2018. Possible causes for the instability in the H₂ production from cheese whey in a CSTR. *Int. J. Hydrogen Energy* 43, 2654–2665. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.12.104>
- Cazier, E.A., Trably, E., Steyer, J.P., Escudie, R., 2015. Biomass hydrolysis inhibition at high hydrogen partial

- pressure in solid-state anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 190, 106–113.
- Chapleur, O., Civade, R., Hoyos, C., Mazeas, L., Bouchez, T., 2013. Growing concentrations of phenol increasingly modify microbial communities dynamics and performances stability of anaerobic digesters, in: 13th World Congress on Anaerobic Digestion: Recovering (Bio) Ressources for the World. p. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01118701>.
- Chen, C.C., Chuang, Y.S., Lin, C.Y., Lay, C.H., Sen, B., 2012. Thermophilic dark fermentation of untreated rice straw using mixed cultures for hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 15540–15546. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.036>
- Cheng, C.L., Lo, Y.C., Lee, K.S., Lee, D.J., Lin, C.Y., Chang, J.S., 2011a. Biohydrogen production from lignocellulosic feedstock. *Bioresour. Technol.* 102, 8514–8523. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.059>
- Cheng, C.L., Lo, Y.C., Lee, K.S., Lee, D.J., Lin, C.Y., Chang, J.S., 2011b. Biohydrogen production from lignocellulosic feedstock. *Bioresour. Technol.* 102, 8514–8523. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.059>
- Chiyanzy, I., Brienzo, M., Garc, M., Agudelo, R., 2014. Spent coffee ground mass solubilisation by steam explosion and enzymatic hydrolysis and Johann G organs. <https://doi.org/10.1002/jctb.4313>
- Chojnacka, A., Błaszczyk, M.K., Szczesny, P., Nowak, K., Sumińska, M., Tomczyk-Zak, K., Zielenkiewicz, U., Sikora, A., 2011. Comparative analysis of hydrogen-producing bacterial biofilms and granular sludge formed in continuous cultures of fermentative bacteria. *Bioresour. Technol.* 102, 10057–10064. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.063>
- Chun-Min, L., Shu-Yii, W., 2016. From biomass waste to biofuels and biomaterial building blocks. *Renew. Energy* 96, 1056–1062. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.12.059>
- Ciranna, A., Pawar, S.S., Santala, V., Karp, M., Niel, E.W.J. Van, 2014. Assessment of metabolic flux distribution in the thermophilic hydrogen producer *Caloramator celer* as affected by external pH and hydrogen partial pressure. *Microb. Cell Fact.* 13, 1–15.
- Clark, I.C., Zhang, R.H., Upadhyaya, S.K., 2012. The effect of low pressure and mixing on biological hydrogen production via anaerobic fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 11504–11513. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.03.154>
- Cooper, S.J., Leonard, G.A., Mcsweeney, S.M., Thompson, A.W., Naismith, J.H., Qamar, S., Plater, A., Berry, A., Hunter, W.N., 1996. The crystal structure of a class II fructose-1, 6-bisphosphate aldolase shows a novel binuclear metal-binding active site embedded in a familiar fold. *Structure* 4, 1303–1315.
- Corona, M.V., Razo-Flores, E., 2018. Continuous hydrogen and methane production from Agave tequilana bagasse hydrolysate by sequential process to maximize energy recovery efficiency. *Bioresour. Technol.* 249, 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.032>
- Dashtban, M., Schraft, H., Qin, W., 2009. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; Opportunities & perspectives. *Int. J. Biol. Sci.* 5, 578–595. <https://doi.org/10.7150/ijbs.5.578>
- Datar, R., Huang, J., Maness, P.C., Mohagheghi, A., Czernik, S., Chornet, E., 2007. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process. *Int. J. Hydrogen Energy* 32, 932–939. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.09.027>
- De Bruyn, F., Zhang, S.J., Pothakos, V., Torres, J., Lambot, C., Moroni, A. V., Callanan, M., Sybesma, W., Weckx, S., De Vuyst, L., 2017. crossm Exploring the Impacts of Postharvest Processing on the Microbiota and. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, 1–16.
- de Carvalho, D.P., Vinícius, G., Soccol, C.R., 2018. High-Throughput rRNA Gene Sequencing Reveals High and Complex Bacterial Diversity Associated with Brazilian Coffee Bean Fermentation. *Food Technol. Biotechnol.* 56, 90–95. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5441>

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

- de Carvalho Neto, D.P., Pereira, G.V. de M., Tanobe, V.O.A., Soccol, V.T., da Silva, B.J.G., Rodrigues, C., Soccol, C.R., 2017. Yeast diversity and physicochemical characteristics associated with coffee bean fermentation from the brazilian cerrado mineiro region. *Fermentation* 3, 1–11. <https://doi.org/10.3390/fermentation3010011>
- de Gonzalo, G., Colpa, D.I., Habib, M.H.M., Fraaije, M.W., 2016. Bacterial enzymes involved in lignin degradation. *J. Biotechnol.* 236, 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.08.011>
- de Sá, L.R.V., Cammarota, M.C., Ferreira-Leitão, V.S., 2014. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia – Aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. *Quim. Nova* 37, 857–867. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140138>
- Dehning, I., Stieb, M., Schink, B., 1989. *Sporomusa malonica* sp. nov., a homoacetogenic bacterium growing by decarboxylation of malonate or succinate. *Arch. Microbiol.* 151, 421–426.
- Demirel, B., Scherer, P., 2008. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane : a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 7, 173–190. <https://doi.org/10.1007/s11157-008-9131-1>
- Diekert, G., Wohlfarth, G., 1994. Metabolism of homoacetogens. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66, 209–221.
- Dinamarca, C., Bakke, R., 2009. Apparent hydrogen consumption in acid reactors: observations and implications. *Water Sci. Technol.* 59, 1441–1447. <https://doi.org/10.2166/wst.2009.135>
- Dionisi, D., Silva, I.M.O., 2016. Production of ethanol, organic acids and hydrogen: an opportunity for mixed culture biotechnology? *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 15, 213–242. <https://doi.org/10.1007/s11157-016-9393-y>
- dos Santos, L.C., Adarme, O.F.H., Baêta, B.E.L., Gurgel, L.V.A., Aquino, S.F. de, 2018. Production of biogas (methane and hydrogen) from anaerobic digestion of hemicellulosic hydrolysate generated in the oxidative pretreatment of coffee husks. *Bioresour. Technol.* 263, 601–612. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.037>
- Duarte, G.S., Pereira, A.A., Farah, A., 2010. Chlorogenic acids and other relevant compounds in Brazilian coffees processed by semi-dry and wet post-harvesting methods. *Food Chem.* 118, 851–855. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.042>
- Edwards, S.R., Braley, R., Cha, W.L., 1999. Enolase is present in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 177, 211–216.
- Eida, M.F., Nagaoka, T., Wasaki, J., Kouno, K., 2011. Evaluation of Cellulolytic and Hemicellulolytic Abilities of Fungi Isolated from Coffee Residue and Sawdust Composts. *Microbes Environ.* 26, 220–227. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME10210>
- Feng, X., Dong, H., Yang, P., Yang, R., Lu, J., Lv, J., Sheng, J., 2016. Culture-Dependent and -Independent Methods to Investigate the Predominant Microorganisms Associated with Wet Processed Coffee. *Curr. Microbiol.* 73, 190–195. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1047-3>
- Ferry, J.G., 1990. Formate dehydrogenase. *FEMS Microbiol. Rev.* 87, 377–382.
- Ge, X., Xu, F., Li, Y., 2016. Solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass: Recent progress and perspectives. *Bioresour. Technol.* 205, 239–249. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.050>
- Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M., 2013. *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation : A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiol.* 33, 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.004>

- Göbner, A.S., Picardal, F., Tanner, R.S., Drake, H.L., 2008. Carbon metabolism of the moderately acid-tolerant acetogen *Clostridium drakei* isolated from peat. *FEMS Microbiol. Lett.* 287, 236–242.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01313.x>
- Gómez, X., Fernández, C., Fierro, J., Sánchez, M.E., Escapa, A., Morán, A., 2011. Hydrogen production: Two stage processes for waste degradation. *Bioresour. Technol.* 102, 8621–8627.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.055>
- Gonçalves, M.R., Costa, J.C., Pereira, M.A., Abreu, A.A., Alves, M.M., 2014. On the independence of hydrogen production from methanogenic suppressor in olive mill wastewater. *Int. J. Hydrogen Energy* 39, 6402–6406.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.02.056>
- González, L.M.L., Reyes, I.P., Dewulf, J., Budde, J., Heiermann, M., Vervaeren, H., 2014. Effect of liquid hot water pre-treatment on sugarcane press mud methane yield. *Bioresour. Technol.* 169, 284–290.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.107>
- Gouvea, B.M., Torres, C., Franca, A.S., Oliveira, L.S., Oliveira, E.S., 2009. Feasibility of ethanol production from coffee husks. *Biotechnol. Lett.* 31, 1315–1319. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0023-4>
- Hallenbeck, P.C., 2009. Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 7379–7389. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.12.080>
- Hallenbeck, P.C., Benemann, J.R., 2002. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *Int. J. Hydrogen Energy* 27, 1185–1193.
- Hallenbeck, P.C., Ghosh, D., 2009. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends Biotechnol.* 27, 287–297. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.02.004>
- Hamdouche, Y., Christophe, J., Nad, D., Teyssier, C., Montet, D., 2016. Discrimination of post-harvest coffee processing methods by microbial ecology analyses 65, 112–120.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.01.022>
- Hawkes, F.R., Dinsdale, R., Hawkes, D.L., Hussy, I., 2002. Sustainable fermentative hydrogen production : challenges for process optimisation 27, 1339–1347.
- Heider, J., Georg, F., 1997. Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Eur. J. Biochem.* 243, 577–596.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00577.x>
- Hernández, M.A., Rodríguez, M., Andres, Y., 2014. Use of coffee mucilage as a new substrate for hydrogen production in anaerobic co-digestion with swine manure. *Bioresour. Technol.* 168, 112–118.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.101>
- Hittinger, C.T., Steele, J.L., Ryder, D.S., 2018. Diverse yeast for diverse fermented beverages and foods. *Curr. Opin. Biotechnol.* 49, 199–206.
- Holzappel, W.H., Wood, B.J.B., 1995. The Genera of Lactic Acid Bacteria. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5817-0>
- Hung, C.H., Chang, Y.T., Chang, Y.J., 2011. Roles of microorganisms other than *Clostridium* and *Enterobacter* in anaerobic fermentative biohydrogen production systems - A review. *Bioresour. Technol.* 102, 8437–8444.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.084>
- Islam, R., Sparling, R., Cicek, N., Levin, D.B., 2015. Optimization of influential nutrients during direct cellulose fermentation into hydrogen by *Clostridium thermocellum*. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 3116–3132.
<https://doi.org/10.3390/ijms16023116>
- Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S., Ribéreau-Gayon, P., 1984. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of bordeaux wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 153–156.

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

- Juliastuti, S.R., Widjaja, T., Altway, A., Iswanto, T., 2017. Biogas production from pretreated coffee-pulp waste by mixture of cow dung and rumen fluid in co-digestion. AIP Conf. Proc. 1840. <https://doi.org/10.1063/1.4982341>
- Jung, K.W., Kim, D.H., Kim, S.H., Shin, H.S., 2011a. Bioreactor design for continuous dark fermentative hydrogen production. Bioresour. Technol. 102, 8612–8620. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.056>
- Jung, K.W., Kim, D.H., Lee, M.Y., Shin, H.S., 2012. Two-stage UASB reactor converting coffee drink manufacturing wastewater to hydrogen and methane. Int. J. Hydrogen Energy 37, 7473–7481. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.150>
- Jung, K.W., Kim, D.H., Shin, H.S., 2011b. A simple method to reduce the start-up period in a H₂-producing UASB reactor. Int. J. Hydrogen Energy 36, 1466–1473. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.09.095>
- Jung, K.W., Kim, D.H., Shin, H.S., 2010. Continuous fermentative hydrogen production from coffee drink manufacturing wastewater by applying UASB reactor. Int. J. Hydrogen Energy 35, 13370–13378. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.11.120>
- Karadag, D., Puhakka, J.A., 2010. Effect of changing temperature on anaerobic hydrogen production and microbial community composition in an open-mixed culture bioreactor. Int. J. Hydrogen Energy 35, 10954–10959. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.07.070>
- Kaur, S., Yawar, M., Kumar, P.A., Suresh, K., 2014. Hungatella effluvii gen. nov., sp. nov., an obligately anaerobic bacterium isolated from an effluent treatment plant, and reclassification of Clostridium hathewayi as Hungatella hathewayi gen. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 710–718. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.056986-0>
- Khanal, S.K., Chen, W., Li, L., Sung, S., 2004. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. Int. J. Hydrog. Energy 29 29, 1123–1131. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2003.11.002>
- Ko, J.K., Um, Y., Park, Y.C., Seo, J.H., Kim, K.H., 2015. Compounds inhibiting the bioconversion of hydrothermally pretreated lignocellulose. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99, 4201–4212. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6595-0>
- Kotsopoulos, T. a., Fotidis, I. a., Tsolakis, N., Martzopoulos, G.G., 2009. Biohydrogen production from pig slurry in a CSTR reactor system with mixed cultures under hyper-thermophilic temperature (70 °C). Biomass and Bioenergy 33, 1168–1174. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.05.001>
- Kraemer, J.T., Bagley, D.M., 2007. Improving the yield from fermentative hydrogen production. Biotechnol. Lett. 29, 685–695. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9299-9>
- Kulandaivelu, V., Bhat, R., 2012. Changes in the physico-chemical and biological quality attributes of soil following amendment with untreated coffee processing wastewater. Eur. J. Soil Biol. 50, 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2011.11.011>
- Kumar, G., Bakonyi, P., Kobayashi, T., Xu, K.Q., Sivagurunathan, P., Kim, S.H., Buitrón, G., Nemestóthy, N., Bélafi-Bakó, K., 2016. Enhancement of biofuel production via microbial augmentation: The case of dark fermentative hydrogen. Renew. Sustain. Energy Rev. 57, 879–891. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.107>
- Kumar, G., Bakonyi, P., Periyasamy, S., Kim, S.H., Nemestóthy, N., Béla, K., 2015. Lignocellulose biohydrogen: Practical challenges and recent progress. Renew. Sustain. Energy Rev. 44, 728–737.
- Laser, M., 2002. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. Fuel Energy Abstr. 43, 243–244. [https://doi.org/10.1016/S0140-6701\(02\)86136-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6701(02)86136-7)
- Latif, H., Zeidan, A.A., Nielsen, A.T., Zengler, K., 2013. Trash to treasure : production of biofuels and commodity chemicals via syngas fermenting microorganisms. Curr. Opin. Biotechnol. 27, 79–89.

<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2013.12.001>

Latif, M.A., Ghufuran, R., Wahid, Z.A., Ahmad, A., 2011. Integrated application of upflow anaerobic sludge blanket reactor for the treatment of wastewaters. *Water Res.* 45, 4683–4699.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.05.049>

Lea, A.G.H., Piggott, J.R., 2003. Fermented beverage production, 2nd ed. [https://doi.org/DOI 10.1007/978-1-4615-0187-9](https://doi.org/DOI%2010.1007/978-1-4615-0187-9)

Leal, N.A., Havemann, G.D., Bobik, T.A., 2003. PduP is a coenzyme-a-acylating propionaldehyde dehydrogenase associated with the polyhedral bodies involved in B12-dependent 1,2-propanediol degradation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Arch. Microbiol.* 180, 353–361. <https://doi.org/10.1007/s00203-003-0601-0>

Lee, H.S., Vermaas, W.F.J., Rittmann, B.E., 2010. Biological hydrogen production: Prospects and challenges. *Trends Biotechnol.* 28, 262–271. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.01.007>

Lee, M.J., Zinder, S.H., 1988. Carbon monoxide pathway enzyme activities in a thermophilic anaerobic bacterium grown acetogenically and in a syntrophic acetate-oxidizing coculture. *Arch. Microbiol.* 150, 513–518.

Li, J., Yuan, H., Yang, J., 2009. Bacteria and lignin degradation. *Front. Biol. China* 4, 29–38.
<https://doi.org/10.1007/s11515-008-0097-8>

Li, J., Zheng, G., He, J., Chang, S., Qin, Z., 2009. Hydrogen-producing capability of anaerobic activated sludge in three types of fermentations in a continuous stirred-tank reactor. *Biotechnol. Adv.* 27, 573–577.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.007>

Li, Y., Park, S.Y., Zhu, J., 2011. Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 15, 821–826. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.07.042>

Lin, C.Y., Lay, C.H., Sen, B., Chu, C.Y., Kumar, G., Chen, C.C., Chang, J.S., 2012. Fermentative hydrogen production from wastewaters: A review and prognosis. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 15632–15642.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.02.072>

Liu, Y., Wang, Y., 2017. Directional enhancement of fermentative coproduction of hydrogen and acetic acid from glucose via control of headspace pressure. *Int. J. Hydrogen Energy* 42, 4095–4101.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.09.083>

Londero, A., Hamet, M.F., De Antoni, G.L., Garrote, G.L., Abraham, A.G., 2012. Kefir grains as a starter for whey fermentation at different temperatures: Chemical and microbiological characterisation. *J. Dairy Res.* 79, 262–271. <https://doi.org/10.1017/S0022029912000179>

Luo, G., Karakashev, D., Xie, L., Zhou, Q., Angelidaki, I., 2011. Long-term effect of inoculum pretreatment on fermentative hydrogen production by repeated batch cultivations: Homoacetogenesis and methanogenesis as competitors to hydrogen production. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 1816–1827. <https://doi.org/10.1002/bit.23122>

Lynd, L.R., Weimer, P.J., Zyl, W.H. Van, Pretorius, I.S., 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 506–577. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506>

Magalhães, K.T., Pereira, G.V. de M., Campos, C.R., Dragone, G., Schwan, R.F., 2011. Brazilian kefir: Structure, microbial communities and chemical composition. *Brazilian J. Microbiol.* 42, 693–702.
<https://doi.org/dx.doi.org/10.1590/S1517-83822011000200034>

Malgas, S., Dyk, J.S. Van, Pletschke, B.I., 2015. A review of the enzymatic hydrolysis of mannans and synergistic interactions between β -mannanase, β -mannosidase and α -galactosidase 1167–1175.
<https://doi.org/10.1007/s11274-015-1878-2>

Mandic-Mulec, I., Stefanic, P., Elsas, J.D. Van, 2016. Ecology of Bacillaceae, in: *The Bacterial Spore: From*

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

- Molecules to Systems. pp. 59–85. <https://doi.org/10.1128/9781555819323>
- Mariakakis, I., Bischoff, P., Krampe, J., Meyer, C., Steinmetz, H., 2011. Effect of organic loading rate and solids retention time on microbial population during bio-hydrogen production by dark fermentation in large lab-scale. *Int. J. Hydrogen Energy* 36, 10690–10700. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.06.008>
- Marone, A., Massini, G., Patriarca, C., Signorini, A., Varrone, C., Izzo, G., 2012. Hydrogen production from vegetable waste by bioaugmentation of indigenous fermentative communities 7. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.12.159>
- Marsh, A.J., Hill, C., Ross, R.P., Cotter, P.D., 2014. Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. *Trends Food Sci. Technol.* 38, 113–124. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.05.002>
- Martinez, F.A.C., Balciunas, E.M., Salgado, J.M., González, J.M.D., Converti, A., de Souza Oliveira, R.P., 2013. Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 30, 70–83. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.11.007>
- Mata-Alvarez, J., Dosta, J., Macé, S., Astals, S., 2011. Codigestion of solid wastes: A review of its uses and perspectives including modeling. *Crit. Rev. Biotechnol.* 31, 99–111. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.525496>
- Menezes, E.G.T., do Carmo, J.R., Alves, J.G.L.F., Menezes, A.G.T., Guimarães, I.C., Queiroz, F., Pimenta, C.J., 2014. Optimization of alkaline pretreatment of coffee pulp for production of bioethanol. *Biotechnol. Prog.* 30, 451–462. <https://doi.org/10.1002/btpr.1856>
- Modestra, J.A., Navaneeth, B., Mohan, S.V., 2015. Bio-electrocatalytic reduction of CO₂: Enrichment of homoacetogens and pH optimization towards enhancement of carboxylic acids biosynthesis (J. CO₂ Util. (2015) 10 (78-87) DOI: 10.1016/j.jcou.2015.04.001). *J. CO₂ Util.* 10, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2015.05.001>
- Monlau, F., Sambusiti, C., Barakat, A., Quéméneur, M., Trably, E., Steyer, J.P., Carrère, H., 2014. Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* 32, 934–951. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.007>
- Muheim, A., Waldner, R., Sanglard, D., Reiser, J., Letsola, M.S.A., 1991. Purification and properties of an aryl-alcohol dehydrogenase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Eur. J. Biochem.* 375, 369–375.
- Muri, P., Osojnik-Črnivec, I.G., Djinović, P., Pintar, A., 2016. Biohydrogen Production from Simple Carbohydrates with Optimization of Operating Parameters. *Acta Chim. Slov.* 63, 164–154. <https://doi.org/10.17344/acsi.2015.2085>
- Murthy, P.S., Madhava Naidu, M., 2012. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition - A review. *Resour. Conserv. Recycl.* 66, 45–58. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2012.06.005>
- Mussatto, S.I., 2014. Generating Biomedical Polyphenolic Compounds from Spent Coffee or Silverskin, Coffee in Health and Disease Prevention. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00011-5>
- Nagpal, R., Puniya, A.K., Angad, G., Veterinary, D., Griffith, G.W., 2009. Anaerobic rumen fungi: Potential and applications.
- Najafpoor, A.A., Sadeghi, A., Alidadi, H., Davoudi, M., Mohebrad, B., Hosseinzadeh, A., Jafarpour, S., Zarei, A., 2015. Biodegradation of high concentrations of phenol by baker's yeast in anaerobic sequencing batch reactor. *Environ. Heal. Eng. Manag. J.* 2, 79–86. <https://doi.org/https://ssrn.com/abstract=2662794>

- Narvhus, J.A., Gadaga, T.H., 2003. The role of interaction between yeasts and lactic acid bacteria in African fermented milks: A review. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 51–60. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00247-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00247-2)
- Nath, K., Das, D., 2011. Modeling and optimization of fermentative hydrogen production. *Bioresour. Technol.* 102, 8569–8581. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.108>
- Nguyen, A.D., Tran, T.D., Vo, T.P.K., 2013. Evaluation of Coffee Husk Compost for Improving Soil Fertility and Sustainable Coffee Production in Rural Central Highland of Vietnam. *Resour. Environ.* 3(4), 77–82. <https://doi.org/10.5923/j.re.20130304.03>
- Ni, B.J., Liu, H., Nie, Y.Q., Zeng, R.J., Du, G.C., Chen, J., Yu, H.Q., 2011. Coupling glucose fermentation and homoacetogenesis for elevated acetate production: Experimental and mathematical approaches. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 345–353. <https://doi.org/10.1002/bit.22908>
- Nissilä, M.E., Lay, C.H., Puhakka, J.A., 2014. Dark fermentative hydrogen production from lignocellulosic hydrolyzates - A review. *Biomass and Bioenergy* 67, 145–159. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.04.035>
- Noike, T., Takabatake, H., Mizuno, O., Ohba, M., 2002. Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. *Int. J. Hydrogen Energy* 27, 1367–1371. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00120-9](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00120-9)
- Ntaikou, I., Antonopoulou, G., Lyberatos, G., 2010. Biohydrogen Production from Biomass and Wastes via Dark Fermentation : A Review. *Waste and Biomass Valorization* 1, 21–39. <https://doi.org/10.1007/s12649-009-9001-2>
- Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Bernet, N., Trably, E., 2017. Dark-fermentative biohydrogen pathways and microbial networks in continuous stirred tank reactors: Novel insights on their control. *Appl. Energy* 198, 77–87.
- Parameswaran, P., Torres, C.I., Kang, D.W., Rittmann, B.E., Krajmalnik-Brown, R., 2012. The role of homoacetogenic bacteria as efficient hydrogen scavengers in microbial electrochemical cells (MXCs). *Water Sci. Technol.* 65, 1–6. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.519>
- Park, J., Kim, D., Kim, S., Yoon, J., Park, H., 2018. Effect of substrate concentration on the competition between *Clostridium* and *Lactobacillus* during biohydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 43, 11460–11469. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.08.150>
- Park, W., Hyun, S.H., Oh, S.-E., Logan, B.E., Kim, I.S., 2005. Removal of headspace CO₂ increases biological hydrogen production. *Environ. Sci. Technol.* 39, 4416–4420. <https://doi.org/10.1021/es048569d>
- Passos, F., Henrique, P., Cordeiro, M., Eduardo, B., Baeta, L., Francisco, S., Aquino, D., Perez-elvira, S.I., 2018. Anaerobic co-digestion of coffee husks and microalgal biomass after thermal hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 253, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.071>
- Penteado, E.D., Lazaro, C.Z., Sakamoto, I.K., Zaiat, M., 2013. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. *Int. J. Hydrogen Energy* 38, 6137–6145. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.01.067>
- Pinto, M.P.M., Mudhoo, A., Neves, T.D.A., Berni, M.D., 2018. Co – digestion of coffee residues and sugarcane vinasse for biohythane generation. *J. Environ. Chem. Eng.* 6, 146–155. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.11.064>
- Plackett, A.R.L., Burman, J.P., 1946. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika* 33, 305–325.
- Pronk, J., Steensma, H.Y., van Dijken, J.P., 1996. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12, 1607–1633. [https://doi.org/10.1002/\(Sici\)1097-0061\(199612\)12:16<1607::Aid-Yea70>3.0.Co;2-4](https://doi.org/10.1002/(Sici)1097-0061(199612)12:16<1607::Aid-Yea70>3.0.Co;2-4)
- Quéméneur, M., Hamelin, J., Barakat, A., Steyer, J.P., Carrère, H., Trably, E., 2012a. Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures. *Int. J. Hydrogen Energy* 37,

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

- 3150–3159. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.11.033>
- Quéméneur, M., Hamelin, J., Barakat, A., Steyer, J.P., Carrre, H., Trably, E., 2012b. Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 3150–3159. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.11.033>
- Rabelo, C.A.B.S., Soares, L.A., Sakamoto, I.K., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2018. Optimization of hydrogen and organic acids productions with autochthonous and allochthonous bacteria from sugarcane bagasse in batch reactors. *J. Environ. Manage.* 223, 952–963. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.07.015>
- Rago, L., Ruiz, Y., Baeza, J. a., Guisasola, A., Cortés, P., 2015. Microbial community analysis in a long-term membrane-less microbial electrolysis cell with hydrogen and methane production. *Bioelectrochemistry* 106, 359–368. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2015.06.003>
- Rattan, S., Parande, a. K., Nagaraju, V.D., Ghiwari, G.K., 2015. A comprehensive review on utilization of wastewater from coffee processing. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 6461–6472. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4079-5>
- Ratti, R.P., Botta, L.S., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., 2013. Microbial diversity of hydrogen-producing bacteria in batch reactors fed with cellulose using leachate as inoculum. *Int. J. Hydrogen Energy* 38, 9707–9717. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.05.089>
- Ren, N., Wang, A., Cao, G., Xu, J., Gao, L., 2009. Bioconversion of lignocellulosic biomass to hydrogen: Potential and challenges. *Biotechnol. Adv.* 27, 1051–1060. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.05.007>
- Ri, P., Ren, N., Ding, J., Kim, J., Guo, W., 2017. CFD optimization of horizontal continuous stirred-tank (HCSTR) reactor for bio-hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 42, 9630–9640.
- Rojas-Sossa, J.P., Murillo-Roos, M., Uribe, L., Uribe-Lorio, L., Marsh, T., Larsen, N., Chen, R., Miranda, A., Solís, K., Rodriguez, W., Kirk, D., Liao, W., 2017. Effects of coffee processing residues on anaerobic microorganisms and corresponding digestion performance. *Bioresour. Technol.* 245, 714–723. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.098>
- Rosa, P.R.F., Gomes, B.C., Varesche, M.B.A., Silva, E.L., 2016. Characterization and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermentative bioreactors during hydrogen production using cassava processing wastewater. *Chem. Eng. J.* 284, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.08.088>
- Rosales-Colunga, L.M., De León Rodríguez, A., 2014. Escherichia coli and its application to biohydrogen production. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 14, 123–135. <https://doi.org/10.1007/s11157-014-9354-2>
- Rossmann, M., de Matos, A.T., Abreu, E.C., e Silva, F.F., Borges, A.C., 2012. Performance of constructed wetlands in the treatment of aerated coffee processing wastewater: Removal of nutrients and phenolic compounds. *Ecol. Eng.* 49, 264–269. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.08.017>
- Rossmann, M., Matos, A.T., Abreu, E.C., Silva, F.F., Borges, A.C., 2013. Effect of influent aeration on removal of organic matter from coffee processing wastewater in constructed wetlands. *J. Environ. Manage.* 128, 912–919. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.06.045>
- Rouches, E., Herpoël-Gimbert, I., Steyer, J.P., Carrere, H., 2016. Improvement of anaerobic degradation by white-rot fungi pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 59, 179–198.
- Ruggeri, B., Tommasi, T., Sanfilippo, S., 2015. *BioH₂ & BioCH₄ Through Anaerobic Digestion*. Springer London Heidelberg New York Dordrecht, Turin, Italy.
- Ruiz, H.A., Romaní, A., Michelin, M., Jesús, F.A.G., Zanuso, E., Flores, A.A.L.-, Jasso, R.M.R.-, 2015. O PRÉ-

TRATAMENTO HIDROTÉRMICO NO CONCEITO DAS BIORREFINARIAS, in: XX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS XI SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA.

- Ryan, P., Forbes, C., Colleran, E., 2008. Investigation of the diversity of homoacetogenic bacteria in mesophilic and thermophilic anaerobic sludges using the formyltetrahydrofolate synthetase gene. *Water Sci. Technol.* 57, 675–680. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.059>
- Saady, N.M.C., 2013. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *Int. J. Hydrogen Energy* 38, 13172–13191. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.122>
- Sakar, S., Yetilmezsoy, K., Kocak, E., 2009. Anaerobic digestion technology in poultry and livestock waste treatment – a literature review. *Waste Manag. Res.* 27, 3–18. <https://doi.org/10.1177/0734242X07079060>
- Samson, S.K., Manikkandan, T.R., 2017. Optimization of microbial hydrogen production using statistical experimental design from maize stalk by isolated strain. *Iran. J. Chem. Chem. Eng.* 36, 173–181.
- Sanabria, N.R., Molina, R., Moreno, S., 2012. Development of pillared clays for wet hydrogen peroxide oxidation of phenol and its application in the posttreatment of coffee wastewater. *Int. J. Photoenergy* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/864104>
- Schink, B., Zeikus, J., 1980. Microbial Methanol Formation : A Major End Product of Pectin Metabolism. *Curr. Microbiol.* 4, 387–389.
- Selmer, T., Willanzheimer, A., Hetzel, M., 2002. Propionate CoA-transferase from *Clostridium propionicum* Cloning of the gene and identification of glutamate 324 at the active site. *Eur. J. Biochem.* 269, 372–380.
- Selvamurugan, M., Doraisamy, P., Maheswari, M., 2010. An integrated treatment system for coffee processing wastewater using anaerobic and aerobic process. *Ecol. Eng.* 36, 1686–1690. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2010.07.013>
- Selvankumar, T., Sudhakar, C., Govindaraju, M., Selvam, K., Aroulmoji, V., Sivakumar, N., Govarthanan, M., 2017. Process optimization of biogas energy production from cow dung with alkali pre-treated coffee pulp. *Biotech* 7, 254. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0884-5>
- Shanmugam, S.R., Chaganti, S.R., Lalman, J. a., Heath, D.D., 2014. Statistical optimization of conditions for minimum H₂ consumption in mixed anaerobic cultures: Effect on homoacetogenesis and methanogenesis. *Int. J. Hydrogen Energy* 39, 15433–15445. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.07.143>
- Shanmugam, S.R., Lalman, J. a., Chaganti, S.R., Heath, D.D., Lau, P.C.K., Shewa, W. a., 2016. Long term impact of stressing agents on fermentative hydrogen production: Effect on the hydrogenase flux and population diversity. *Renew. Energy* 88, 483–493. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.11.062>
- Shemekite, F., Gómez-Brandón, M., Franke-Whittle, I.H., Praehauser, B., Insam, H., Assefa, F., 2014a. Coffee husk composting: An investigation of the process using molecular and non-molecular tools. *Waste Manag.* 34, 642–652. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.11.010>
- Shemekite, F., Gómez-Brandón, M., Franke-Whittle, I.H., Praehauser, B., Insam, H., Assefa, F., 2014b. Coffee husk composting: An investigation of the process using molecular and non-molecular tools. *Waste Manag.* 34, 642–652. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.11.010>
- Show, K.Y., Lee, D.J., Chang, J.S., 2011. Bioreactor and process design for biohydrogen production. *Bioresour. Technol.* 102, 8524–8533. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.055>
- Si, B., Liu, Z., Zhang, Y., Li, J., Xing, X.-H., Li, B., Duan, N., Lu, H., 2015. Effect of reaction mode on biohydrogen production and its microbial diversity. *Int. J. Hydrogen Energy* 40. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.01.030>

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

- Siebert, I., Banks, C., 2005. The effect of volatile fatty acid additions on the anaerobic digestion of cellulose and glucose in batch reactors. *Process Biochem.* 40, 3412–3418. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.01.025>
- Sigurbjornsdottir, M.A., Orlygsson, J., 2012. Combined hydrogen and ethanol production from sugars and lignocellulosic biomass by *Thermoanaerobacterium* AK 54, isolated from hot spring. *Appl. Energy* 97, 785–791. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.11.035>
- Sikora, A., Błaszczyk, M., Jurkowski, M., Zielenkiewicz, U., 2013. Lactic acid bacteria in hydrogen-producing consortia: on purpose or by coincidence?, *Lactic Acid Bacteria-R&D for Food, Health and Livestock Purposes*. <https://doi.org/10.5772/50364>
- Sikora, A., Detman, A., Mielecki, D., 2018. Searching for Metabolic Pathways of Anaerobic Digestion : A Useful List of the Key Enzymes, in: *IntechOpen*. pp. 1–19. <https://doi.org/DOI:http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.81256>
- Sivagurunathan, P., Kumar, G., 2015. A critical review on issues and overcoming strategies for the enhancement of dark fermentative hydrogen production in continuous systems. *Int. J. Hydrog. energy* 41, 3820–3836.
- Sivagurunathan, P., Kumar, G., Bakonyi, P., Kim, S.-H., Kobayashi, T., Xu, K.Q., Lakner, G., Tóth, G., Nemestóthy, N., Bélafi-Bakó, K., 2016. A critical review on issues and overcoming strategies for the enhancement of dark fermentative hydrogen production in continuous systems. *Int. J. Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.12.081>
- Sivagurunathan, P., Kumar, G., Mudhoo, A., Rene, E.R., Dattatraya, G., Kobayashi, T., Xu, K., Kim, S., Kim, H., 2017. Fermentative hydrogen production using lignocellulose biomass : An overview of pre-treatment methods, inhibitor effects and detoxification experiences. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 77, 28–42.
- Soares, L.A., Borges Silva Rabelo, C.A., Sakamoto, I.K., Delforno, T.P., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2018. Metagenomic analysis and optimization of hydrogen production from sugarcane bagasse. *Biomass and Bioenergy* 117, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.07.018>
- Soares, L.A., Braga, J.K., Motteran, F., Sakamoto, I.K., Silva, E.L., Bernadete, M., 2017. Design and optimization of hydrogen production from hydrothermally pretreated sugarcane bagasse using response surface methodology. *Water Sci. Technol.* 76, 95–105. <https://doi.org/10.2166/wst.2017.183>
- Soni, R., Nazir, A., Chadha, B.S., 2010. Optimization of cellulase production by a versatile *Aspergillus fumigatus* fresenius strain (AMA) capable of efficient deinking and enzymatic hydrolysis of Solka floc and bagasse. *Ind. Crops Prod.* 31, 277–283. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.11.007>
- Spirito, C.M., Richter, H., Rabaey, K., Stams, A.J.M., Angenent, L.T., 2014. Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste. *Curr. Opin. Biotechnol.* 27, 115–122.
- Stams, A., 1994. Metabolic Interactions Between Anaerobic-Bacteria in Methanogenic Environments. *Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 66, 271–294. <https://doi.org/10.1007/BF00871644>
- Stim-Herndon, K.P., Petersen, D.J., Bennett, G.N., 1995. Characterization of an acetyl-CoA C-acetyltransferase (thiolase) gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Gene* 154, 81–85.
- Suárez, W.A.B., Vantini, J. da S., Duda, R.M., Giachetto, P.F., Cintra, L.C., Ferro, M.I.T., de Oliveira, R.A., 2018. Predominance of syntrophic bacteria, *Methanosaeta* and *Methanoculleus* in a two-stage up-flow anaerobic sludge blanket reactor treating coffee processing wastewater at high organic loading rate. *Bioresour. Technol.* 268, 158–168. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.091>
- Sugitha, T.C.K., Kumar, N.B.N., Ramasamy, K., Doraisamy, P., Maheswari, M., 2013. Development of anaerobic

- consortia and its invitro evaluation for biomethanation potential of coffee processing wastes. *African J. Microbiol. Res.* 7, 5137–5147. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5942>
- Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review q. *Bioresour. Technol.* 83, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
- Tai, J., Adav, S.S., Su, A., Lee, D.-J., 2010. Biological hydrogen production from phenol-containing wastewater using *Clostridium butyricum*. *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 13345–13349. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.11.111>
- Tapia-Venegas, E., Ramirez-Morales, J.E., Silva-Illanes, F., Toledo-Alarcón, J., Paillet, F., Escudie, R., Lay, C.H., Chu, C.Y., Leu, H.J., Marone, A., Lin, C.Y., Kim, D.H., Trably, E., Ruiz-Filippi, G., 2015. Biohydrogen production by dark fermentation: scaling-up and technologies integration for a sustainable system. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 14, 761–785. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9383-5>
- Temudo, M.F., Muyzer, G., Kleerebezem, R., Van Loosdrecht, M.C.M., 2008. Diversity of microbial communities in open mixed culture fermentations: Impact of the pH and carbon source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 1121–1130. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1669-x>
- Thauer, R.K., Jungermann, K., Henninger, H., Wenning, J., Decker, K., 1968. the Energy Metabolism of *Clostridium kluyveri*. *Eur. J. Biochem.* 4, 173–180. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(85\)85067-3](https://doi.org/10.1016/0009-2614(85)85067-3)
- Van Dyk, J.S., Pletschke, B.I., 2012. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes - Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol. Adv.* 30, 1458–1480. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.002>
- Vasconcelos, E.A.F., Leitão, R.C., Santaella, S.T., 2016. Factors that affect bacterial ecology in hydrogen-producing anaerobic reactors. *BioEnergy Res.* 9, 1260–1271. <https://doi.org/10.1007/s12155-016-9753-z>
- Vasconcelos, E.A.F., Leitão, R.C., Santaella, S.T., 2016. Factors that affect bacterial ecology in hydrogen-producing anaerobic reactors. *BioEnergy Res.* <https://doi.org/10.1007/s12155-016-9753-z>
- Vilela, D.M., Pereira, G.V. de M., Silva, C.F., Batista, L.R., Schwan, R.F., 2010. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). *Food Microbiol.* 27, 1128–1135. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.024>
- Villa-Montoya, A.C., Ferro, M.I.T., de Oliveira, R.A., 2016. Removal of phenols and methane production with coffee processing wastewater supplemented with phosphorous. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1007/s13762-016-1124-y>
- Waldron, K., 2010. Bioalcohol production. CRC.
- Wan, J., Jing, Y., Zhang, S., Angelidaki, I., Luo, G., 2016. Mesophilic and thermophilic alkaline fermentation of waste activated sludge for hydrogen production: Focusing on homoacetogenesis. *Water Res.* 102, 524–532. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.07.002>
- Wang, J., Liu, H., Fu, B., Xu, K., Chen, J., 2013. Trophic link between syntrophic acetogens and homoacetogens during the anaerobic acidogenic fermentation of sewage sludge. *Biochem. Eng. J.* 70, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.09.012>
- Wang, J., Wan, W., 2009. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 799–811. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.015>
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes for Phylogenetics. *PCR Protoc.* <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Woldesenbet, A.G., Woldeyes, B., Chandravanshi, B.S., 2014. Characteristics of Wet Coffee Processing Waste and Its Environmental Impact in Ethiopia. *Int. J. Res. Eng. Sci.* 2, 1–5.

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento

- Wu, W.M., Jain, M.K., Hickey, R.F., Zeikus, J.G., 1996. Perturbation of syntrophic isobutyrate and butyrate degradation with formate and hydrogen. *Biotechnol. Bioeng.* 52, 404–411. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19961105\)52:3<404::AID-BIT6>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19961105)52:3<404::AID-BIT6>3.0.CO;2-O)
- Yamada, Y., Hoshino, K., Tetsuya, I., 2017. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: The elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 1244–1251. <https://doi.org/10.1271/bbb.61.1244>
- Yan, R., Chen, J., 1990. Coenzyme A-acylating aldehyde dehydrogenase from *Clostridium beijerinckii* NRRL B592. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2591–2599.
- Yang, C., Niu, Y., Li, C., Zhu, D., Wang, W., Liu, X., Cheng, B., Ma, C., Xu, P., 2013. Characterization of a novel metagenome-derived 6-phospho-B-glucosidase from black liquor sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2121–2127. <https://doi.org/10.1128/AEM.03528-12>
- Yeh, A.I., Huang, Y.C., Chen, S.H., 2010. Effect of particle size on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose. *Carbohydr. Polym.* 79, 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.049>
- Yerushalmi, L., Volesky, B., Szczesny, T., 1985. Effect of increased hydrogen partial pressure on the acetone-butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, 103–107.
- Young, D., Dollhofer, V., Callaghan, T.M., Reitberger, S., Lebuhn, M., Benz, J.P., 2018. Isolation, identification and characterization of lignocellulolytic aerobic and anaerobic fungi in one- and two-phase biogas plants. *Bioresour. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.103>
- Yue, Z., Teater, C., Liu, Y., MacLellan, J., Liao, W., 2010. A sustainable pathway of cellulosic ethanol production integrating anaerobic digestion with biorefining. *Biotechnol. Bioeng.* 105, 1031–1039. <https://doi.org/10.1002/bit.22627>
- Yutin, N., Galperin, M.Y., 2013. A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia. *Environ. Microbiol.* 15, 2631–2641. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12173>
- Zhang, K., Cao, G.L., Ren, N.Q., 2019. Bioaugmentation with *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16 to enhance thermophilic hydrogen production using corn stover hydrolysate. *Int. J. Hydrogen Energy* 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.01.045>
- Zhou, M., Zhou, J., Tan, M., Du, J., Yan, B., Wong, J.W.C., Zhang, Y., 2017. Enhanced carboxylic acids production by decreasing hydrogen partial pressure during acidogenic fermentation of glucose. *Bioresour. Technol.* 245, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.152>
- Zhu, D., Wang, G., Qiao, H., Cai, J., 2008. Fermentative hydrogen production by the new marine *Pantoea* agglomerans isolated from the mangrove sludge 33, 6116–6123. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.008>
- Zwietering, M., Jongenburger, I., Rombouts, F., Riet, K.V., 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied Environ. Microbiol.* 56, 1875–1881.