LAÍS AMÉRICO SOARES

**BIOCONVERSÃO ANAERÓBIA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM
PRODUTOS DE VALOR BIOTECNOLÓGICO EM CONDIÇÃO TERMOFÍLICA E
MESOFÍLICA**

São Carlos

2017

LAÍS AMÉRICO SOARES

**BIOCONVERSÃO ANAERÓBIA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM
PRODUTOS DE VALOR BIOTECNOLÓGICO EM CONDIÇÃO TERMOFÍLICA E
MESOFÍLICA**

TESE DE DOUTORADO

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2017

FOLHA DE JULGAMENTO

Aos meus avós Dulce (in memoria) e Amaro.

À minha mãe, Dalva.

Às minhas tias: Ana, Cleide, Rosângela e Noemi.

Aos meus primos Gleice, Jeremyas, Glenda e Levi.

Agradecimentos

À Deus

À minha orientadora, Maria Bernadete, pela oportunidade, instruções, compartilhamento de conhecimentos, leitura e correção dos meus textos e, principalmente, pelo estímulo constante na pesquisa;

Ao professor Tininho, pela paciência, co-orientação e, principalmente pela disponibilidade em me auxiliar com a parte estatística deste trabalho, sanando minhas dúvidas, lendo meus artigos e elaborando projetos em conjunto com a professora Bernadete;

À professora Iolanda e ao professor André (UFSCar-Sorocaba) pela orientação na iniciação científica e mestrado que, com certeza, contribuiu para meu amadurecimento acadêmico;

Ao professor Paulo Seleguin e toda a equipe da Engenharia mecânica da USP pela elaboração, construção e monitoramento do reator hidrotérmico;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Processo número: 142340/2013-8) pela bolsa no início do doutorado;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP- Processo número: 2013/22346-6 e Projeto Temático número: 2009/15984-0) pelo financiamento do projeto.

Às técnicas do laboratório de processos biológicos (LPB) Isabel, Janja, Carol e Eloisa pelo auxílio nas análises;

Aos professores do LPB, Eugênio Foresti, Marcelo Zaiat, Marcia Damianovic e Wiclef pelos ensinamentos transmitidos;

À técnica da biologia Juliana Custodio pelo auxílio nas aulas práticas e pela paciência em escutar todas as minhas prévias de apresentações orais em eventos científicos;

Ao técnico de informática Fernando pelo auxílio na instalação de programas e software;

Ao Tiago Paladino, pelo auxílio com a Metagenoma e aos amigos Drica e Tiago (IQSC) pelas conversas sobre planejamento experimental;

À Camila, pela parceria científica que deu certo e por me acolher em sua família me proporcionando momentos de descontração e aprendizado constante;

À Carla, Rachael, Carol Gil, Cris, Mirabelle, Elis, Leandro, Fabrício e Lucas Fuess pela conversa boa no tão querido “cafezinho”;

A todos os colegas de laboratório, que contribuíram com a execução deste trabalho;

Meus mais sinceros agradecimentos.

“(...) Na verdade, a curiosidade ingênua que, “desarmada”, está associada ao saber do senso comum, é a mesma curiosidade que, criticizando-se, aproximando-se de forma cada vez mais metodicamente rigorosa do objeto cognoscível, se torna curiosidade epistemológica.”

Paulo Freire em Pedagogia da Autonomia

RESUMO

Soares, L.A. Bioconversão anaeróbia do bagaço de cana-de-açúcar em produtos de valor biotecnológico em condição termofílica e mesofílica. 2017. 237 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

Nessa pesquisa foram testados separadamente dois inóculos solo/compostagem e lodo termofílico de reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB) do tratamento de vinhaça em relação ao potencial de produção de compostos de valor agregado a partir do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) em reatores em batelada em condição mesofílica e termofílica, respectivamente. Pré-tratamentos térmico, ácido e diluição seriada foram aplicados ao inóculo termofílico, como tentativa de inibir as arqueias metanogênicas. A diluição seriada foi o pré-tratamento aplicado em ambos os inóculos, mesofílico e termofílico, para obtenção de consórcio de bactérias fermentadoras. Cinco meios de culturas foram testados como fonte de nutrientes para o crescimento de bactérias celulolíticas e fermentadoras. Dentre esses foi selecionado para os ensaios mesofílicos e termofílicos, o meio de cultura mais complexo suplementado com extrato de levedura. O BCA foi submetido à pré-tratamento biológico, térmico, explosão a vapor, deslignificação alcalina e hidrotérmico sendo o último utilizado nos ensaios do planejamento fatorial. O efeito das variáveis independentes de concentração de extrato de levedura e temperatura foi avaliado na produção de hidrogênio, metano e ácidos orgânicos a partir do inóculo termofílico. O efeito da concentração de extrato de levedura e substrato (BCA) foi avaliado na produção de bioprodutos a partir do inóculo mesofílico (37°C). A maior produção de hidrogênio foi de 17,30 mmol/L à 60°C e 3,42 g/L de extrato de levedura para a condição termofílica. Em relação aos ensaios mesofílicos observou-se 1,53 mmol/L com 3,42 e 5,00 g/L de extrato de levedura e BCA, respectivamente. Caracterização taxonômica e funcional dos microrganismos dos reatores de melhor desempenho de produção de hidrogênio dos planejamentos fatoriais termofílico e mesofílico foi realizada por análise Metagenômica (Illumina HiSeq). Nestas condições foram identificados microrganismos dos domínios Archaea, Bacteria, Eukarya, além de vírus. Para o domínio Bacteria foram identificados microrganismos celulolíticos e fermentadores como *Coprothermobacter* e *Clostridium*, enquanto para o domínio Archaea, foram identificadas metanogênicas hidrogenotróficas e acetoclásticas, como *Methanothermobacter* e *Methanosarcina*. Foram ainda identificados genes codificantes de enzimas catalisadoras da degradação de celulose, hemicelulose e lignina, constituintes principais da biomassa lignocelulósica utilizada como substrato, tais como celulase, carboxylesterase e 2-ácido hidroxí oxidase, respectivamente. Microrganismos aderidos no BCA *in natura* foram observados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e identificados por sequenciamento do RNAr 16S, e semelhantes a *Streptomyces*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*. Os microrganismos do lodo termofílico, solo e compostagem foram caracterizados por sequenciamento do RNAr 16S, e foram semelhantes a *Clostridium*, *Thermoanaerobacter*, *Caloramator*, *Anaerobaculum*, *Tatlockia*, *Coprothermobacter*, *Dysgonomonas*, *Coprococcus*, *Sporomusa*, *Methanobacterium*, *Methanothermobacter*, *Methanosaeta*, dentre outros.

Palavras-chave: Biomassa lignocelulósica; Hidrogênio; Metagenoma; Metano; Planejamento fatorial.

ABSTRACT

Soares, L.A. Anaerobic bioconversion of sugarcane bagasse in biotechnological products in thermophilic and mesophilic condition. 2017. 237 f. Thesis (Doctoral) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

In the present study, two inoculum (soil/compost and thermophilic sludge from upflow anaerobic sludge blanket from vinasse treatment) were separately evaluated as potential to production of value-added products from sugarcane bagasse in mesophilic and thermophilic conditions, respectively. Thermal, acid and serial dilution pretreatments were performed in the thermophilic inoculum to inhibition of methanogenic archaea. Serial dilution was applied into the mesophilic inoculum. Five culture medium were evaluated as nutritional source to enrichment of cellulolytic and fermenters bacteria; between then, the most complex one, supplemented with yeast extract was selected for the mesophilic and thermophilic bioassays. The sugarcane bagasse (SCB) was submitted to biological, thermal, steam explosion alkaline delignification and hydrothermal pretreatments, and the last one was used as substrate for the factorial designs. The effect of independent variables, such as yeast extract and temperature were evaluated on the hydrogen, methane and organic acids production from the thermophilic inoculum. The effect of yeast extract and substrate (SCB) concentrations were evaluated on the bioproducts generation from the mesophilic inoculum. The highest hydrogen production of 17.3 mmol/L was obtained at 60°C and 3.42 g/L of yeast extract, on the thermophilic factorial design. In relation to the mesophilic factorial design, obtained 1.53 mmol/L of hydrogen with 3.42 and 5.00 g/L of yeast extract and SCB, respectively. Taxonomical and functional characterizations from the microorganisms were performed in the reactors with highest hydrogen production on the factorial designs using Metagenomics analysis (Illumina HiSeq). In both condition, mesophilic and thermophilic were found microorganisms from Archaea, Bacteria, Eukarya domain, besides Viruses. Concerning the Bacteria domain were found cellulolytic and fermenters microorganisms similar to *Coprothermobacter* and *Clostridium*, whiles for Archaea domain were identified hydrogenotrophic and acetoclastic methanogenic similar to *Methanothermobacter* and *Methanosarcina*. There were obtained genes coding to enzymes related to the cellulose, hemicellulose and lignin degradation such as carboxylesterase e 2 –acid-hydroxioxidase, respectively. Microorganisms adhered into the *in natura* SCB fiber were observed by scanning electronic microscopy (SEM) and identified by 16 S rRNA sequencing, mainly as similar to *Streptomyces*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*. The microorganisms from the thermophilic sludge, soil and composting were also characterized by 16S RNAr sequencing and were similar to *Clostridium*, *Thermoanaerobacter*, *Caloramator*, *Anaerobaculum*, *Tatlockia*, *Coprothermobacter*, *Dysgonomonas*, *Coprococcus*, *Sporomusa*, *Methanobacterium*, *Methanothermobacter*, *Methanosaeta*, among others.

Keywords: Hydrogen; Factorial design; Lignocellulosic Biomass; Metagenomic analysis; Methane.

Lista de Ilustrações

Figura 2-1: Composição da biomassa lignocelulósica (Fonte: MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006).....	35
Figura 2-2: Estrutura química da celulose (Fonte: MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006). ..	35
Figura 2-3: Principais componentes da hemicelulose (Fonte: MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006).....	36
Figura 2-4: Potenciais aplicações da biomassa lignocelulósica pré-tratada (Fonte: BEHERA et al., 2014).....	36
Figura 2-5: Esquema do efeito que os pré-tratamentos exercem na biomassa lignocelulósica (Fonte: MOSIER et al., 2005).	37
Figura 2-6: Esquema da degradação dos componentes da biomassa lignocelulósica	39
Figura 4-1:Esquema operacional	57
Figura 4-2: Condições dos pré-tratamentos ácido, térmico e diluição seriada do inóculo termofílico.	58
Figura 4-3:Esquema dos ensaios de comparação de meios de cultura	61
Figura 4-4: Sistema de pré-tratamento supercrítico para tratamento hidrotérmico da biomassa lignocelulósica constituído por reservatório (1), aquecedor (2), ciclone (3),Controlador PID (4), válvula d exaustão (5) e sensores de temperatura e pressão (6).	64
Figura 5-1: Abundância relativa dos principais gêneros de bactérias do BCA. Os valores de 1 a 12 correspondem a (1) <i>Streptomyces</i> ; (2) Outros (não classificados e abundância relativa abaixo de 1%); (3) <i>Paenibacillus</i> ; (4) <i>Stenotrophomonas</i> ; (5) <i>Sphingomonas</i> ; (6) <i>Luteibacter</i> ; (7) <i>Enterobacter</i> ; (8) <i>Agrobacterium</i> ; (9) <i>Novosphingobium</i> ; (10) <i>Cohnella</i> ; (11) <i>Chryseobacterium</i> ; (12) <i>Pseudomonas</i>	78
Figura 5-2: Abundância relativa dos grupos de bactérias identificadas no BCA em função da capacidade de degradação dos componentes da biomassa lignocelulósica.....	80
Figura 5-3: Ácidos orgânicos da fração líquida do BCA após pré-tratamento hidrotérmico...	82
Figura 5-4: Furfural e 5-HMF da fração líquida do BCA pré-tratado hidrotermicamente (150, 190, 200 e 210 °C).	83
Figura 5-5: Estrutura do BCA <i>in natura</i> (A) e pré-tratado em sistema hidrotérmico em diferentes severidades: (B)150°C por 20 minutos a 4 bar; (C) 190°C por17 minutos a 11 bar; (D) 200 °C por 10 minutos a 16 bar; (E e F) 210°C por 15 minutos a 20 bar.	84
Figura 5-6: Porcentagem de Klason Lignina no BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico à 150 °C por 20 minutos a 4 bar; 190 °C por17 minutos a 11 bar; 200 °C por 10 minutos a 16 bar e 210 °C por 15 minutos a 20 bar.	85
Figura 5-7: Abundância relativa dos principais gêneros dos domínios Archaea (Arc) e Bacteria (Bact), identificados no lodo termofílico. Os valores 1 a 7 correspondem aos gêneros <i>Coprothermobacter</i> ; <i>Anaerobaculum</i> ; <i>Clostridium</i> ; <i>Symbiobacterium</i> ; <i>Thermoanaerobacterium</i> ; <i>Methanosaeta</i> e <i>Methanothermobacter</i>	88
Figura 5-8: Abundância relativa dos grupos de bactérias identificadas no inóculo termofílico em função da capacidade de degradação da biomassa lignocelulósica, produção de H ₂ e tolerância a aldeídos (Furfural e 5-HMF).....	89
Figura 5-9: Produção de hidrogênio em meio de cultura Kawagoshi et al., (2005), a partir de BCA <i>in natura</i> em reatores em batelada.	90

Figura 5-10: Produção de hidrogênio em meio de cultura Kawagoshi et al., (2005).	92
Figura 5-11: Comparação da cinética de produção de hidrogênio para as condições nutricionais do meio Atlas (2005) e Kawagoshi et al. (2005).	93
Figura 5-12: Produção de hidrogênio nos reatores em batelada com inóculo termofílico submetido a diferentes pré-tratamentos.	94
Figura 5-13: Produção de hidrogênio a partir do BCA pré-tratado (210°C por 15 minutos) com e sem suplementação do meio de cultura Atlas (2005) com extrato de levedura (EL) e a penas com o extrato de levedura	97
Figura 5-14: Principais metabólitos gerados nos reatores em batelada a partir de BCA <i>in natura</i> , BCA pré-tratado, e glicose.	99
Figura 5-15: Produção de hidrogênio a partir do BCA <i>in natura</i> (C1), BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico (C2), BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico seguido por deslignificação alcalina (C3), BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico seguido por deslignificação alcalina + BCA <i>in natura</i> (C4).	101
Figura 5-16: Perfil de bandas DGGE A- Archaea e B- Bacteria dos ensaios de produção de hidrogênio a partir glicose (Controle), BCA <i>in natura</i> (C1), BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico (C2), BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico seguido por deslignificação alcalina (C3), BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico seguido por deslignificação alcalina + BCA <i>in natura</i> (C4) e do lodo termofílico (TS).	106
Figura 5-17: Produção de hidrogênio a partir do BCA <i>in natura</i> e pré-tratado em sistema hidrotérmico (150 °C por 20 minutos a 4 bar, 190 °C por 17 minutos a 11 bar. 200 °C por 10 minutos a 16 bar e 210 °C por 15 minutos a 20 bar).	109
Figura 5-18: Ácidos orgânicos dos reatores em batelada de produção de hidrogênio com BCA <i>in natura</i> e pré-tratado em sistema hidrotérmico.	112
Figura 5-20: Teste de Pareto do efeito das variáveis independentes, concentração de extrato de levedura (EL) e temperatura (Temp) na produção de hidrogênio.	116
Figura 5-21: Superfície de resposta da interação entre a concentração de extrato de levedura (EL g/L) e temperatura (T °C) na produção de hidrogênio em reatores em batelada	119
Figura 5-22: Valores acumulativos de ácidos orgânicos nas diferentes condicoes experimentais: C1, C2 e C3 (pontos centrais - 2,00 g/L de extrato de levedura à 50,0 °C); C4 (3,42 g/L de extrato de levedura à 50,0 °C); C5 (0,58 g/L de extrato de levedura à 50,0 °C); C6 (2,00 g/L de extrato de levedura à 64,2°C); C7 (2,00 g/L de extrato de levedura à 35,8°C); C8 (3,00 g/L de extrato de levedura à 40,0 °C); C9 (1,00 g/L de extrato de levedura à 40,0 °C); C10 (3,00 g/L de extrato de levedura à 60,0 °C) e C11 (1,00 g/L de extrato de levedura à 60,0 °C).	120
Figura 5-23: Superfície de resposta da interação entre a concentração de extrato de levedura e temperatura na produção de acido acético.	121
Figura 5-24: Superfície de resposta da interação entre a concentração de extrato de levedura e temperatura na produção de metano dos reatores em batelada do planejamento fatorial 1... 123	123
Figura 5-25: Perfil de bandas do DGGE para os dominios <i>Archaea</i> (A) and <i>Bacteria</i> (B)... 125	125
Figura 5-26: Box Hunter e Hunter (1) para a produção de hidrogênio a partir da variação da concentração de extrato de levedura e temperatura.	130
Figura 5-27: Box Hunter e Hunter (2) para a produção de hidrogênio a partir da variação da concentração de extrato de levedura e temperatura	131

Figura 5-28: Superfície de resposta da interação entre a concentração de extrato de levedura e temperatura na produção de hidrogênio dos reatores em batelada termofílicos do planejamento fatorial 2.....	134
Figura 5-29: Perfil de bandas do DGGE para os domínios <i>Archaea</i> (A) and <i>Bacteria</i> (B) para as condições C1 (1,00 g/L de extrato de levedura á 50 °C); C2 (3,00 g/L de extrato de levedura á 50 °C); C3 (1,00 g/L de extrato de levedura á 70 °C); C4 (3,00 g/L de extrato de levedura á 70 °C); C5 (2,00 g/L de extrato de levedura á 45,8 °C); C6 (2,00 g/L de extrato de levedura á 74,2 °C); C7 (0,58 g/L de extrato de levedura á 60 °C); C8 (3,42 g/L de extrato de levedura á 60 °C); CP (2,00 g/L de extrato de levedura á 60 °C).	140
Figura 5-30: Perfil taxonômico em nível de domínio do reator de maior produção de hidrogênio (C8 – 3,42 g/L de extrato de levedura à 60 °C). As sequências do DNA total foram atribuídas aos domínios <i>Archaea</i> , <i>Bacteria</i> , <i>Eukarya</i> , além de Vírus.....	144
Figura 5-31: Filos (A) e principais gêneros (B) do domínio <i>Archaea</i> identificados no reator em batelada C8 do planejamento fatorial 2 baseada em análise de Metagenômica	147
Figura 5-32 Filos (A) e principais gêneros (B) do domínio <i>Bacteria</i> identificados no reator em batelada C8 do planejamento fatorial 2 baseada em análise de Metagenômica	149
Figura 5-33: Abundância Relativa (%) dos principais gêneros identificados no reator em batelada C8 do planejamento fatorial 2. Os valores 1 a 37 correspondem aos gêneros <i>Methanothermobacter</i> ; <i>Pyrococcus</i> ; <i>Thermococcus</i> ; <i>Methanosarcina</i> ; <i>Methanocaldococcus</i> ; <i>Methanococcus</i> ; <i>Archaeoglobus</i> ; <i>Methanosaeta</i> ; <i>Methanobrevibacter</i> ; <i>Coprothermobacter</i> ; <i>Clostridium</i> ; <i>Thermotoga</i> ; <i>Caldanaerobacter</i> ; <i>Fervidobacterium</i> ; <i>Moorella</i> ; <i>Thermoanaerobacter</i> ; <i>Pelotomaculum</i> ; <i>Carboxydotherrmus</i> ; <i>Desulfotomaculum</i> ; <i>Bacillus</i> ; <i>Caldicellulosiruptor</i> ; <i>Desulfitobacterium</i> ; <i>Alkaliphilus</i> ; <i>Symbiobacterium</i> ; <i>Arabidopsis</i> ; <i>Rattus</i> ; <i>Homo</i> ; <i>Schizosaccharomyces</i> ; <i>Neurospora</i> ; <i>Cyanidium</i> ; <i>Cyanidioschyzon</i> ; <i>Drosophila</i> ; <i>Tetraodon</i> ; <i>unclassified(derivedfromSiphoviridae)</i> ; <i>Lambda-likeviruses</i> ; <i>T7-likeviruses</i> ; <i>T4-likeviruses</i> , respectivamente. Arc – <i>Archaea</i> ; Bact – <i>Bacteria</i> , Euk – <i>Eukarya</i> e Vir – Vírus.	152
Figura 5-34: Distribuição funcional dos genes observados no reator C8 de melhor rendimento de hidrogênio do planejamento fatorial termofílico (Nível 1).....	153
Figura 5-35: Distribuição funcional dos genes relacionados ao metabolismo de carboidratos (nível 2) em C8.	154
Figura 5-36: Distribuição funcional dos genes relacionados à fermentação (nível 2) em C8.	154
Figura 5-37: Distribuição funcional dos genes relacionados à resistência a diversos tipos de estresses em C8.....	155
Figura 5-38: Distribuição funcional dos genes relacionados ao metabolismo de compostos de 1 carbono em C8.....	156
Figura 5-39: Distribuição funcional dos genes relacionados à resistência ao metabolismo de compostos aromáticos em C8.....	156
Figura 5-40: Enzimas relacionadas ao metabolismo metanogênico codificadas pelos genes identificados em C8.....	159
Figura 5-41: Abundância relativa dos grupos de bactérias identificadas no inóculo mesofílico em função da capacidade de degradação da biomassa lignocelulósica, fermentação, lignina e tolerância a aldeídos (Furfural e 5-HMF).....	163

Figura 5-42: Principais gêneros de Bactérias identificados em amostras de solo e compostagem (Comp) (Inóculo mesofílico) Os valores 1 a 16 correspondem aos gêneros <i>Dysgonomonas</i> ; <i>Coprococcus</i> ; <i>Sporomusa</i> ; <i>Bacteroides</i> ; <i>Sedimentibacter</i> ; <i>Pseudomonas</i> ; <i>Ruminococcus</i> ; <i>Clostridium</i> ; <i>vadinCA02</i> ; <i>Anaerobaculum</i> ; <i>Tatlockia</i> ; <i>Caloramator</i> ; <i>Syntrophus</i> ; <i>Prevotella</i> ; <i>Geobacillus</i> e <i>Symbiobacterium</i> , respectivamente.....	164
Figura 5-43: Produção de hidrogênio para as condições nutricionais do meio de cultura Kawagoshi et al., (2005).	165
Figura 5-44: Produção de hidrogênio para as condições nutricionais dos meios de cultura Del Nery (1987) e Kawagoshi et al. (2005), suplementados com extrato de levedura (1 g/L). ...	166
Figura 5-45: Produção de hidrogênio para as condições nutricionais dos meios de cultura Atlas (2005) e Kawagoshi et al. (2005), suplementados com extrato de levedura (1 g/L)....	167
Figura 5-46: Teste de Pareto do efeito das variáveis independentes, concentração de extrato de levedura (EL) e concentração de bagaço de cana-de-açúcar (BCA) na produção de etanol em reatores em batelada mesofílicos.	173
Figura 5-47: Superfície de resposta da interação entre as variáveis independentes, concentração de extrato de levedura e bagaço de cana-de-açúcar na produção de etanol em reatores em batelada mesofílicos	174
Figura 5-48: Teste de Pareto do efeito da concentração de extrato de levedura (EL) e concentração de BCA na produção de hidrogênio em reatores em batelada mesofílicos.....	175
Figura 5-49: Superfície de resposta da interação entre a concentração de extrato de levedura e BCA na produção de hidrogênio nos reatores em batelada mesofílicos.....	176
Figura 5-50: Padrão de banda do DGGE das populações de <i>Archaea</i> (A) e <i>Bacteria</i> (B) para as condições C1 (3,0 g/L de extrato de levedura e 4,0 g/L de BCA), C2 (1,0 g/L de extrato de levedura e 4,0 g/L de BCA), C3 (3,0 g/L de extrato de levedura e 2,0 g/L de BCA), C4 (1,0 g/L de extrato de levedura e 2,0 g/L de BCA), C5, C6 e C7 (2,0 g/L de extrato de levedura e 3,0 g/L de BCA, respectivamente), C8 (3,42 g/L de extrato de levedura e 3,0 g/L de BCA), C9 (0,58 g/L de extrato de levedura e 3,00 g/L de BCA), C10 (2,0 g/L de extrato de levedura e 4,42 g/L de BCA), C11 (2,0 g/L de extrato de levedura e 1,58 g/L de BCA).	182
Figura 5-51: Box Hunter e Hunter (1) para a produção de hidrogênio a partir da variação da concentração de extrato de levedura e BCA nos reatores em batelada mesofílicos.	186
Figura 5-52: Box Hunter e Hunter (2) para a produção de hidrogênio a partir da variação da concentração de extrato de levedura e BCA nos reatores em batelada mesofílica.....	187
Figura 5-53: Teste de Pareto do efeito da concentração de extrato de levedura (EL) e concentração de BCA na produção de hidrogênio em reatores em batelada mesofílicos do planejamento fatorial 2.....	189
Figura 5-54: Superfície de resposta da interação entre a concentração de EL e BCA na produção de hidrogênio em reatores em batelada mesofílicos do planejamento fatorial 2. ...	190
Figura 5-55: Produção de hidrogênio em condições ótimas de extrato de levedura e BCA em reator em batelada mesofílico (37 °C) do ensaio de otimização.	196
Figura 5-56: Padrão de bandas do DGGE para os domínios <i>Archaea</i> (A) e <i>Bacteria</i> (B) para as condições C1(3,0 g/L de extrato de levedura e 6,0 g/L de BCA), C2 (1,0g/L de extrato de levedura e 6,0 g/L de BCA), C3 (3,0g/L de extrato de levedura e 4,0 g/L de BCA), C4 (1,0 g/L de extrato de levedura e 4,0 g/L de BCA), pontos centrais (CP- 2,0 g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de BCA), C8 (3,42 g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de BCA), C9 (0,58	

g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de BCA), C10 (2,0 g/L de extrato de levedura e 6,42 g/L de BCA), C11 (2,0g/L de extrato de levedura e 3,58 g/L de BCA) e otimização (OTM)	198
Figura 5-57: Perfil taxonômico em nível de domínio do reator em batelada mesofílico de maior produção de hidrogênio. As sequências do DNA total foram atribuídas aos domínios Archaea, Bacteria, Eukarya e Vírus do reator C8 mesofílico.....	200
Figura 5-58: Filos (A) e principais gêneros (B) do Domínio Archaea baseado na análise de Metagenômica do reator em batelada mesofílico de maior produção de H ₂ do reator C8 mesofílico	201
Figura 5-59: Filos (A) e principais gêneros (B) do Domínio Bacteria baseado na análise de Metagenômica do reator em batelada mesofílico de maior produção de H ₂ do reator C8 mesofílico	202
Figura 5-60: Abundância Relativa (%) dos principais gêneros de Archaea e Bacteria identificados em C8. Onde os valores 1 a 25 correspondem aos gêneros <i>Methanothermobacter</i> ; <i>Methanobrevibacter</i> ; <i>Methanosphaera</i> ; <i>Methanosarcina</i> ; <i>Methanococcus</i> ; <i>Methanocaldococcus</i> ; <i>Clostridium</i> ; <i>Bacteroides</i> ; <i>Parabacteroides</i> ; <i>Porphyromonas</i> ; <i>Desulfitobacterium</i> ; <i>Bacillus</i> ; <i>Arabidopsis</i> ; <i>Drosophila</i> ; <i>Magnaporthe</i> ; <i>Eremothecium</i> ; <i>Odontella</i> ; <i>Gibberella</i> ; <i>Mus</i> ; <i>Anopheles</i> ; <i>unclassified(derivedfromSiphoviridae)</i> ; <i>T4-likeviruses</i> ; <i>P1-likeviruses</i> ; <i>T7-likeviruses</i> ; <i>P22-likeviruses</i> Arc – Archaea; Bact – Bacteria, Euk – Eukarya e Vir – Vírus.	204
Figura 5-61: Distribuição funcional dos genes observados no reator C8 de melhor rendimento de hidrogênio do planejamento fatorial mesofílico (Nível 1).....	205
Figura 5-62: Distribuição funcional dos genes relacionados ao metabolismo de carboidratos (nível 2) no reator de melhor desempenho na produção de hidrogênio do planejamento fatorial mesofílico.	206
Figura 5-63: Distribuição funcional dos genes relacionados à fermentação (nível 3) no reator de melhor desempenho na produção de hidrogênio do planejamento fatorial mesofílico.	206
Figura 5-64: Distribuição funcional dos genes relacionados ao complexo celossoma no reator de melhor desempenho na produção de hidrogênio do planejamento fatorial mesofílico.	208
Figura 5-65: Distribuição funcional dos genes relacionados à resistência a diversos tipos de estresses no reator de melhor desempenho na produção de hidrogênio do planejamento fatorial mesofílico.....	209
Figura 5-66: Enzimas relacionadas ao metabolismo metanogênico codificadas pelos genes presentes no reator de melhor desempenho na produção de hidrogênio do planejamento fatorial mesofílico.....	210
Figura 5-67: Mapa metabólico da produção de metano. Em azul, destacam-se as enzimas codificadas pelos genes encontrados em C8 responsáveis por diferentes etapas da metanogênese	211

Lista de Tabelas

Tabela 2-1: Composição do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) <i>in natura</i> após pré-tratamento por explosão a vapor seguido por deslignificação alcalina	40
Tabela 2-2: Pré-tratamentos do inóculo para eliminação de microrganismos consumidores de hidrogênio	45
Tabela 2-3: Produção de Hidrogênio com diferentes inóculos a partir de diversos substratos em reatores em batelada em condição mesofílica e termofílica	47
Tabela 2-4: Rendimento de hidrogênio mol H ₂ / mol de glicose) em diferentes condições experimentais utilizando extrato de levedura	50
Tabela 4-1: Composição dos meios de cultura	59
Tabela 4-2: Composição das soluções de biotina e vitaminas	60
Tabela 4-3: Condições de substratos usados como fontes de carbono para produção de H ₂ ...	62
Tabela 4-4: Condições de substratos usados como fontes de carbono para produção de H ₂ ...	63
Tabela 4-5: Substratos utilizados para produção de H ₂ em condição termofílica	65
Tabela 4-6: Condições da fração sólida do BCA para a produção de H ₂	65
Tabela 4-7: Condições dos ensaios termofílicos com a fração sólida do bagaço de cana-de-açúcar ou glicose como substrato para produção de hidrogênio.	66
Tabela 4-8: Condições dos ensaios termofílicos do efeito da suplementação com extrato de levedura	67
Tabela 4-9: Planejamento fatorial (1) do efeito da concentração de substrato e extrato de levedura na produção de hidrogênio	68
Tabela 4-10: Análise exploratória – Box Hunter & Hunter	69
Tabela 4-11: Planejamento fatorial (2) do efeito da concentração de substrato e extrato de levedura na produção de hidrogênio	69
Tabela 4-12: Planejamento fatorial (1) do efeito da concentração de substrato e de extrato de levedura na produção de hidrogênio	70
Tabela 4-13: Análise exploratória – Box Hunter & Hunter	71
Tabela 4-14: Planejamento fatorial (2) do efeito da concentração de substrato e de extrato de levedura na produção de hidrogênio	72
Tabela 5-1: Açúcares da fração líquida do BCA após o pré-tratamento hidrotérmico em diferentes severidades	80
Tabela 5-2: Comparação da cinética de produção de hidrogênio para os meios de cultura Logan et al. (2002), Kawagoshi et al., (2005) e Lo et al., (2009).	90
Tabela 5-3: Comparação da cinética de produção de hidrogênio em os meios de cultura Del Nery (1987) e Kawagoshi et al., (2005)	91
Tabela 5-4: Comparação da cinética de produção de hidrogênio para os meios de cultura Atlas (2005) e meio Kawagoshi et al. (2005).	92
Tabela 5-5: Valores de produção de hidrogênio em reatores em batelada com inóculo termofílico pré-tratado	95
Tabela 5-6: Cinética de produção de hidrogênio ajustado por meio de Gompertz-modificado	97
Tabela 5-7 Rendimento de hidrogênio a partir de diferentes substratos	98
Tabela 5-8: Produção de hidrogênio nos reatores em batelada termofílico.	103

Tabela 5-9: Ácidos orgânicos produzidos dos reatores em batelada termofílicos.....	105
Tabela 5-10: Índice de diversidade de Shannon-Winer para os domínios <i>Archaea</i> e <i>Bacteria</i>	108
Tabela 5-11: Parâmetros de produção de hidrogênio a partir do BCA in natura e em diferentes condições de pré-tratamento hidrotérmico.....	110
Tabela 5-12: Produção de hidrogênio a partir de biomassa lignocelulósica pré-tratada	111
Tabela 5-13: Composto Central da concentração de extrato de levedura e temperatura para a produção de hidrogênio em reatores em batelada termofílicos.....	114
Tabela 5-14: Tabela ANOVA para o efeito da concentração de extrato e temperatura na produção de hidrogênio.....	117
Tabela 5-15: Parâmetros de produção de hidrogênio a partir do modelo de Gompertz modificado e rendimento de H ₂	117
Tabela 5-16: ANOVA para o efeito da concentração de extrato e temperatura na produção de metano dos reatores em batelada do planejamento fatorial 1	123
Tabela 5-17: Índices de diversidade, dominância e riqueza para os domínios <i>Archaea</i> e <i>Bacteria</i>	127
Tabela 5-18: ANOVA para o efeito da concentração de extrato de levedura e temperatura nas populações de bactérias dos reatores em batelada do planejamento fatorial 1	128
Tabela 5-19: ANOVA para os efeitos significativos na população de arqueias metanogênicas dos reatores em batelada do planejamento fatorial 1	129
Tabela 5-20: Composto Central dos fatores (decodificados) para a produção de hidrogênio	132
Tabela 5-21: Tabela ANOVA para os efeitos significativos na produção de hidrogênio para os reatores em batelada termofílicos do planejamento fatorial 2	133
Tabela 5-22: Ácidos orgânicos nas diferentes condições experimentais dos reatores em batelada termofílicos do planejamento fatorial 2.....	136
Tabela 5-23: Parâmetros de produção de metano em diferentes condições experimentais dos reatores em batelada termofílicos do planejamento fatorial 2	137
Tabela 5-24: Principais açúcares dos reatores em batelada termofílicos do planejamento fatorial 2	138
Tabela 5-25: Índice de diversidade (Shannon-Winner), Dominância e Riqueza (Chao-1) para os domínios <i>Archaea</i> e <i>Bacteria</i> dos reatores em batelada termofílicos do planejamento fatorial 2	141
Tabela 5-26: ANOVA para os efeitos significativos das populações do Domínio <i>Archaea</i> dos reatores em batelada termofílicos do planejamento fatorial 2	142
Tabela 5-27: ANOVA para os efeitos significativos na estrutura das populações do Domínio <i>Bacteria</i> dos reatores em batelada termofílicos do planejamento fatorial 2	142
Tabela 5-28: Análise de metagenoma do reator em batelada C8 do planejamento fatorial 2.	143
Tabela 5-29: Principais genes codificantes de enzimas, identificados no reator de melhor desempenho na produção de hidrogênio do planejamento fatorial termofílico, relacionados à degradação da biomassa lignocelulósica e à resistência a estresses em C8.....	157
Tabela 5-30: Parâmetros ajustados via Gompertz de produção de hidrogênio nos reatores em batelada mesofílicos	168
Tabela 5-31: Parâmetros ajustados via Gompertz para a produção de metano nos reatores em batelada mesofílicos	169

Tabela 5-32: Parâmetros de produção de hidrogênio ajustados via Gompertz em diferentes condições dos reatores em batelada mesofílicos	170
Tabela 5-33: Principais ácidos orgânicos produzidos nas diferentes condições dos reatores em batelada mesofílicos	171
Tabela 5-34: Composto Central dos fatores (decodificados) para a produção de etanol e hidrogênio dos reatores mesofílicos	172
Tabela 5-35: ANOVA para as variáveis independentes com efeito significativos na produção de etanol.....	174
Tabela 5-36: ANOVA para as variáveis independentes com efeito significativos na produção de hidrogênio nos reatores em batelada mesofílicos	176
Tabela 5-37: Parâmetros ajustados (Gompertz-modificado) e rendimento de hidrogênio nos reatores em batelada mesofílicos.....	177
Tabela 5-38: Máxima produção de ácidos orgânicos e etanol nas diferentes condições experimentais.....	180
Tabela 5-39: Parâmetros de produção de metano ajustados via Gompertz-modificado dos reatores em batelada mesofílicos	181
Tabela 5-40: Índices de diversidade (Shannon) e de riqueza (Chao-1) para os domínios <i>Archaea</i> e <i>Bacteria</i> dos reatores em batelada do planejamento fatorial 1.....	185
Tabela 5-41: Composto Central dos fatores (decodificados) para a produção de hidrogênio nos reatores em batelada mesofílicos do planejamento fatorial 2.....	188
Tabela 5-42: ANOVA para as variáveis independentes com efeito significativos na produção de hidrogênio em reatores em batelada mesofílicos do planejamento fatorial 2.....	190
Tabela 5-43: Principais ácidos orgânicos produzidos nas diferentes condições dos reatores em batelada mesofílicos do planejamento fatorial 2.	193
Tabela 5-44: Produção de metano (mmol/L) na diferentes condições dos reatores em batelada mesofílicos do planejamento fatorial 2.....	194
Tabela 5-45: Principais açúcares da degradação do BCA em reatores em batelada mesofílicos do planejamento fatorial 2.	195
Tabela 5-46: Ácidos orgânicos ao longo do período experimental da condição otimizada. ..	197
Tabela 5-47: Índices de diversidade (Shannon) e riqueza (Chao-1) para os domínios <i>Archaea</i> e <i>Bacteria</i> do reator em batelada mesofílico	199

Lista de abreviaturas e siglas

AnSBR: Anaerobic sequencing batch reactor
BCA: Bagaço de cana-de-açúcar
BES: Bromoethanosulfonato
CCD: Delineamento por composto central
CH₄: Gás metano
CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMC: Carboximetilcelulose
CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO_x: Óxido de carbono
C_xH_x: Hidrocarboneto
DGGE: Denaturing gradient gel electrophoresis
DF: Degree of Freedom
DQO: Demanda química de oxigênio
FAPESP: Fundação de amparo a Pesquisa de Estado de São Paulo
H₂: Gás hidrogênio
HMF: Hidroximetilfurfural
L: Linear
MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura
MS: Mean Square
NaOH: Hidróxido de sódio
NO_x: Óxido de nitrogênio
OTU: Operational taxonomic unit
PCR: Polimerase chain reaction
pb: Pares de base
Q: Quadrático
RSM: Response Surface Metodology
SO_x: Óxido de enxofre
SS: Sum Square
ST: Sólidos totais
STV: Sólidos totais voláteis
UASB: Upflow anaerobic sludge blanket

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	31
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	35
2.1. Biomassa Lignocelulósica	35
2.2. Pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica	37
2.3. Consórcio Microbiano	41
2.4. Produção de Hidrogênio	45
2.5. Efeito da temperatura na produção biológica de hidrogênio	47
2.6. Efeito do extrato de levedura na produção biológica de hidrogênio	48
2.7. Efeito da concentração de substrato na produção biológica de hidrogênio	50
2.8. Produção de ácidos orgânicos, etanol e metano.....	51
2.9. Planejamento experimental.....	53
2.10. Metagenômica.....	54
3. HIPÓTESES E OBJETIVOS	55
3.1. Hipótese Central	55
3.2. Objetivo Geral.....	56
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	57
4.1. Esquema Operacional	57
4.2. Inóculos.....	58
4.3. Meio de Cultura	59
4.4. Substrato	62
4.4.1. Pré-tratamento do substrato	62
4.5. Suplementação do meio de cultura com extrato de levedura.....	66
4.6. Planejamento Fatorial Termofílico	67
4.7. Planejamento Fatorial Mesofílico	70
4.8. Análises físico-químicas e cromatográficas	72
4.9. Microscopia Eletrônica de Varredura	73
4.10. Análises de Biologia Molecular.....	73
4.11. Ajuste dos dados Experimentais	75
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
5.1. Caracterização do Bagaço de Cana-de-açúcar.....	77
5.1.1. Identificação dos Microrganismos do Bagaço de Cana-de-açúcar <i>in natura</i>	77
5.1.2. Fração líquida do pré-tratamento hidrotérmico do BCA.....	80

5.1.3.	Fração Sólida do pré-tratamento hidrotérmico do BCA	83
5.2.	Ensaio em condição Termofílica	86
5.2.1.	Caracterização Filogenética do Inóculo Termofílico.....	86
5.2.2.	Seleção de Meio de Cultura	89
5.2.3.	Pré-tratamento do Inóculo Termofílico.....	94
5.2.4.	Suplementação do meio de cultura com extrato de levedura.....	96
5.2.5.	Pré-tratamento do BCA para ensaios em condição termofílica	98
5.2.6.	Planejamento Fatorial Termofílico 1	113
5.2.7.	Box Hunter e Hunter Termofílico.....	130
5.2.8.	Planejamento Fatorial Termofílico 2	132
5.3.	Ensaio em Condição Mesofílica	160
5.3.1.	Caracterização Filogenética do Inóculo Mesofílico.....	160
5.3.2.	Seleção de Meio de Cultura para a Condição Mesofílica	164
5.3.3.	Pré-tratamento do Substrato para condição mesofílica.....	167
5.3.4.	Planejamento Fatorial Mesofílico 1	172
5.3.5.	Box Hunter e Hunter Mesofílico.....	186
5.3.6.	Planejamento Fatorial Mesofílico 2	187
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	213
7.	CONCLUSÕES	215
8.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	217
9.	REFERÊNCIAS.....	219

1. INTRODUÇÃO

A demanda energética global baseia-se no consumo de combustíveis fósseis, como os derivados de Petróleo que, por não serem renováveis, estão, inevitavelmente, sendo esgotados. O uso dos combustíveis fósseis está atrelado a grandes desvantagens, já que sua queima emite resíduos tóxicos, como CO_x , NO_x , SO_x , C_xH_x , fuligem, cinzas e outros compostos orgânicos, que podem ser nocivos à saúde humana e ao ambiente (ANGELIS-DIMAKIS et al., 2011).

Neste cenário, pesquisas têm sido realizadas em busca de fontes alternativas de energia renovável e ambientalmente corretas. No Brasil, a produção de etanol foi estimulada a partir da década de 70 como uma iniciativa governamental para enfrentar a crise mundial do Petróleo. Atualmente, o país é o maior produtor de etanol a partir da cana-de-açúcar. Na safra de 2016/2017 a produção de etanol no Brasil foi de 27.254 mil m^3 . Em tal safra, 651.841 mil toneladas de cana-de-açúcar foram processadas (UNICA, 2017).

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) foi uma das primeiras culturas introduzidas no Brasil e, devido às condições climáticas locais, adaptou-se rapidamente à região tornando-se um dos cultivares mais importantes do país, uma vez que é matéria prima para a produção de etanol e açúcar. A cada tonelada de cana processada, 250 kg de bagaço são produzidos (CGEE, 2010). O bagaço de cana-de-açúcar (BCA) é utilizado em ração para animais, fabricação de papel, síntese de compostos orgânicos e, principalmente, queimado em caldeiras para a cogeração de bioeletricidade, devido ao seu elevado valor calorífico (1.800 kcal/kg). Entretanto, estima-se que haja um excedente de 8 e 12 % de BCA nas usinas anexas e autônomas respectivamente (ALBERTINI; CARMO; PRADO FILHO, 2007), bem como, a queima de BCA leva a produção alarmante de cinzas, que por serem pobres em nutrientes, são recalcitrantes, ou seja, de difícil degradação.

A disposição de cinzas no solo dos canaviais como forma de adubo sem observar critérios técnicos e ambientais leva à entrada de metais pesados, parte da composição das cinzas, que podem contaminar o solo e o lençol freático, ocasionando problemas ao ambiente e aos organismos vivos (FEITOSA; MALTONI; SILVA, 2009).

A queima de BCA para cogeração de bioeletricidade também ocasiona a emissão de aproximadamente 3.604 kg de CO_2 (UNICA, 2011), bem como pode gerar aproximadamente 342,46 mg/Nm^3 de material particulado e 372,13 mg/Nm^3 de NO_x (GONÇALVES et al.,

2014) justificando a aplicação desta biomassa lignocelulósica em fins mais nobres do que a queima, como a produção de bioprodutos.

O BCA é constituído por aproximadamente 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina (PANDEY et al., 2000), sendo um substrato potencial para bactérias celulolíticas e fermentadoras. A digestão anaeróbia é um processo que envolve muitas etapas e a cooperação de diversos microrganismos, resultando na conversão da biomassa lignocelulósica em biogás, álcoois, ácidos orgânicos e biomassa microbiana.

A degradação do material celulósico por microrganismos anaeróbios ocorre pela atividade de enzimas do complexo celulolítico, tais como exocelulases, endo- β -1,4-glucanase, α -galactosidase, poligalacturonase e glicoamilase (CAI et al., 2017) que atuam sinergicamente. Bactérias anaeróbias, como algumas espécies de *Clostridium*, possuem um complexo multienzimático que produz dentre outras enzimas, as celulases, capazes de converter a celulose em glicose. Este complexo, conhecido como celulosoma, é responsável pela despolimerização da celulose e constitui-se basicamente por uma proteína integradora especializada chamada cipA na qual inserem-se diferentes compostos catalíticos (SCHWARZ, 2001).

A hidrólise da celulose é uma etapa essencial aos processos fermentativos, uma vez que muitos microrganismos fermentadores não são capazes de utilizá-la como substrato e, portanto, precisam de açúcares mais lábeis para o seu metabolismo. A aplicação de uma etapa de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica facilita a utilização desta matéria prima por microrganismos fermentadores. Por meio do pré-tratamento é possível remover a hemicelulose e lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade dos materiais lignocelulósicos. A partir disso, a celulose e outros açúcares mais facilmente fermentáveis são liberados e utilizados na fermentação para produção biológica de hidrogênio e outros produtos de valor biotecnológicos. O pré-tratamento é uma das etapas mais complexas da conversão da biomassa celulósica, os quais podem ser químicos, físicos ou biológicos.

O pré-tratamento químico está relacionado à aplicação de um composto químico à biomassa lignocelulósica que remove a lignina e a hemicelulose aumentando a biodegradabilidade da celulose. Porém, a aplicação de químicos concentrados podem causar problemas relacionados à corrosão do equipamento e geração de um resíduo tóxico. Já os pré-tratamentos biológicos, em sua maioria envolvem o uso de fungos degradadores de celulose, com potencial vantagem em relação aos pré-tratamentos físico e químico, devido à elevada especificidade com o substrato e a não geração de resíduos tóxicos. Todavia, o pré-tratamento

biológico é muito lento, principalmente em relação aos químicos, e envolve custo de manutenção e risco de contaminação das culturas.

Dentre os pré-tratamentos físicos tem-se as técnicas de fragmentação (moagem e trituração) explosão a vapor, hidrotérmólise, extrusão e radiação (ultrassom e micro-ondas) (ZHENG et al., 2014). A aplicação do sistema hidrotérmico é atraente em larga escala, pois não possui custos catalíticos e não gera resíduos tóxicos, uma vez que o único solvente utilizado é a água. Na sua aplicação emprega-se a água em elevada temperatura e pressão para a desacetilização da hemicelulose, com produção de ácido acético que atua como catalizador da hidrólise e favorece o acesso de microrganismos à celulose.

A principal desvantagem do sistema hidrotérmico é a liberação de compostos inibidores da fermentação, como furfural e 5 - Hidroximetilfurfural (5-HMF) de acordo com a severidade do pré-tratamento. Assim, a eficiência na desestruturação da biomassa lignocelulósica, liberação de açúcares fermentáveis e compostos inibidores dependem das condições aplicadas ao processo, como temperatura, tempo de exposição da biomassa ao tratamento e pH do líquido.

Além do pré-tratamento, outros fatores devem ser avaliados na conversão da biomassa lignocelulósica em bioproductos, via fermentação. Temperatura, pH, composição do meio de cultura, inóculo e concentração de substrato são algumas das variáveis importantes na geração de produtos de valor biotecnológico.

A temperatura é um dos fatores determinantes para que ocorra a conversão eficiente de substratos lignocelulósicos em hidrogênio e ácidos orgânicos. Microrganismos mesofílicos e termofílicos realizam a fermentação (FERRAZ JÚNIOR et al., 2014; RATTI et al., 2013; SANTOS et al., 2014), porém, em processos anaeróbios termofílicos as reações bioquímicas ocorrem em maior velocidade e a transferência de massa entre os microrganismos ocorre mais facilmente. Em contrapartida, sob condição termofílica tem-se maior gasto energético e em alguns casos pode ocorrer a desnaturação térmica de proteínas e enzimas essenciais, consequentemente afetando negativamente o crescimento microbiano (LEE; LIN; CHANG, 2006).

A disponibilidade e concentração de nitrogênio no meio de cultura é outro fator importante relacionado ao crescimento dos microrganismos e consequentemente à produção de bioproductos como o hidrogênio e ácidos orgânicos. Com isso, a suplementação de meios de cultura com fontes de nitrogênio é de fundamental relevância para estimular o crescimento microbiano durante a fermentação. O extrato de levedura, o qual é obtido a partir da hidrólise

e secagem de leveduras é uma importante fonte de nitrogênio, aminoácidos, peptídeos e vitaminas que favorecem o crescimento microbiano.

A concentração de substrato é também importante fator que afeta a geração de bioprodutos e a velocidade de hidrólise enzimática a partir da biomassa lignocelulósica. Elevada concentração de biomassa sólida pode prejudicar a transferência de massa e de calor, levando a baixa eficiência do processo fermentativo. Elevada concentração de substrato pode, ainda, gerar acúmulo de ácidos orgânicos que inibem a atividade celulolítica e, também reduz o rendimento de hidrogênio.

Em contrapartida, baixa concentração inicial de substrato resulta em baixas taxas de obtenção dos produtos durante a fermentação. Assim, o efeito inibitório da concentração de substrato geralmente é dependente do tipo de substrato e dos microrganismos envolvidos no processo fermentativo.

Por meio do uso de técnicas estatísticas pode-se avaliar o efeito de diversas variáveis relacionadas a maior formação de um produto alvo. Utilizando um planejamento experimental, o efeito de diversos fatores (variáveis independentes) como temperatura, pH, concentração de nutrientes e substrato pode ser avaliado em determinada variável resposta, como produção de hidrogênio, ácidos orgânicos e metano.

No planejamento fatorial completo, todas as combinações de fatores podem ser simultaneamente investigadas. Em contrapartida, quando o número de corridas necessárias para o desenvolvimento de um planejamento experimental é inviável, a informação desejada pode ser obtida por meio do planejamento fatorial fracionado, sendo realizadas algumas combinações experimentais. Planejamento experimental tem sido realizado para avaliar o efeito de diversas variáveis independentes na produção de diferentes produtos alvos, tais como, hidrogênio (MU; ZHENG; YU, 2009), etanol (DASGUPTA et al., 2013) e ácidos orgânicos (WANG; MU; YU, 2005). A partir de um planejamento experimental, um modelo polinomial pode ser usado para descrever o efeito dos fatores estudados na variável resposta e então utilizar as condições ótimas previstas pelo modelo para obter máxima geração de produtos de interesse.

Neste estudo, diferentes meios de cultura, tipos de pré-tratamento do inóculo, severidade do pré-tratamento hidrotérmico do BCA, temperatura e concentração de extrato de levedura foram avaliados visando favorecer a produção de hidrogênio e ácidos orgânicos a partir do bagaço de cana-de-açúcar em condição mesofílica (37°C) e termofílica (55°C).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biomassa Lignocelulósica

Os resíduos lignocelulósicos são constituídos basicamente por celulose, hemicelulose, lignina, extratos orgânicos e minerais inorgânicos (Figura 2-1) em concentrações dependentes do tipo da biomassa (bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho, casca de arroz, polpa de eucalipto) (MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006).

Figura 2-1: Composição da biomassa lignocelulósica (Fonte: MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006)

A celulose é um polímero linear de alto peso molecular formado por repetidas unidades de celobiose (Figura 2-2). Cada unidade de celobiose é constituída por duas moléculas de glicose (MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006).

Figura 2-2: Estrutura química da celulose (Fonte: MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006).

A hemicelulose é uma mistura de vários monossacarídeos (Figura 2-3), como glicose, manose, galactose, xilose, arabinose e ácidos glucurônico e galacturônico (MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006).

Figura 2-3: Principais componentes da hemicelulose (Fonte: MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006).

A lignina é um polímero polifenólico que preenche os espaços da parede celular, entre a celulose e a hemicelulose (LEVIN et al., 2009) formando uma barreira que impede o acesso de microrganismos à celulose durante a fermentação.

Devido a forte associação entre a celulose, hemicelulose e lignina, pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica são necessários para disponibilizar os carboidratos para o processo fermentativo.

Por meio da aplicação dos pré-tratamentos é possível remover a hemicelulose e lignina, reduzindo a cristalinidade da celulose e aumentando a porosidade dos materiais lignocelulósicos de modo que a celulose e outros açúcares mais facilmente fermentáveis sejam liberados e utilizados na fermentação e metanogênese (Figura 2-4) (BEHERA et al., 2014).

Figura 2-4: Potenciais aplicações da biomassa lignocelulósica pré-tratada (Fonte: BEHERA et al., 2014).

2.2. Pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica

O pré-tratamento é uma das etapas mais complexas da conversão da biomassa celulósica. Os métodos de pré-tratamento podem ser químicos, físicos, híbridos ou biológicos e causam alterações na área superficial, volume do poro, cristalinidade da biomassa, derretimento e realocação da lignina e polimerização da celulose (Figura 2-5) (SINGH et al., 2014).

Figura 2-5: Esquema do efeito que os pré-tratamentos exercem na biomassa lignocelulósica (Fonte: MOSIER et al., 2005).

Dentre os pré-tratamentos físicos tem-se as técnicas de fragmentação (moagem e trituração) explosão a vapor, hidrotérmólise, extrusão e radiação (ultrassom e micro-ondas) (ZHENG et al., 2014).

A explosão a vapor é o método mais usado para o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica (ZHENG et al., 2014). Este processo termoquímico consiste na quebra dos componentes lignocelulósicos por meio de aquecimento a vapor, hidrólise das ligações glicosídicas por forças de cisalhamento devido à expansão da mistura e formação de ácidos orgânicos (JACQUET et al., 2011).

O sistema hidrotérmico é também amplamente usado para pré-tratar a biomassa lignocelulósica. Este método consiste na elevação da temperatura da água (180-240°C) para a desacetilização da hemicelulose gerando ácido acético que atua como catalizador da hidrólise aumentando a acessibilidade da celulose (ALLEN et al., 2001). Nestas condições, subcríticas, a água ainda encontra-se em estado líquido. A 220 °C a viscosidade da água é de aproximadamente 12 %, enquanto a densidade mantém-se próxima a 85 % dos valores iniciais

a 20°C. Neste sentido, a penetração da água através da estrutura lignocelulósica é significativamente melhorada sem prejudicar sua habilidade de expansão durante a despressurização. Além disso, a constante dielétrica (ϵ) diminui de 80,22 a 20 °C para 31,50 a 220 °C favorecendo a solubilidade de compostos orgânicos hidrofóbicos como os ácidos graxos (HOLLIDAY; KING; LIST, 1997; KING; HOLLIDAY; LIST, 1999).

No entanto, a solubilidade de sais diminui nas condições subcríticas, podendo gerar precipitados que facilmente atacam a superfície de tubos, trocadores de calor e reatores causando a incrustação e até mesmo o bloqueio desses sistemas (KRITZER; DINJUS, 2001; MARRONE et al., 2004). Apesar disto, o pré-tratamento hidrotérmico é um dos mais promissores para aplicações em larga escala devido à simplicidade deste sistema e baixo consumo energético.

Assim como, o método de explosão a vapor, o pré-tratamento hidrotérmico gera uma fração líquida, constituída por açúcares solúveis e outra sólida, composta por lignina e celulose insolúvel. Neste processo, os custos catalíticos, do tratamento químico, são eliminados e os resíduos gerados são reduzidos, pois a água é o único solvente utilizado no sistema (DA CRUZ et al., 2012).

Allen et al. (2001) verificaram na fração sólida resultante do pré-tratamento hidrotérmico (210 °C por 2 minutos) realizado em fibra de milho, alto teor de glucanas e reduzidas quantidades de pentoses.

A eficiência na desestruturação da biomassa lignocelulósica e liberação de açúcares fermentáveis dependem das condições aplicadas ao processo, como temperatura e tempo de duração do pré-tratamento (DATAR et al., 2007). A severidade dos processos de explosão a vapor e hidrotérmico, isto é a intensidade dos tratamentos, pode ser calculada estabelecendo-se uma correlação entre temperatura e tempo de retenção do processo, usando-se o modelo de Chornet; Overend (1988) (Equação 1).

$$S = \log_{10} \int \exp\left(\frac{T(t) - 100}{14,75}\right) dt \quad (1)$$

Sendo:

S= fator de severidade; T= Temperatura do processo (°C); t = tempo de retenção (min.); 14,74 = valor da energia de ativação.

Todavia, com o aumento da severidade dos pré-tratamentos ocorre também a formação de outros compostos, tais como furfural, 5-HMF, ácido acético e fenóis que podem inibir a atividade celulolítica e/ou a fermentação (RASMUSSEN; SØRENSEN; MEYER, 2014).

Com isso, a compreensão das rotas de formação e da atuação inibitória desses compostos é de extrema relevância nos processos de produção de hidrogênio a partir da biomassa lignocelulósica. A produção de furfural durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica ocorre a partir da degradação de pentoses (xilose e arabinose) que são provenientes da degradação da hemicelulose (Figura 2-6). Em contrapartida, o 5-HMF pode ser produzido pela degradação da glicose proveniente da quebra da celulose e da hemicelulose ou da degradação de hexoses (manose, galactose) oriundas da desestruturação da hemicelulose (RASMUSSEN; SØRENSEN; MEYER, 2014).

Figura 2-6: Esquema da degradação dos componentes da biomassa lignocelulósica

A partir da glicose podem ser formados também ácidos levulínico, fórmico e compostos fenólicos. Os compostos fenólicos podem ser formados, ainda, a partir da arabinose e da lignina (RASMUSSEN; SØRENSEN; MEYER, 2014).

O efeito da adição de 1g/L de furfural e 5-HMF foi analisado por Quemeneur et al. (2012) em ensaios de produção de hidrogênio em reatores em batelada a 37 °C, alimentados com xilose (5 g/L) como fonte de carbono e lodo anaeróbico pré-tratado termicamente (90°C por 10 minutos) como fonte de microrganismos. Em tais condições, os autores observaram no ensaio controle, sem a adição de compostos inibidores, no período de 3,2 dias para o início da produção de H₂ e rendimento de 1,67 mol H₂/mol xilose. Em contrapartida, nos ensaios cujos

inibidores, furfural e HMF, foram adicionados, esse período foi de 18,5 e 9,9 dias, respectivamente e o rendimento de hidrogênio foi reduzido para 0,51 e 0,40 molH₂/mol xilose, respectivamente.

Período maior foi observado nos ensaios com furfural em relação ao HMF. Provavelmente, isso foi devido ao menor peso molecular do furfural comparado ao HMF, uma vez que a taxa de difusão do furfural para o interior da célula é maior, portanto, a necessidade de maior tempo de aclimação das populações às condições impostas (QUÉMÉNEUR et al., 2012).

A eficiência na desestruturação da biomassa lignocelulósica e liberação de açúcares fermentáveis depende das condições aplicadas ao processo, como temperatura, tempo de exposição da biomassa ao tratamento e pH do líquido. Em geral, os tratamentos nos quais são aplicadas baixas severidades tem-se a solubilização de parte da hemicelulose, enquanto, para aqueles com alta severidade verifica-se a dissolução da hemicelulose e pequena parte da lignina (DATAR et al., 2007). Uma alternativa ao pré-tratamento físico é o pré-tratamento químico com NaOH, por meio do qual tem-se a degradação e remoção de grande parte da lignina da biomassa lignocelulósica. Rocha et al. (2012) realizaram explosão a vapor (190°C por 15 minutos) seguido por deslignificação com NaOH (1% à 100°C por 1 hora) em bagaço e cana-de-açúcar. Nestas condições, os autores obtiveram aumento na disponibilidade de celulose e redução na quantidade de lignina (Tabela 2-1).

Tabela 2-1: Composição do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) *in natura* após pré-tratamento por explosão a vapor seguido por deslignificação alcalina

BCA	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinzas	Extrato
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
<i>in natura</i>	43,1	25,2	22,9	2,8	4,3
Explosão a vapor	57,5	6,6	32,5	2,8	66,1
Explosão a vapor e NaOH	86,8	4,0	6,1	3,3	51,5

Fonte: (ROCHA et al., 2012)

A partir dos resultados apresentados na Tabela 2-1 evidencia-se a importância da etapa de deslignificação do BCA após o pré-tratamento físico, tanto para aumentar a disponibilidade de celulose, quanto para reduzir a quantidade de lignina da biomassa lignocelulósica.

Pré-tratamentos biológicos da biomassa lignocelulósica são considerados menos dispendioso do que os demais pré-tratamentos e resultam em maior acesso a hidrólise enzimática.

A biodegradação dos materiais lignocelulósicos por fungos depende da ação de diversos metabólitos produzidos simultaneamente. Esses compostos atuam diretamente sobre a parede celular ou agem como mediadores de enzimas. O uso de fungos lignolíticos como pré-tratamento de materiais lignocelulósicos pode potencializar a recuperação de açúcares para a produção de hidrogênio (AGUIAR; FERRAZ, 2011).

Singh et al. (2008) realizaram pré-tratamento do BCA (500 g) com suspensão de *Aspergillus terreus* e *Aspergillus awamori* por 45 dias a 28-32°C. Nestas condições a porcentagem de lignina do BCA foi reduzida de 12% para 1 e 4 % nos pré-tratamentos com *A. terreus* e *A. awamori*, respectivamente.

O pré-tratamento pode ser considerado eficiente quando reduz os fatores limitantes da degradação da biomassa lignocelulósica ou produz nesta, múltiplos efeitos (remoção da lignina, descristalização da celulose) de modo que seja favorecida a produção de biogás (ZHENG et al., 2014).

2.3. Consórcio Microbiano

A produção biológica de hidrogênio e ácidos orgânicos pode ocorrer por meio do metabolismo fermentativo realizado por alguns microrganismos. Este processo é anaeróbio e independente de luz (HALLENBECK; ABO-HASHESH; GHOSH, 2012) o que o torna mais viável em relação aos processos aeróbios e fototróficos anoxigênicos.

A digestão anaeróbia ocorre em quatro etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. A produção de hidrogênio ocorre nas etapas acidogênicas e acetogênicas, por meio da ação de diferentes microrganismos provenientes de um consórcio microbiano misto (ESCALANTE; GUZMÁN; CASTRO, 2014).

Microrganismos produtores de hidrogênio e ácidos orgânicos têm sido obtidos a partir de culturas puras (LO et al., 2009; LAI et al., 2014; SINGH et al., 2014) ou a partir de consórcios microbianos provenientes de compostagem (SONG et al., 2012), lodo de estação de tratamento de esgoto (CAI; LIU; WEI, 2004; LIN; CHEN, 2006; WANG et al., 2010) lodo de reator de tratamento de águas residuárias de cervejaria (DANKO et al., 2008), lodo de reatores de tratamento de resíduos de avicultura (LAZARO et al., 2014) vinhaça de cana-de-açúcar (FERRAZ JÚNIOR et al., 2014) e bagaço de cana-de-açúcar (RATTI et al., 2014).

A produção biológica de hidrogênio e ácidos orgânicos a partir de resíduos lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar, necessita de um consórcio bacteriano especializado composto de bactérias celulolíticas e fermentadoras, isto é, capazes de degradar a celulose em uma etapa de hidrólise e, posteriormente, realizar o metabolismo fermentativo.

Escalante; Guzmán; Castro (2014) obtiveram com inóculo misto, composto por fluido de rúmen e dejetos de suínos, seis grupos microbianos (bactérias fermentadoras de glicose, fermentadoras de lactato, produtoras de acetato, arqueias metanogênicas hidrogenotróficas e acetoclásticas, além das bactérias produtoras de metanol). Tais microrganismos foram utilizados como inóculo em reatores em batelada a 39 °C com bagaço de agave como substrato (relação substrato/inóculo de 1 g SV/g SV). Nestas condições, os autores obtiveram produção de metano de 20,09 mmol CH₄/Kg SV.

Motte et al. (2014) avaliaram o efeito da umidade do inóculo, em termos de sólidos totais (10, 14, 19, 25, 29 e 34 %) na produção de hidrogênio a partir de palha de trigo. Estes autores misturaram o lodo de digestor anaeróbio de tratamento da fração sólida do esgoto doméstico com lodo de UASB de tratamento de água residuária da indústria açucareira (mesofílico) e lodo de UASB de tratamento de esgoto doméstico (termofílico). Depois de misturados, os inóculos foram pré-tratados a 90°C por 15 minutos. Nas condições descritas anteriormente, os autores (Op. cit.) obtiveram redução no rendimento de hidrogênio com o aumento do conteúdo de sólidos totais (ST) (0,68 mmol H₂/g ST e 0,017 mmol H₂/g ST nos ensaios com 10 e 34% de umidade, respectivamente). Tal redução foi atribuída ao consumo de hidrogênio por homoacetogênese e ao desvio da rota de produção de hidrogênio para a produção de solventes, uma vez que além de hidrogênio foram produzidos ácidos orgânicos voláteis e álcoois (MOTTE et al., 2014). Nos ensaios com menores conteúdos de ST (10 e 14 % ST) foi observada maior formação dos produtos da fermentação (eficiência de conversão de 1.935 mmol produtos/Kg ST). No ensaio com 19% de ST a conversão do substrato a produtos da fermentação foi reduzida para 1.323 mmol produtos/Kg ST. Por fim, nos ensaios com maior conteúdo de ST (25 a 34%) foram formados apenas 931 mmol produtos/Kg ST (MOTTE et al., 2014).

Perez-Rangel et al. (2015) avaliaram a produção de hidrogênio a partir de palha de trigo por microrganismos provenientes de quatro consórcios microbianos diferentes, solo, fluído de rúmen, lodo de digestor anaeróbio de tratamento de dejetos bovinos e comunidade nativa da palha do trigo. Para tanto, ensaios em batelada em condição mesofílica (37°C) foram realizados. Nestas condições as maiores produções de hidrogênio foram observadas nos

ensaios inoculados com lodo e comunidade endógena do trigo (7,88 e 5,49 mmol H₂/L, respectivamente). Nos ensaios inoculados com rúmem e solo foram obtidas baixas produções de hidrogênio (2,12 e 1,75 mmol H₂/L, respectivamente).

Neste sentido, consórcio microbiano composto por diferentes microrganismos é necessário para conversão da biomassa lignocelulósica em hidrogênio e ácidos orgânicos (BAYER et al., 2009). No entanto, nestes inóculos podem estar presentes, microrganismos consumidores destes metabólitos como as arqueias metanogênicas, as quais precisam ser inibidas por meio de pré-tratamentos do inóculo, quando apenas deseja-se a produção de hidrogênio e ácidos orgânicos.

Entre os pré-tratamentos do inóculo destacam-se o tratamento térmico e químico (DANKO et al., 2008), tratamento à base de sal (LIN; CHEN, 2006), tratamento alcalino (CAI; LIU; WEI, 2004; LU et al., 2012), tratamento ácido (WU; CHANG; CHANG, 2007), tratamento por meio de aeração (HAN et al., 2011) e tratamento misto (temperatura e ácido) (MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006). Cai; Liu; Wei, (2004) usaram lodos ativados de estação de tratamento de esgoto pré-tratado (NaOH -4M por 24 horas) e *in natura* como inóculo e substrato em reatores em batelada a 36 °C. Nestas condições não foi observada presença de metano.

Wu; Chang e Chang, (2007) realizaram pré-tratamento ácido (HCl, pH3,0 por 24 horas) em lodo de estação de tratamento de esgoto. O lodo pré-tratado foi usado como inóculo em reator de leito fluidificado (FBR) com TDH de 12 horas, utilizando sacarose, glicose ou frutose (20 g DQO/L) como fonte de carbono e em reator de leito empacotado (PBR) com TDH de 4 horas em condição mesofílica (35 °C). Estes autores não detectaram metano nos ensaios.

Danko et al. (2008) realizaram pré-tratamentos térmico (autoclave) e químico (Bromoethanosulfonato) em lodo granular de UASB usado no tratamento de água residuária de cervejaria. O lodo pré-tratado (10 g/L SV) foi usado em ensaios em batelada com resíduos de alimentos (16 g DQO/L) como substrato e incubados em três temperaturas (37, 60 e 70 °C). Nestas condições não foi observada presença de metano em nenhum dos reatores.

O pré-tratamento alcalino (cloridrato de sódio-1N por 24 horas) aplicado em lodos ativados foi eficiente na inibição de arqueias metanogênicas em reator contínuo de tanque agitado (CSTR) a 35°C com sacarose como substrato e TDH de 12, 8,4 e 2 horas (LIN; CHEN, 2006).

Lodo de estação de tratamento de esgoto foi pré-tratado por aeração (30 dias) para inibição da atividade metanogênica e usado como inóculo (17,74 g/L SSV) em reator CSTR alimentado com melaço (2, 4 e 6 g/L DQO) incubado a 36 °C (HAN et al., 2011). Venkata Mohan; Lalit Babu; Sarma, (2007) realizaram pré-tratamento misto (100 °C por 2 horas seguido da redução de pH para 3 por 24 horas) para redução da metanogênese. O inóculo pré-tratado foi usado em reator em batelada sequencial (AnSBR) com TDH de 24 horas alimentado com água residuária de cooperativa leiteira (2,4; 3,5 e 4,7 kg DQO/m³/dia).

Lazaro et al., (2014) realizaram pré-tratamento térmico (90 °C por 10 minutos) em lodo metanogênico de reator UASB do tratamento de resíduos avícolas para promover a inibição de arqueias metanogênicas e selecionar microrganismos produtores de endósporos. O inóculo pré-tratado foi utilizado em condição mesofílica (37 °C) e termofílica (55 °C) usando vinhaça como substrato (2 g DQO/L) em reator em batelada. Em tais condições, os autores não reportaram produção de metano.

Maintinguer et al., 2015) realizaram diluição seriada (10^{-5} , 10^{-7} e 10^{-10}) seguida por tratamento térmico (90 °C por 10 minutos) em sedimento de reservatório de águas, o qual foi utilizado como inóculo em reator em batelada utilizando xilose como substrato (2 g/L) em condição mesofílica (37°C). Em tais condições os autores não obtiveram produção de metano.

Na Tabela 2-2 estão descritas diversas condições de pré-tratamentos de inóculo para eliminação das arqueias metanogênicas.

De acordo com as condições experimentais, incluindo o tipo de inóculo, substrato, modelo de reator, disponibilidade de nutrientes, pH e temperatura, a aplicação de determinado tratamento do inóculo pode ser mais interessante do que a outro no controle das arqueias metanogênicas. Portanto, devido às diferenças nestes fatores, não existe um consenso na literatura sobre as condições ótimas de pré-tratamento do inóculo (WANG; WAN, 2009a).

Neste sentido, são necessários estudos para determinação de pré-tratamentos adequados para cada tipo de inóculo, ou seja, inibir os microrganismos consumidores e favorecer os produtores de H₂ e ácidos orgânicos.

Tabela 2-2: Pré-tratamentos do inóculo para eliminação de microrganismos consumidores de hidrogênio

Pré-tratamento	Agente	Condição	Referência
Alcalino	NaOH	4M por 24 horas	Cai et al. (2006)
Sal	Cloridrato de Sódio	1N por 24 horas	Lin et al. (2006)
Misto	Temperatura e ácido ortofosfórico	100°C por 24 horas e pH = 3 por 24 horas	Mohan et al. (2007)
Ácido	HCl	pH = 3 por 24 horas	Wu et al. (2007)
Térmico	Calor úmido (autoclave)	30 minutos à 121°C	Danko et al. (2008)
Químico	Bromoetanossulfonato (BES)	25mM	Danko et al. (2008)
Aeração	O ₂	30 dias sob aeração	Han et al. (2012)
Térmico	Temperatura	90 °C por 10 minutos	Lazaro et al. (2014)
Diluição seriada + térmico	Diluição + Temperatura	(10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁷ e 10 ⁻¹⁰) + 90 °C por 10 minutos	Maintinguer et al. (2015)

2.4. Produção de Hidrogênio

Biohidrogênio tem sido produzido em diferentes configurações de reatores, como batelada (RATTI et al., 2013, 2014 LAZARO et al., 2014), reator anaeróbio de leito empacotado (APBR) (FERRAZ JÚNIOR et al., 2014) e tanque agitado contínuo (CSTR) (PAWAR; VAN NIEL, 2013) com diferentes substratos orgânicos. Diferentes substratos têm sido utilizados como fontes de carbono em processos de produção de hidrogênio, desde compostos simples como glicose, até materiais complexos como vinhaça (FERRAZ JÚNIOR et al., 2014; LAZARO et al., 2014) e bagaço de cana-de-açúcar (RATTI et al., 2014).

O uso de resíduos sólidos ou águas residuárias como fonte de carbono para produção biológica de hidrogênio aumenta a viabilidade comercial do processo fermentativo (LO et al., 2011), uma vez que além de produzir energia sustentável reduz os resíduos orgânicos.

Ferraz-Junior et al. (2014) avaliaram o efeito do aumento da carga orgânica e do tempo de detenção hidráulico (TDH) na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito empacotado para tratamento de vinhaça em condição termofílica (55°C). O maior rendimento de hidrogênio (2,4 mol H₂/mol carboidratos totais) foi observado no reator operado com TDH de 12 horas e carga orgânica de 72,4 kg DQO/m³/dia.

Lazaro et al. (2014) avaliaram a produção de hidrogênio em quatro concentrações de vinhaça (2, 5, 7 e 12 g DQO/L) em reator em batelada em condição mesofílica (37°C) e termofílica (55°C). Em condição mesofílica, o aumento da carga orgânica resultou no aumento da produção de hidrogênio (aumento de 4,3 mmol para 28,4 mmol, para as cargas 2,0 e 12,0 g DQO/L, respectivamente). Todavia, em condição termofílica obteve-se baixa produção de hidrogênio (5,0; 6,3; 5,3 e 6,7 mmol H₂) em todas as cargas orgânicas (2,0; 5,0; 7,0 e 12 g DQO/L), respectivamente. A baixa produção de hidrogênio observada deveu-se, provavelmente, a origem mesofílica do inóculo cuja aclimação a 55°C não foi adequada, além da possível presença de compostos inibidores na vinhaça que podem ter causado maior efeito nos microrganismos termofílicos do que nos mesofílicos.

Santos et al. (2014) avaliaram o efeito da vinhaça bruta e diluída como fonte de carbono em reator anaeróbico de leito fluidificado (AFBR) operado a 55 °C e TDH de 6, 4, 2 e 1 hora para a vinhaça diluída (carga orgânica de 40 a 240 Kg DQO/m³/dia) e TDH de 8, 6, 4, 2 e 1 hora para a vinhaça bruta (carga orgânica de 120 a 720 Kg DQO/m³/dia). O maior rendimento (2,86 mmol H₂/g DQO adicionada) de hidrogênio foi obtido no reator alimentado com vinhaça diluída (40 Kg DQO/m³/dia) e TDH de 6 horas. Ratti et al. (2013) avaliaram a produção de hidrogênio em três concentrações de celulose (2,5; 5 e 10 g/L) com adição da enzima celulase (7,5; 15,0 e 30,0 mL, respectivamente) em reator em batelada em condição mesofílica (37°C) inoculado com lixiviado de aterro sanitário. Em tais condições o rendimento de hidrogênio foi de 1,2; 0,6 e 2,3 mol H₂/ mol celulose hidrolisada.

Produção de hidrogênio tem sido obtida a partir de diversos substratos em condição mesofílica (37°C) e termofílica (55°C). Diversas fontes de microrganismos têm sido utilizadas em reatores em batelada (Tabela 2-3).

Tabela 2-3: Produção de Hidrogênio com diferentes inóculos a partir de diversos substratos em reatores em batelada em condição mesofílica e termofílica

Inóculo	Temperatura (°C)	Substrato	H ₂ (mmol)	Referência
Lodo de ETA	37	Hidrolisado de trigo	31.08	Sagnak; Kargi; Kapdan (2011)
Lixiviado	37	Celulose	125,9*	Ratti et al. (2013)
Lodo de ETE	35	Óleo de palma	15.62	Chong et al. (2013)
Fluído de Rúmen	37	Celulose	57,59*	Ratti et al. (2014)
Lodo reator UASB tratamento de avicultura	37	Vinhaça de cana- de-açúcar	28,4	Lazaro et al. (2014)
Lodo de digestor anaeróbio	35	Hidrolisado de resíduo de palma	60.49	Gonzales et al. (2016)
Lodo de digestor anaeróbio	35	Casca de arroz	64.95	
Lodo de digestor anaeróbio	35	Madeira de pinheiro	62,27	
<i>Thermoanaerobacterium aotearoense</i>	55	Hidrolisado de BCA	298,40	Lai et al. (2014)
Bagaço de cana-de-açúcar in natura	55	BCA pré-tratado	7,7	Ratti et al. (2015)

*Produção de hidrogênio apenas após adição da enzima celulase

2.5. Efeito da temperatura na produção biológica de hidrogênio

A produção biológica de hidrogênio tem sido realizada em condição mesofílica (MU et al., 2006) termofílica (RATTI et al., 2015) termofílica extrema (VAN NIEL et al., 2002) e hipertermofílica (LEVIN; PITT; LOVE, 2004).

A temperatura está diretamente relacionada aos tipos de substrato e inóculo utilizados, resultando em diferentes produções e rendimento de hidrogênio. No entanto, como a solubilidade do hidrogênio é inversamente proporcional à temperatura, tem-se para os sistemas operados em altas temperaturas, maior transferência de H₂ para o biogás em relação aos sistemas mesofílicos (VAN NIEL et al., 2002).

Mu et al. (2006) avaliaram a produção de hidrogênio a partir de glicose utilizando consórcio microbiano misto em diferentes temperaturas mesofílicas (de 33 °C a 41 °C). Em tais condições, a produção e rendimento de H₂ aumentaram com o aumento da temperatura. Produção máxima de 36 mmol H₂/L e rendimento de 0,94 mol H₂/mol glicose foram obtidos a 33°C, enquanto 62 mmol H₂/L e 1,67 mol H₂/mol glicose, foram obtidos a 41°C.

Abreu et al. (2012) obtiveram rendimento de hidrogênio de 0,7 mol/mol de substrato consumido, quando utilizaram glicose/arabinose (2 g/L) em reatores em batelada hipertermofílicos (70°C) inoculados com lodo de reator de leito de lodo granular expandido (EGSB).

Lazaro et al. (2014) estudaram o efeito da temperatura (37 °C e 55 °C) na produção de hidrogênio. Consórcio microbiano misto de lodo metanogênico mesofílico (30 °C) foi utilizado como fonte de microrganismos e vinhaça foi usada como substrato em reatores em batelada (2, 5, 7 e 12 gDQO/L). Em tais condições, os autores obtiveram a maior produção e rendimento de H₂ na condição termofílica (5,0 mmol H₂/g DQO e 2,31 mmol H₂/g DQO, respectivamente) em relação à mesofílica (4,3 mmol H₂/g DQO e 1,99 mmol/g DQO, respectivamente) quando a menor concentração de vinhaça (2 g DQO/L) foi usada como substrato.

Em contrapartida, quando maiores cargas foram aplicadas (5, 7 e 12 gDQO/L), as maiores produções de H₂ foram observadas na condição mesofílica (11,2 mmol, 19 mmol e 28,4 mmol) em relação a condição termofílica (6,3 mmol, 5,3 mmol e 6,7 mmol). Isso provavelmente ocorreu porque os autores utilizaram lodo mesofílico, com microrganismos aclimatados à temperatura de 30°C, tanto na condição mesofílica (37°C) quanto na termofílica (55°C) (LAZARO et al., 2014).

2.6. Efeito do extrato de levedura na produção biológica de hidrogênio

O extrato de levedura é constituído por material solúvel incluindo proteínas, lipídeos, aminoácidos, macro e microelementos minerais (SGARBIERI et al., 1999) e por uma fração insolúvel formada basicamente por parede celular, a qual é rica em β glicana e manana (SANTUCCI et al., 2003). O extrato de levedura é também uma fonte de nitrogênio que estimula o crescimento celular bacteriano e consequentemente aumenta a produção de hidrogênio (HAKOBYAN; GABRIELIAN; TRCHOUNIAN, 2012). Em diversos estudos, o extrato de levedura tem sido usado para favorecer o crescimento de bactérias fermentadoras (MAINTINGUER et al., 2011, 2015, RATTI et al., 2013, 2014).

O rendimento de hidrogênio aumentou de 1,05 mol H₂/mol xilose para 1,46 mol H₂/mol xilose, após adição de 1g/L de extrato de levedura em condição termofílica extrema (70°C) em reator em batelada inoculado com lodo de tratamento de resíduo doméstico (KONGJAN; MIN; ANGELIDAKI, 2009).

Ivanova; Rákhely; Kovács (2009) acrescentaram extrato de levedura (1 g/L) ao meio de cultura para enriquecimento de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* em condição termofílica extrema (70°C). Os autores utilizaram palha de trigo como substrato em reatores em batelada e obtiveram rendimento de 3,8 mol H₂/ mol de glicose.

Rendimento de hidrogênio de 2,03 mol/mol hexose foi obtido por LO et al., 2011 em reator termofílico (60°C) em batelada inoculado com cultura pura de *Clostridium* sp. TCW1, enriquecida em meio de cultura contendo extrato de levedura (1 g/L) e papel como substrato. Menor rendimento de hidrogênio (1,46 mol H₂/mol hexose) foi obtido por Sagnak; Kargi; Kapdan (2011) quando apenas 0,6 g/L de extrato de levedura foi adicionado em reator em batelada mesofílico (37°C) utilizando lodo de estação de tratamento como inóculo e resíduo de trigo como substrato (Tabela 2-4).

O efeito da concentração de extrato de levedura (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6;0,8; 1,0; 2,0 e 4,0 g/L) sobre a produção de hidrogênio foi analisado por ZHANG et al., 2014. Reatores em batelada agitados (150 rpm) foram inoculados com lodo de reator de tanque agitado contínuo (CSTR) do tratamento de efluente de refinaria e incubados em condição mesofílica (35°C) utilizando glicose como substrato (7 g/L). Sob tais condições, Zhang et al., (2014) observaram que a produção de hidrogênio foi maior nos ensaios com extrato de levedura em relação ao ensaio controle (sem extrato de levedura). A maior produção de H₂ foi de 2,09 mmol com 0,4 g/L de extrato de levedura, enquanto no ensaio controle a máxima produção de hidrogênio observada foi de 0,82 mmol (ZHANG et al., 2014).

Tabela 2-4: Rendimento de hidrogênio mol H₂/ mol de glicose) em diferentes condições experimentais utilizando extrato de levedura

Extrato de levedura (g/L)	Temperatura (°C)	Substrato	Inóculo	Reator	Rendimento (mol/mol)	Referência
0,6	37	Resíduo de trigo	Lodo de estação de tratamento	Batelada	1,46	Sagnak; Kargi; Kapdan (2011)
1,0	60	Papel	<i>Clostridium</i> sp. TCW1	Batelada	2,03	Lo et al. (2011)
1,0	70	Palha de trigo	<i>C. saccharolyticus</i>	Batelada	3,80	Ivanova; Rákhely; Kovacs (2009)

2.7. Efeito da concentração de substrato na produção biológica de hidrogênio

A produção biológica de hidrogênio é influenciada pelo tipo e concentração de substrato, sendo os carboidratos os principais substratos utilizados em processos fermentativos (SINGH et al., 2015).

Diversos substratos têm sido utilizados na produção de hidrogênio tais como amido (THI et al., 2015), xilose (MAINTINGUER et al., 2011), papel (BOTTA et al., 2016) e bagaço de cana-de-açúcar (RATTI et al., 2015). Embora, diversos substratos tenham sido utilizados como fonte de carbono em ensaios de produção de hidrogênio, alguns materiais complexos não são favoráveis à fermentação. Ratti et al. (2014), por exemplo, reportaram que produção de hidrogênio a partir de celulose só foi possível após a adição de celulase comercial.

A produção de hidrogênio aumenta com o aumento da concentração de substrato até certo ponto e, posteriormente é reduzida quando são aplicados valores maiores (WANG; WAN, 2009b). Fang; Li; Zhang (2006) reportaram produção crescente de hidrogênio com o aumento da concentração de substrato (licor hidrolisado de arroz à 100°C por 30 minutos) em reator em batelada à 37°C. Em tais condições a produção de hidrogênio aumentou de 115 para

302 mL utilizando-se 2,7 e 8,3 g carboidratos/L e diminuiu para 291 mL quando 11 g carboidratos/L, foi utilizado.

A produção de hidrogênio foi crescente (62,6; 92,6; 155,3; 210,0; 277,0 mL) com o aumento da concentração de substrato (40, 80, 120, 160, 200 g/L, respectivamente) utilizando-se lodo de estação de tratamento de água residuária como inóculo e óleo de mamona (*Jatropha sp*) como substrato à 55°C. No entanto, a produção de hidrogênio diminuiu para 240 mL com a adição de 240 g/L de substrato (KUMAR; LIN, 2013).

Thi et al. (2015) avaliaram o efeito da concentração de amido, variando de 6,95 a 13,05 g/L, bem como a interação da variação de concentração de substrato, ferro e L-cisteína na produção de hidrogênio em reatores em batelada por consórcio microbiano enriquecido de resíduos de animais. Em tais condições, os autores reportaram efeito da interação entre as variáveis independentes no rendimento de hidrogênio cujo valor máximo foi de 91,85 mL/g amido para o ponto central do experimento utilizando-se 10 g/L de amido, 150 mg/L de ferro e 400 mg/L de L-cisteína.

2.8. Produção de ácidos orgânicos, etanol e metano

Em um conceito de biorrefinaria, a biomassa, definida como qualquer matéria orgânica disponível em uma base renovável, como os resíduos agrícolas, são utilizadas como matéria prima em diferentes tecnologias para a geração bioprodutos, tais como ácidos orgânicos e biocombustíveis (SAUER et al., 2008).

A partir da fermentação de biomassas complexas, como o BCA, por consórcio microbiano misto, uma ampla gama de produtos intermediários e subprodutos podem ser gerados de acordo com os parâmetros operacionais, tais como tipo e concentração de substrato, pH, temperatura e outros fatores que afetam a estrutura das comunidades microbianas, sendo o acetato e o butirato os principais produtos da fermentação (GHIMIRE et al., 2015). As reações bioquímicas comumente realizadas por bactérias anaeróbias durante a fermentação geram ácido acético (2) e butírico (3).

Quando a rota do ácido butírico é favorecido são formados concomitantemente 2 mols de hidrogênio, enquanto que quando a rota do ácido acético é favorecida, formam-se 4 mols de hidrogênio (LI; FANG, 2007).

Todavia a rota de bioconversão da biomassa lignocelulósica pode ocorrer via outras rotas bioquímica, resultando na produção de etanol e ácido acético (Equação 4) levando a menor rendimento de hidrogênio (LI; FANG, 2007)

Outras rotas da fermentação envolvem a produção de ácidos propiônico, etanol e ácido láctico, sem a produção de hidrogênio (Equações 5,6 e 7) (GHIMIRE et al., 2015)

De acordo com Guo et al. (2013) durante a bioconversão da biomassa lignocelulósica em reatores em bateladas utilizando consórcio microbiano a rota metabólica que prevalece é a homoacetogênese, na qual o H_2 e o CO_2 , ou diretamente a hexose, são consumidos para a produção de acetato assim, a produção de ácido acético nem sempre esta relacionada à produção de hidrogênio.

Tanto as rotas de produção quanto de consumo de hidrogênio, podem ser desempenhadas por bactérias do gênero *Clostridium* (GUO et al., 2013) organismos dominantes em consórcios microbianos fermentadores mesofílicos e termofílicos.

Além das bactérias homoacetogênicas, outros microrganismos desempenham rotas metabólicas de consumo do hidrogênio, como as arqueias metanogênicas e as bactérias redutoras de sulfato (BRS) (GHIMIRE et al., 2015). As reações de consumo de hidrogênio via metanogênese hidrogenotrófica e redução do sulfeto estão descritas nas equações 8 e 9.

A produção biológica de ácidos orgânicos é uma promissora abordagem para obtenção de compostos químicos conhecidos como “*building blocks*”, a partir de fontes renováveis de carbono com potencial aplicação biotecnológica. A maioria destes compostos são produzidos naturalmente via metabolismo microbiano e possuem aplicações, principalmente como matéria prima para a indústria química. Os ácidos acético, butírico, láctico e propiônico, por exemplo, podem ser usados na produção de solventes, medicamentos, polímeros biodegradáveis e alimentos, respectivamente (SAUER et al., 2008). Assim, os avanços na produção desses ácidos a partir de biomassas complexas, como o BCA, apresentam diretrizes para o futuro desenvolvimento neste campo que caminha em rápida evolução.

2.9. Planejamento experimental

Como reportando anteriormente, muitas variáveis podem afetar a produção biológica de hidrogênio a partir de biomassa lignocelulósica. Assim, o efeito dessas variáveis tem sido amplamente investigado, todavia, de forma geral monitora-se a influencia de um fator por vez em determinada resposta. A principal desvantagem deste tipo de ensaio é a impossibilidade de observar os efeitos de interação entre duas ou mais variáveis além do fato de requerer muitos ensaios quando objetiva-se avaliar o efeito de diferentes variáveis (BEZERRA et al., 2008).

Assim, a aplicação de ferramentas estatísticas multivariadas tem sido realizadas para avaliar o efeito de múltiplas variáveis e otimizar a resposta, como a metodologia de superfície de resposta (RSM) e o delineamento composto central (CCD). O CCD é um planejamento fatorial de cinco níveis amplamente utilizado para a RSM com o objetivo de estimar uma aproximação polinomial de segunda ordem para uma variável resposta normalmente constituído por um delineamento fatorial completo 2^n , delineamentos axiais $2 \times n$ e delineamentos centrais (WANG; WAN, 2009a). A partir da RSM, um modelo polinomial é ajustado aos dados experimentais refletindo o comportamento de um conjunto de resultados de modo a permitir a predição da variável resposta que é afetada por muitas variáveis. O objetivo da aplicação desta técnica estatística é otimizar variáveis independentes de modo a obter o melhor desempenho do sistema (BEZERRA et al., 2008).

Variáveis independentes são fatores experimentais que podem ser alteradas independentemente umas das outras, tais como pH, temperatura, concentração de substratos e nutrientes, entre outros. Os níveis de uma variável independente são os valores de cada variável que devem ser experimentadas, por exemplo, a variável dependente pH pode ser experimentada nos níveis pH 4, 5, 6, 7 e 8, por exemplo. Variável resposta são os resultados obtidos a partir da experimentação, que podem ser absorbância, intensidade de emissão líquida, sinal elétrico, produção de um gás, entre outros. Por fim o resíduo é a diferença entre o resultado observado e calculado e, portanto, um modelo é considerado adequado quando apresenta baixos valores residuais (BEZERRA et al., 2008).

A RSM é um dos métodos mais utilizados para otimização de processos químicos e bioquímicos. Mu; Zheng; Yu (2009) avaliaram o efeito do pH, temperatura e concentração inicial de glicose na produção de hidrogênio por RSM. Da Cruz et al. (2012) otimizaram a temperatura e tempo de exposição do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar para maximizar a produção de etanol.

2.10. Metagenômica

Resíduos sólidos orgânicos, tais como as biomassas lignocelulósicas, são utilizados como substratos no processo de digestão anaeróbia para produção de biocombustíveis e outros bioprodutos por consórcio microbiano complexo. As ferramentas de biologia molecular, comumente utilizadas, como sequenciamento do 16S e hibridização fluorescente *in situ*, para caracterização microbiana, no entanto, não permitem o acesso a informações completas em relação à estrutura e às funções desempenhadas pelos microrganismos da digestão anaeróbia. Assim, o sequenciamento de alta performance, utilizando ferramentas da Metagenômica, como o Illumina HiSeq, é um instrumento poderoso para avaliação da estrutura da comunidade microbiana e dos papéis desempenhados pelos diferentes microrganismos na bioconversão de resíduo em produtos de valor biotecnológicos (GUO et al., 2015).

A partir da análise de Metagenômica é possível avaliar, tanto os perfis taxonômicos, quanto o potencial funcional dos consórcios microbianos, de modo que são acessadas informações mais detalhadas sobre o potencial genético e da estrutura das comunidades microbianas possibilitando, juntamente com os parâmetros físico-químicos e operacionais dos reatores, melhor compreensão das rotas metabólicas desempenhadas nos sistemas de tratamento de biomassas complexas (DELFORNO et al., 2017).

Devido à complexidade das biomassas lignocelulósicas e da necessidade emergencial de fontes alternativas de combustíveis renováveis, o conhecimento sobre as rotas microbianas envolvidas na conversão dessas biomassas, bem como a resistência potencial dos microrganismos frente a estresses ambientais é de fundamental importância para a indústria biotecnológica. Neste sentido, consórcios microbianos capazes de degradar a biomassa lignocelulósica são fontes de conhecimentos sobre enzimas hidrolíticas que podem reduzir os custos dos coquetéis enzimáticos utilizados na produção de compostos de valor agregado como, por exemplo, o etanol de segunda geração (COLOMBO et al., 2016).

Assim, análise de Metagenômica tem sido utilizada para acessar as comunidades microbianas de ambientes naturais e artificiais (WHITE et al., 2016; YANG et al., 2014). Neste estudo as comunidades microbianas, bem como o potencial funcional de consórcios microbianos de reatores em bateladas com elevada produção de hidrogênio a partir do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado em sistema hidrotérmico (200 °C por 10 minutos a 16 bar) em condição termofílica (60 °C) e mesofílica (37 °C) foram avaliados por sequenciamento de alto desempenho (Illumina HiSeq) e a partir dos resultados destaca-se o papel de enzimas potencialmente úteis na fermentação de substratos lignocelulósicos.

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

3.1. Hipótese Central

A partir da revisão da literatura levantou-se a hipótese de que seria possível a produção de hidrogênio a partir do bagaço de cana-de-açúcar como substrato utilizando consórcio microbiano proveniente de lodo de reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB) e a partir de consórcio microbiano proveniente da mistura de solo e de compostagem em reatores em batelada a 55 e 37 °C, respectivamente. De acordo com as etapas estudadas, a hipótese central foi subdividida em:

- **Sub-hipótese 1:** O pré-tratamento do inóculo é fundamental para a inibição de microrganismos consumidores de hidrogênio e favorecimento de bactérias celulolíticas e fermentadoras;
- **Sub-hipótese 2:** A composição do meio de cultura afeta o crescimento microbiano e consequentemente a produção de metabólitos;
- **Sub-hipótese 3:** O extrato de levedura usado como suplementação de nitrogênio no meio de cultura não é utilizado como substrato pelos microrganismos fermentadores;
- **Sub-hipótese 4:** O pré-tratamento do BCA é fundamental para a conversão da celulose em açúcares fermentáveis, aumentando o acesso de bactérias ao substrato lignocelulósico;
- **Sub-hipótese 5:** A severidade do pré-tratamento hidrotérmico é determinante para a produção de metabólitos, uma vez que são formados inibidores como o furfural e 5-HMF que podem comprometer o crescimento dos microrganismos;
- **Sub-hipótese 6:** Fatores como a concentração de extrato de levedura, concentração de substrato e temperatura afetam a dinâmica microbiana e, consequentemente, a produção de hidrogênio e ácidos orgânicos voláteis.

3.2. Objetivo Geral

O objetivo principal deste estudo foi avaliar a produção biológica do gás hidrogênio a partir do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado em condição termofílica e mesofílica em reatores anaeróbios em batelada. Neste contexto, objetivos específicos foram elaborados para avaliar detalhadamente a produção de hidrogênio nas condições estabelecidas.

- **Objetivo Específico 1:** Avaliar o pré-tratamento do inóculo termofílico para inibir microrganismos consumidores de hidrogênio, como as arqueias metanogênicas em condição termofílica;
- **Objetivo Específico 2:** Avaliar a aplicação de consórcio microbiano celulolítico e fermentador na produção de H₂;
- **Objetivo Específico 3:** Avaliar as condições de enriquecimento para bactérias celulolíticas e fermentadoras;
- **Objetivo Específico 4:** Comparar a produção de hidrogênio a partir de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado;
- **Objetivo Específico 5:** Avaliar o efeito da concentração de extrato de levedura e temperatura na produção biológica de hidrogênio, por planejamento experimental em condição termofílica;
- **Objetivo Específico 6:** Avaliar o efeito da concentração de extrato de levedura e da concentração de substrato na produção biológica de hidrogênio, por planejamento experimental em condição mesofílica;
- **Objetivo Específico 7:** Avaliar a quantidade e qualidade de açúcares e ácidos orgânicos produzidos nos ensaios do planejamento experimental;
- **Objetivo Específico 8:** Comparar a produção de hidrogênio nos ensaios do planejamento experimental;
- **Objetivo Específico 9:** Avaliar o perfil da comunidade bacteriana por meio de PCR/DGGE;
- **Objetivo Específico 10:** Avaliar a composição taxonômica e funcional dos microrganismos do reator de maior produção de hidrogênio do planejamento fatorial.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Esquema Operacional

Neste estudo, a produção biológica de hidrogênio e outros bioprodutos foi realizada a partir do bagaço de cana-de-açúcar em condição termofílica e mesofílica, para tanto, foram utilizados dois inóculos: (1) lodo de reator anaeróbico de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB) do tratamento de vinhaça da Usina São Martinho e (2) solo e compostagem da área 2 da EESC-USP, separadamente em reatores em batelada (Figura 4-1).

Figura 4-1:Esquema operacional

4.2. Inóculos

O inóculo usado nos ensaios em condição termofílica foi proveniente de reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB) operado a 55°C e cedido pela Usina São Martinho (Pradópolis – SP). As amostras foram armazenadas em frascos de vidro e estocadas a 4°C, para reduzir a atividade biológica e química até o momento de uso. O inóculo termofílico foi pré-tratado, para eliminação de arqueias metanogênicas (Figura 4-4). Foram realizados pré-tratamentos ácido (pH 3 por 20 horas - HCl 1M), térmico (100°C por 10 minutos) e diluição seriada (10^0 a 10^{-4}).

Figura 4-2: Condições dos pré-tratamentos ácido, térmico e diluição seriada do inóculo termofílico.

No tratamento ácido do inóculo termofílico, 25 mL de lodo foi adicionado em erlenmayer (100 mL), no qual foi adicionado HCl-1M até pH 3,0. A solução foi mantida por 24 horas em temperatura (REN et al., 2008). No tratamento térmico, 25 mL de lodo foi adicionado em erlenmayer (100 mL) e aquecido a 100°C por 10 minutos, em chapa aquecedora. A diluição seriada consistiu na adição de 25 mL de lodo bruto (10^0) em 225 mL de meio de cultura (Kawagoshi et al., 2005) com diluição sucessiva até (10^{-4}).

O inóculo termofílico pré-tratado (10% volume reacional) foi usado como fonte de microrganismos em reatores em batelada de 100 mL (50 mL volume reacional e 50 mL de *headspace*) alimentados com BCA tratado por explosão a vapor (0,5 g/L). Os ensaios foram realizados em duplicata, totalizando 6 reatores, utilizando o meio de cultura Kawagohi et al. (2005) em pH inicial 6 e incubados em condição termofílica (55°C). O inóculo usado nos ensaios em condição mesofílica foi solo de uma área florestada do *Campus 2* e solo de compostagem do *Campus 1* da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (São Carlos – SP), ambos coletados à aproximadamente 10 cm de profundidade.

4.3. Meio de Cultura

Foram comparados meios de cultura, com os quais alta produção de hidrogênio foi reportada na literatura: (1) Del Nery (1987); (2) Logan et al. (2002); (3) Kawagoshi et al., (2005) - modificado, (4) ATLAS (2005) - modificado e (5) Lo et al. (2009) (Tabela 4-1).

Tabela 4-1: Composição dos meios de cultura

Componentes	Del Nery (1987)	Logan et al. (2002)	Kawagoshi et al. (2005)	ATLAS (2005)	Lo et al, (2009)
Quantidades - q.s.p. 1000 mL de água ultra purificada					
NH ₄ HCO		2,00 g			3,80 g
KH ₂ PO ₄	0,00536 g	1,20 g	1,00 g	0,18 g	
MgSO ₄		0,20 g			
NaMoO ₄		0,20 g		0,01 g	
MnSO ₄		0,20 g	0,20 g	5,00 g	
FeCl	0,00025 g	0,40 g	0,05 g		
K ₂ HPO ₄	0,00130 g		1,00 g	0,29 g	0,12 g
NH ₄ NO ₃			1,00 g		
CaCl ₂	0,00206 g		0,02 g	0,06 g	
NaCO ₃					2,00 g
CuSO ₄				0,01 g	0,005 g
MgCl ₂				0,12 g	0,015 g
CoCl ₂	0,00004 g			1,00 g	0,0001 g
FeSO ₄	0,00250 g			2,10 g	0,025 g
Ureia	0,04000 g				
NiSO ₄	0,00050 g				
SeO ₂	0,00014 g				
NaHPO ₄	0,00276 g				
Solução de biotina	1,0 mL (1)				
Solução de vitaminas	1,0 mL (1)			10 mL (2)	
NaHCO ₃				2,10 g	
NH ₄ Cl				0,68 g	
Ácido nitriloacético				1,50 g	
NaCl				1,00 g	
ZnSO ₄				1,00 g	
KAl(SO ₄) ₂				0,01 g	
H ₃ BO ₃				0,01 g	
Extrato de levedura	1,00 g		1,00 g	1,00 g	

Aos meios de cultura Del Nery (1987) e Atlas (2005) foram adicionadas soluções de biotina e vitaminas (Tabela 4-2). Tais soluções foram preparadas pela dissolução dos componentes em água ultra purificada e filtradas em sistema Millipore, com filtro de membrana de 0,22µm de porosidade, previamente esterilizados em autoclave a 121°C e 1 atm de pressão durante 20 minutos.

Tabela 4-2: Composição das soluções de biotina e vitaminas

Componentes	Quantidades - q.s.p. 1000 mL de água ultra purificada
Solução de Biotina (1)	
Ácido p-aminobenzóico	40 mg
Biotina	10 mg
Solução de Vitaminas (1)	
Vitamina B12	40 mg
Solução de Vitaminas (2)	
Piridoxidina-HCl	10 mg
DL – Pantotenato de cálcio	5 mg
Ácido lipóico	5 mg
Ácido nicotínico	5 mg
Ácido <i>p-aminobenzóico</i>	5 mg
Riboflavina	5 mg
Tiamina	5 mg
Biotina	2 mg
Ácido fólico	2 mg
Vitamina B12	2 mg

(1) Meio Del Nery (1987); (2) Meio Atlas (2005).

Os meios de cultura descritos anteriormente foram testados em ensaios de produção de hidrogênio independentes (Bloco 1, 2 e 3) em condição mesofílica (37°C) e termofílica (55°C). No bloco 1 os meios Logan et al. (2002); Kawagoshi et al. (2005) e Lo et al. (2009) foram utilizados como fonte de nutrientes para o crescimento de bactérias celulolíticas e produtoras de hidrogênio. No bloco 2, os meios de cultura Del Nery (1987) e Kawagoshi et al. (2005) foram comparados quanto a produção de hidrogênio. Por fim no bloco 3, os meios de cultura Kawagoshi et al. (2005) e Atlas (2005) foram comparados quanto a produção de hidrogênio (Figura 4-5).

Figura 4-3: Esquema dos ensaios de comparação de meios de cultura

No bloco 1, reatores em batelada com volume final de 500 mL (250 mL de volume reacional + 250 mL de *headspace*) foram realizados utilizando BCA *in natura* (0,5 g/L) como substrato. No bloco 2, foram realizados reatores em batelada com volume final de 1L (500 mL de volume reacional + 500 mL de *headspace*) utilizando glicose (1 g/L) como substrato. No bloco 3, reatores em batelada com volume final de 100 mL (50 mL de volume reacional e 50 mL de *headspace*) foram realizados utilizando glicose (2 g/L) como substrato.

Nos ensaios termofílico e mesofílico foram adicionados (20 % do volume reacional dos reatores) do lodo anaeróbio de reator UASB e solo como inóculos, respectivamente pré-tratados por diluição seriada (10^{-4}). Todos os ensaios foram realizados em duplicatas, totalizando 24 reatores, com pH inicial do meio de 6,0 e temperatura de incubação de 55 ou 37°C. Após a inoculação todos os reatores foram submetidos à atmosfera de N₂ (100%) durante 20 minutos para a troca gasosa no volume reacional do *headspace*, de forma a manter o ambiente anaeróbio.

4.4. Substrato

O BCA *in natura* e pré-tratado por explosão a vapor foi cedido pela Usina São Martinho (Pradópolis, SP). A explosão a vapor do bagaço (700 kg) foi realizada em um reator piloto com capacidade de 5.000 L, a 200°C por 7 minutos. Após o pré-tratamento por explosão a vapor, a fração sólida do bagaço foi lavada com água ultrapura para remoção de açúcares residuais. Em todos os ensaios realizados no presente estudo utilizou-se a fração sólida do BCA.

4.4.1. Pré-tratamento do substrato

4.4.1.1. Explosão a vapor

O BCA pré-tratado por explosão a vapor e *in natura*, ambos cedidos pela Usina São Martinho (Pradópolis, SP) foram usados como substrato (0,5 g/L) em ensaios de produção de hidrogênio em reatores em batelada (1L) utilizando solo bruto (10% volume do reator) como inóculo à 37°C em triplicatas (totalizando 9 reatores). O meio de cultura Kawagoshi et al (2005) com pH ajustado para 6,0 e suplementado com extrato de levedura (1,0 g/L) foi utilizado como fonte de nutrientes. No reator controle utilizou-se glicose (0,5 g/L) como substrato (Tabela 4-3).

Tabela 4-3: Condições de substratos usados como fontes de carbono para produção de H₂

Condição	Substratos (0,5 g/L)
A1	Controle (Glicose)
A2	BCA (explosão a vapor)
A3	BCA (<i>in natura</i>)

4.4.1.2. Autoclave e Biológico

O BCA *in natura* (0,5 g/L) foi transferido para frasco de 50 mL e autoclavado à 121°C por 15 minutos. O resíduo sólido gerado foi utilizado como substrato em etapas subsequentes.

Pré-tratamento biológico foi realizado utilizando-se o fungo *Aspergillus niger* - (ATCC 10577) obtido da Fundação André Tosello (Campinas – SP). O BCA (0,5 g/L) *in natura* e autoclavado (121°C por 15 minutos) foram mantidos em temperatura ambiente durante 31 dias em meio de cultura Mandels; Weber (1969) e incubado com $4,9 \times 10^8$ esporos/mL de *Aspergillus niger* em erlenmeyer (125 mL).

Após o pré-tratamento biológico, com o fungo, e/ou térmico, autoclave, o BCA (0,5 g/L) foi usado como substrato para a produção de H₂ (Tabela 4-4) em reatores em batelada de 500 mL de volume total (250 mL de meio reacional e 250 mL de *headspace*) em condição mesofílica (37°C). CMC (Carboxymetilcellulose) e glicose (0,5 g/L) foram usados como substratos nos ensaios controle.

Tabela 4-4: Condições de substratos usados como fontes de carbono para produção de H₂

Substratos (0,5 g/L)	
B-1	BCA pré-tratamento térmico + biológico
B-2	BCA pré-tratamento biológico
B-3	BCA pré-tratamento térmico
B-4	BCA <i>in natura</i>
B-5	Glicose
B-6	CMC

Neste ensaio os microrganismos foram extraídos de amostra de solo. Para tanto, 100 g de solo foi adicionado em erlenmayer (125 mL) em solução contendo Tween-80 (0,1%) e pirofosfato de sódio (0,1%) e agitado por 20 minutos a 220 rpm. Em seguida, 50 mL do sobrenadante (20% do volume final do reator) foram diluídos (10^{-4}) e usados como inóculo. Foi empregado meio de cultura celulolítico (Atlas, 2005) em pH ajustado para 6. O ensaio foi realizado em triplicata, totalizando 18 reatores, submetidos a atmosfera de N₂ (100%).

4.4.1.3. Hidrotérmico

O pré-tratamento hidrotérmico foi realizado no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo. O sistema hidrotérmico foi planejado e construído em colaboração com o Prof. Dr. Paulo Seleguin

Junior do Departamento de Engenharia Mecânica da Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo.

O aparato experimental para o pré-tratamento hidrotérmico utilizado neste estudo, consistiu de um tanque para aquecimento da água e biomassa (capacidade de 100 mL), um ciclone de separação das frações líquida e sólida e painel elétrico (Figura 4-6). A pressão máxima alcançada pelo sistema é de 50 bar.

Figura 4-4: Sistema de pré-tratamento supercrítico para tratamento hidrotérmico da biomassa lignocelulósica constituído por reservatório (1), aquecedor (2), ciclone (3), Controlador PID (4), válvula d exaustão (5) e sensores de temperatura e pressão (6).

4.4.1.4. Efeito do pré-tratamento hidrotérmico do BCA na produção de hidrogênio

O inóculo termofílico diluído (10^{-4}) foi aclimatado em meio de cultura Atlas, 2005 (400 mL) (Tabela 4-1) com CMC como substrato. Quinzenalmente, a biomassa aclimatada foi reativada em novo meio de cultura, nas mesmas condições descritas anteriormente. O inóculo aclimatado em CMC (50 mL) foi usado como fonte de microrganismos em ensaios de produção de hidrogênio em reatores em batelada de 500 mL de volume final (250 mL volume reacional e 250 mL de *headspace*).

Bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado e glicose (0,5 g/L) foram usados como substratos para produção de hidrogênio (Tabela 4-5). Todos os ensaios foram

realizados em triplicatas, totalizando 9 reatores, usando o meio de cultura Atlas (2005) como fonte de nutrientes, ajustado para pH 6,0 e incubados à 55°C.

Tabela 4-5: Substratos utilizados para produção de H₂ em condição termofílica

Substratos (0,5 g/L)	
E1	Bagaço <i>in natura</i>
E2	Bagaço pré-tratado (210°C a 20 bar por 15 minutos)
E4 (controle)	Glicose

4.4.1.5. Efeito da severidade do pré-tratamento hidrotérmico

O pré-tratamento hidrotérmico do BCA (5 g) foi realizado em um sistema de pré-tratamento hidrotérmico supercrítico (Figura 4-6). A severidade do processo, isto é a intensidade do tratamento, foi calculada estabelecendo-se uma correlação entre temperatura e tempo de retenção (Equação 1). Ensaios de produção de hidrogênio foram realizados em reatores em batelada com volume total de 100 mL (50 mL de meio reacional e 50 mL de *headspace*) em condição termofílica (55°C) em triplicatas totalizando 15 reatores (Tabela 4-6). A fração sólida do BCA pré-tratado (2,0g/L) foi utilizada como substrato e lodo de reator UASB diluído (10⁻⁴) como inóculo. O meio de cultura ATLAS (2005) usado para o cultivo do consórcio microbiano foi modificado pela suplementação com extrato de levedura (1 g/L) com pH ajustado para 6,0. Todos os reatores foram submetidos à atmosfera de N₂ (100%) para promover a anaerobiose do sistema.

Tabela 4-6: Condições da fração sólida do BCA para a produção de H₂

Severidade do pré-tratamento		BCA fração sólida
B1	-	<i>In natura</i>
B2	2,77	150°C/ 20 minutos; 4 bar
B3	3,88	190°C/ 17 minutos; 11 bar
B4	3,94	200°C/ 10 minutos; 16 bar
B5	4,41	210°C/ 15 minutos; 20 bar

4.4.1.6. Deslignificação alcalina

A fração sólida resultante do pré-tratamento hidrotérmico do BCA foi armazenada em frascos Duran de 250 mL e submetida à etapa de deslignificação a partir do tratamento alcalino com NaOH (1,0 % m/v) em autoclave a 121°C por 30 minutos. Após o pré-tratamento, a fração sólida foi lavada em água corrente e transferida para bandeja de alumínio

e mantida em temperatura ambiente por 24 horas e usada como substrato em ensaios fermentativos para produção de hidrogênio.

O inóculo termofílico foi diluído (10^{-1} a 10^{-4}) em meio de cultura Atlas (2005) para reduzir a atividade metanogênica. A diluição 10^{-4} foi usada como fonte de microrganismos para os ensaios termofílicos. Os reatores anaeróbios em batelada com volume total de 500 mL (250 mL de *headspace* e 250 mL de meio reacional) em duplicata, totalizando 10 reatores, foram incubados em condição termofílica (55°C). O meio reacional foi constituído de meio Atlas (2005) com pH ajustado para 6,0, inóculo diluído (10^{-4}) (10% - v/v), e substrato nas condições descritas na Tabela 4-7.

Tabela 4-7: Condições dos ensaios termofílicos com a fração sólida do bagaço de cana-de-açúcar ou glicose como substrato para produção de hidrogênio.

Substratos (2,0 g/L)	
Controle	Glicose
C1	Bagaço <i>in natura</i>
C2	Bagaço pré-tratamento hidrotérmico
C3	Bagaço pré-tratamento hidrotérmico + pré-tratamento alcalino
C4	Bagaço pré-tratamentos hidrotérmico e alcalino (1,0 g/L) + <i>in natura</i> (1,0 g/L)

4.5. Suplementação do meio de cultura com extrato de levedura

O efeito da suplementação do meio de cultura (Atlas, 2005), com extrato de levedura, foi testado em relação à produção de hidrogênio (Tabela 4-8).

Ensaio de produção de hidrogênio foram realizados em reatores em batelada com volume final de 100 mL (50 mL de meio reacional e 50 mL de *headspace*) em condição termofílica (55°C), inoculado com lodo de reator UASB diluído (10^{-4}) usado no tratamento de vinhaça, em triplicatas, totalizando 9 reatores.

O meio de cultura anaeróbio de celulose (Atlas, 2005) foi usado para enriquecimento microbiano em três condições denominadas C1, C2 e C3 conforme descrito na tabela 4-8. Na condição C1 utilizou-se BCA (2,0 g/L) como substrato e extrato de levedura como fonte de nutrientes (1,0/L). Em C2 apenas extrato de levedura foi adicionado ao meio de cultura (1,0 g/L), enquanto em C3 apenas BCA pré-tratado hidrotérmicamente (2,0 g/L) foi usado ao meio de cultura. O pH do meio de cultura foi ajustado para 6,0.

Tabela 4-8: Condições dos ensaios termofílicos do efeito da suplementação com extrato de levedura

Condição	Substratos
C1	2 g/L BCA pré-tratado (210°C por 15 minutos) + 1 g/L Extrato de levedura
C2	1 g/L Extrato de levedura
C3	2 g/L BCA pré-tratado (210°C por 15 minutos)

4.6. Planejamento Fatorial Termofílico

Para analisar a influência da temperatura e concentração de extrato de levedura na produção de H_2 foi empregado planejamento fatorial (1) em cinco níveis (+1; -1; 0; +1,42; -1,42) com três repetições do ponto central, resultando em 11 condições (Tabela 4-9), sendo que cada uma foi realizada em triplicata, com o total de 33 reatores em batelada. Para tanto, reatores em bateladas de 1 L (500 mL de meio reacional e 500 mL de *headspace*) foram alimentados com a fração sólida do BCA pré-tratado hidrotermicamente (200°C por 10 minutos) e inoculados (10% v/v) com lodo de reator UASB diluído (10^{-4}). O meio de cultura utilizado nesta etapa foi o Atlas (2005) com pH ajustado para 6. Após a inoculação os reatores foram submetidos à atmosfera de N_2 (100%) durante 20 minutos para a troca gasosa no volume reacional do *headspace*, de forma a manter o ambiente anaeróbio, e, incubados nas diferentes temperaturas de acordo com o planejamento fatorial (Tabela 4-9).

Visando otimizar os resultados obtidos no planejamento fatorial (1), descrito na Tabela 4-9, foram realizados dois ensaios exploratórios (Box Hunter & Hunter) para definir temperaturas de incubação superiores às aplicadas no planejamento (1). Para tanto, foram realizados ensaios em dois níveis (+1; -1) e em triplicatas, resultando em 24 reatores. Nestes ensaios, a fração sólida do BCA pré-tratado hidrotérmicamente (200°C por 10 minutos) foi usada como substrato e lodo de reator UASB foi usado como inóculo (diluído em 10^{-4}).

Tabela 4-9: Planejamento fatorial (1) do efeito da concentração de substrato e extrato de levedura na produção de hidrogênio

Condições	Normalização	Extrato de levedura (g/L)	Normalização	Temperatura (°C)
C1	+1	3	+1	60,0
C2	-1	1	+1	60,0
C3	+1	3	-1	40,0
C4	-1	1	-1	40,0
C5	0	2	0	50,0
C6	0	2	0	50,0
C7	0	2	0	50,0
C8	+1,42	3,42	0	50,0
C9	-1,42	0,58	0	50,0
C10	0	2	+1,42	64,2
C11	0	2	-1,42	35,8

Reatores em batelada de 500 mL (250 mL de meio reacional e 250 mL de *headspace*) foram realizados em triplicatas, sendo confeccionados 24 reatores em batelada. O meio de cultura utilizado nesta etapa foi o Atlas, (2005) com pH ajustado para 6. Após a inoculação os reatores foram submetidos à atmosfera de N₂ (100%) durante 20 minutos para a troca gasosa no volume reacional do *headspace*, de forma a manter o ambiente anaeróbio, e, incubados em diferentes temperaturas (Tabela 4-10).

A partir dos resultados obtidos na análise exploratória, novo planejamento fatorial (2) foi realizado (Tabela 4-11). Ensaios foram realizados em reatores em batelada com volume final de 1L (500 mL de meio reacional e 500 mL de *headspace*), inoculados com lodo de reator UASB (diluição 10⁻⁴) em triplicatas totalizando 33 reatores em batelada. O substrato utilizado neste ensaio foi a fração sólida do BCA pré-tratado em reator hidrotérmico (200°C por 10 minutos). O meio de cultura utilizado nesta etapa foi o Atlas, (2005) com pH ajustado para 6. Após a inoculação os reatores foram submetidos à atmosfera de N₂ (100%) durante 20 minutos para a troca gasosa no volume reacional do *headspace*, de forma a manter o ambiente anaeróbio e, incubados em diferentes temperaturas de acordo com o planejamento fatorial.

Tabela 4-10: Análise exploratória – Box Hunter & Hunter

Condições	Normalização	Extrato de levedura (g/L)	Normalização	Temperatura (°C)
Box Hunter & Hunter (1)				
C1	+1	3	+1	60,0
C2	-1	1	+1	60,0
C3	+1	3	-1	40,0
C4	-1	1	-1	40,0
Box Hunter & Hunter (2)				
C1	+1	3	+1	90,0
C2	-1	1	+1	90,0
C3	+1	3	-1	60,0
C4	-1	1	-1	60,0

Tabela 4-11: Planejamento fatorial (2) do efeito da concentração de substrato e extrato de levedura na produção de hidrogênio

Condições	Normalização	Extrato de levedura (g/L)	Normalização	Temperatura (°C)
C1	+1	1,00	+1	50,0
C2	-1	3,00	+1	50,0
C3	+1	1,00	-1	70,0
C4	-1	3,00	-1	70,0
C5	0	2,00	-1,42	45,8
C6	0	2,00	+1,42	74,2
C7	0	0,58	0	60,0
C8	+1,42	3,42	0	60,0
C9	-1,42	2,00	0	60,0
C10	0	2,00	0	60,0
C11	0	2,00	0	60,0

4.7. Planejamento Fatorial Mesofílico

Para analisar a influência da concentração de extrato de levedura e substrato na produção de H_2 foi empregado planejamento fatorial (1) em cinco níveis (+1; -1; 0; +1,42; -1,42) com três repetições do ponto central, resultando em 11 condições (Tabela 4-12), sendo que cada uma foi realizada em triplicata totalizando 33 condições experimentais. Para tanto, reatores em bateladas de 1 L (500 mL de meio reacional e 500 mL de *headspace*) foram alimentados com a fração sólida do BCA e inoculados (10% v/v) com consórcio microbiano do MIX (solo+compostagem) pré-tratado com 10 mM BES em meio de cultura. O meio de cultura utilizado nesta etapa foi aquele descrito por Atlas, (2005) com pH ajustado para 6. Após a inoculação os reatores foram submetidos à atmosfera de N_2 (100%) durante 20 minutos para a troca gasosa no volume reacional do *headspace*, de forma a manter o ambiente anaeróbio, e, incubados à 37°C.

Tabela 4-12: Planejamento fatorial (1) do efeito da concentração de substrato e de extrato de levedura na produção de hidrogênio

Condições	Normalização	Extrato de levedura (g/L)	Normalização	BCA (g/L)
C1	+1	3	+1	4
C2	-1	1	+1	4
C3	+1	3	-1	2
C4	-1	1	-1	2
C5	0	2	0	3
C6	0	2	0	3
C7	0	2	0	3
C8	+1,42	3,42	0	3
C9	-1,42	0,58	0	3
C10	0	2	+1,42	4,42
C11	0	2	-1,42	1,58

Visando otimizar os resultados obtidos no planejamento fatorial (1), descrito na Tabela 2-12, foram realizados dois ensaios exploratórios (Box Hunter & Hunter) para definir concentrações de substrato e extrato de levedura superiores às aplicadas no planejamento (1). Para tanto, foram realizados ensaios em dois níveis (+1; -1) e em triplicatas, resultando em 24 reatores. Nestes ensaios, BCA pré-tratado (200°C por 10 minutos) foi usado como substrato e

consorcio microbiano MIX pré-tratado (10 mM BES no meio de cultura) foi usado como inóculo. Reatores em batelada de 500 mL (250 mL de meio reacional e 250 mL de *headspace*) foram realizados em triplicatas com meio Atlas (2005) e pH ajustado para 6. Após a inoculação os reatores foram submetidos à atmosfera de N₂ (100%) durante 20 minutos para a troca gasosa no volume reacional do *headspace*, de forma a manter o ambiente anaeróbio, e, incubados a 37°C (Tabela 4-13).

Tabela 4-13: Análise exploratória – Box Hunter & Hunter

Condições	Normalização	Concentração de extrato de levedura (g/L)	Normalização	Concentração de BCA (g/L)
Box Hunter & Hunter (1)				
C1	+1	3	+1	4
C2	-1	1	+1	4
C3	+1	3	-1	2
C4	-1	1	-1	2
Box Hunter & Hunter (2)				
C1	+1	20	+1	20
C2	-1	4	+1	20
C3	+1	20	-1	4
C4	-1	4	-1	4

A partir dos resultados obtidos na análise exploratória, foi realizado novo planejamento fatorial (2) (Tabela 4-14). Ensaios foram realizados em reatores em batelada com volume final de 1L (500 mL de meio reacional e 500 mL de *headspace*), inoculados com consórcio microbiano MIX pré-tratado (10 mM BES no meio de cultura) em triplicatas totalizando 33 Condições experimentais. O substrato utilizado foi a fração sólida do BCA pré-tratado (200°C por 10 minutos). Foi usado meio Atlas (2005) em pH ajustado para 6. Após a inoculação os reatores foram submetidos à atmosfera de N₂ (100%) durante 20 minutos para a troca gasosa no volume reacional do *headspace*, de forma a manter o ambiente anaeróbio e, incubados à 37°C.

A partir do planejamento fatorial mesofílico 2, condições ótimas da concentração de extrato de levedura (2,77 g/L) e BCA (5,84 g/L) foram alcançadas. A partir disto ensaio de

validação foi realizado em reator em batelada de 5 L (2,5L de headspace e 2,5 L de meio reacional) inoculados com consórcio microbiano MIX pré-tratado (10 mM BES no meio de cultura) em triplicatas à 37 °C. O meio de cultura utilizado foi o Atlas (2005) com pH ajustado para 6,0. Após a inoculação os reatores foram submetidos à atmosfera de N₂ (100%) durante 20 minutos para a troca gasosa no volume reacional do *headspace*, de forma a manter o ambiente anaeróbio.

Tabela 4-14: Planejamento fatorial (2) do efeito da concentração de substrato e de extrato de levedura na produção de hidrogênio

Condições	Normalização	Extrato de levedura (g/L)	Normalização	BCA (g/L)
C1	+1	3,00	+1	6,00
C2	-1	1,00	+1	6,00
C3	+1	3,00	-1	4,00
C4	-1	1,00	-1	4,00
C5	0	2,00	0	5,00
C6	0	2,00	0	5,00
C7	0	2,00	0	5,00
C8	+1,42	3,42	0	5,00
C9	-1,42	0,58	0	5,00
C10	0	2,00	+1,42	6,42
C11	0	2,00	-1,42	3,58

4.8. Análises físico-químicas e cromatográficas

A determinação de álcoois foi realizada por cromatografia líquida segundo Lazaro et al. (2008). Análise de pH foi realizada de acordo com APHA (2005). Ácidos orgânicos foram determinados segundo metodologia descrita por Adorno; Hirasawa; Vareesche (2014) em cromatógrafo gasoso GC-2010 Shimadzu com detector de ionização de chama (FID), com coluna HP INNOWAX de 30m x 0,25mm (diâmetro interno) x 0,25µm (espessura do filme).

A determinação dos gases resultantes da fermentação e metanogênese (H₂, CH₄ e CO₂) foi realizada por meio da retirada de 0,5 mL de amostra gasosa do *headspace*

utilizando-se seringa *gastight* com trava. Para tanto, foi utilizado cromatógrafo a gás Shimadzu GC – 2010 equipado com detector de condutividade térmica (TCD) com coluna Carboxen® 1010 plot 30 m X 0,53 mm, sendo o argônio o gás de arraste. As temperaturas do injetor e do detector foram 220°C e 230°C, respectivamente, e na coluna a temperatura foi 130°C com aquecimento de 46°C min⁻¹ até 135 °C. Os açúcares, furfural e 5-HMF foram quantificados e caracterizados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando sistema Shimadzu, com coluna Aminex HPX-87P, Bio-Rad à 55°C, detector de índice de refração, água filtrada como eluente e fluxo de 0,4 mL/min (SLUITER et al., 2004). A determinação de lignina de Klason foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Sluiter et al. (2004) no qual 0,16 g de BCA foi misturado com 1,5 mL de H₂SO₄ (72 % w/w) em banho Maria à 30°C por 1 hora. Posteriormente, 42 mL de água destilada foram adicionados no frasco, de modo a diluir a concentração do ácido para 4 % w/w. O conteúdo dos frascos foi autoclavado por 1 hora a 120 °C e filtrado em cadinhos de porcelana pré-calcinados, com fibra de vidro e porosidade de 0,2 µm (Sartorius stedim Biotech®). Os sólidos foram levados à estufa a 105 °C por 24 horas, posteriormente à mufla por 3 horas a 550°C e reportados com lignina de Klason de acordo com a equação 10.

$$\% \text{ Lignina de Klason} = \frac{(\text{Peso}_{\text{resíduo}} - \text{Peso}_{\text{Cinzas}})}{\text{Peso seco na estufa}} \times 100 \quad (10)$$

4.9. Microscopia Eletrônica de Varredura

Análises da estrutura do bagaço de cana de açúcar antes e após o pré-tratamento hidrotérmico foram realizadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram preparadas de acordo com Nation (1983). Estas foram previamente fixadas em 0,1 M de tampão fosfato (pH = 7,3) contendo glutaraldeído a 2,5% por 12 horas a 4°C. As amostras fixadas foram lavadas três vezes em tampão fosfato 0,1 M (pH = 7,3) por 10 minutos e desidratadas usando solução de etanol a 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100% durante 10 minutos em cada concentração. As amostras foram secas à temperatura inferior a 60°C durante 2 horas fixadas em *stub* por meio de fitas de carbono e revestidas com uma camada de 10 nm ouro. As análises de MEV foram realizadas com o Digital Scanning Microscope da Zeiss modelo DSM-960.

4.10. Análises de Biologia Molecular

As comunidades bacterianas e de arqueias metanogênicas dos inóculos e do final dos ensaios do planejamento fatorial mesofílico foram avaliadas por reação em cadeia da

polimerase e eletroforese em gel de gradiente desnaturante (PCR/DGGE). Para tanto, realizou-se a extração de DNA (GRIFFITHS et al., 2000) e amplificação com iniciadores 968 FGC e 1392 R (NIELSEN et al., 1999) e 1100 FGC e 1400R (KUDO et al., 1997) para os domínios Bacteria e Archaea, respectivamente. A comparação dos padrões de bandas de DGGE foi realizada, a partir da determinação do coeficiente de similaridade por meio do programa Bionumerics. Os índices de diversidade de Shannon-Wiener, riqueza de Chao1 e dominância foram calculados no Past.

O DNA dos microorganismos endógenos do BCA, do lodo termofílico, presentes em amostras de solo e de compostagem foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Griffiths et al (2000). O sequenciamento das regiões V3 e V4 do RNAr 16S dos microorganismos foi realizado usando a plataforma Miseq – Illumina, 2x250 ciclos com o conjunto de primers 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG -3') and 785 R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC- 3') (KLINDWORTH et al., 2013). A análise de bioinformática foi realizada utilizando-se o software Seqclean (<https://bitbucket.org/izhbannikov/seqclean> usando plataformas menores do que 24 QScore. O banco de dados usado foi o Univec (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/UniVec.html>). Banco de dados RDP foi empregado para análises metagenômicas (COLE et al., 2014). O pipeline usado foi o QIIME plataforma v1.9 (CAPORASO et al., 2010). O índice de diversidade de Simpson foi calculado usando o programa PAST.

O DNA dos microorganismos dos ensaios com maior produção de hidrogênio do segundo planejamento fatorial das condições termofílica e mesofílica foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Griffiths et al (2000) e submetido ao sequenciamento de última geração (Illumina – HiSeq). O processamento das sequências foi realizado na plataforma MG-RASY (versão 3,5) (MEYER et al., 2008). Réplicas artificiais foram removidas de acordo com Gomez-Alvarez et al. (2009) enquanto que as sequências de baixa qualidade foram removidas usando a plataforma Dynamic Trim (COX; PETERSON; BIGGS, 2010).

Para os perfis taxonômicos, foi utilizada a classificação de melhor acerto, com valor máximo de $1e^{-5}$, identidade mínima de 60% e comprimento mínimo de alinhamento de 15 em contraste com o banco de dados KEGG, subsystems, SEED (KANEHISA et al., 2002) usando parâmetros padrões. As ferramentas de análise disponíveis na web como o módulo KEGG (<http://www.Genome.jp/kegg/>), foram utilizadas para compreender as funções de alto níveis em vias específicas relacionadas aos bioprocessos.

Avaliação estatística dos perfis metagenômicos (STAMP versão 2.1.3) foi realizada para detectar diferenças na proporção relativa da taxonomia e dos perfis funcionais (PARKS et al., 2014). As diferenças estatisticamente significantes entre as amostras foram avaliadas a partir do teste exato de Fisher e metodologia da taxa de falso positivo (FDR) para múltipla correção como recomendado pelo desenvolvedor STAMP. As informações biológicas consideradas (funcional e taxonômica) foram filtradas pelo valor-q (>0,05).

4.11. Ajuste dos dados Experimentais

Os dados experimentais foram ajustados para valores médios obtidos de duplicatas ou triplicatas de reatores usando-se o software OriginPro 5.8. Análises de variância (ANOVA) foram realizadas utilizando-se o software Minitab 17. Os dados de produção acumulada de hidrogênio foram ajustados por meio da equação de Gompertz (Equação 11), modificada por Zwietering et al. (1990). A partir da equação 1 (Gompertz modificada), foi possível estimar o Potencial de Produção de hidrogênio (P); Taxa Máxima de Produção de hidrogênio (Rm) e Tempo de Fase lag (λ).

$$H = P \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_m \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (11)$$

Sendo:

P = Potencial de produção de hidrogênio (mmol H₂);

Rm = Taxa máxima de produção de hidrogênio (mmol H₂/ L);

λ = Tempo da fase lag (h);

e = constante de Euler (2,71828182).

A análise estatística do efeito de cada variável, temperatura e concentração de extrato de levedura sobre a produção de hidrogênio, bem como os coeficientes de regressão e análise das condições foram realizadas utilizando o programa “Minitab 17”, considerando 95% de confiança.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização do Bagaço de Cana-de-açúcar

5.1.1. Identificação dos Microrganismos do Bagaço de Cana-de-açúcar *in natura*

As regiões V3 e V4 do gene RNAr 16S dos microrganismos endógenos do BCA *in natura* foram sequenciados utilizando a plataforma Illumina-Miseq (2x250 ciclos). 185 unidades taxonômicas operacionais (OTU) foram identificadas no BCA, cujo índice de Simpson foi de 0,94, o que é uma indicação de elevada diversidade microbiana.

Os microrganismos identificados foram agrupados em quatro filos: Proteobacteria (abundância relativa de 54,33%), Actinobacteria (abundância relativa de 22,30 %), Firmicutes (abundância relativa de 14,34 %) e Bacterioidetes (abundância relativa de 2,99%), além das bactérias não classificadas em nível de filo (abundância relativa de 5,71%).

Representantes de três filos identificados neste trabalho (Firmicutes, Actinobacteria e Bacterioidetes) foram também observados por Ratti et al. (2015), em ensaios com BCA como fonte de microrganismos e substrato para produção de H₂ em reatores em batelada a 55°C. Em tais condições, os autores obtiveram predominância de bactérias celulolíticas e fermentadoras semelhantes à *Clostridium*, as quais provavelmente estiveram envolvidas na degradação do BCA e produção de hidrogênio.

A maioria das sequências identificadas no presente estudo foram relacionadas a 11 gêneros (com abundância relativa maior do que 1 %): *Streptomyces* (20.32 %), *Paenibacillus* (10.64 %), *Stenotrophomonas* (8.27 %), *Sphingomonas* (7.01 %), *Luteibacter* (4.06%), *Enterobacter* (2.89 %), *Agrobacterium* (2.62 %), *Novosphingobium* (1.38 %), *Cohnella* (1.28 %), *Chryseobacterium* (1.26 %) e *Pseudomonas* (1.24 %) (Figura 5-1).

Outros gêneros com abundância relativa menor do que 1 % foram identificados neste estudo, tais como, *Achromobacter*, *Dactylosporangium*, *Brevibacillus*, *Roseomonas*, *Bacillus*, *Cryocola*, *Lactobacillus*, *Hyphomicrobium*, *Acetobacter*, *Clostridium*, *Chitenophaga*, *Rickettsia*, *Xylanimicrobium*, *Flavobacterium*, *Phenylobacterium*, *Terriglobus*, *Actinoallomurus*, *Methilobacterium*, *Leuconostoc*, *Procabacter*, *Sphingobacterium*, *T78*, *Oenococcus*, *Actinomadura*, *Ruminococcus*, *Sphingobium*, *Acenitobacter*, *Devosia*, *Sphaeresporangium*, *u114*, *Deinococcus*, *Cellulomonas*, *Lactococcus* e *vadin CA02*.

Figura 5-1: Abundância relativa dos principais gêneros de bactérias do BCA. Os valores de 1 a 12 correspondem a (1) *Streptomyces*; (2) Outros (não classificados e abundância relativa abaixo de 1%); (3) *Paenibacillus*; (4) *Stenotrophomonas*; (5) *Sphingomonas*; (6) *Luteibacter*; (7) *Enterobacter*; (8) *Agrobacterium*; (9) *Novosphingobium*; (10) *Cohnella*; (11) *Chryseobacterium*; (12) *Pseudomonas*.

A partir dos gêneros de bactérias identificadas neste estudo destaca-se que vários deles estão relacionados com a produção de variedade de enzimas incluindo aquelas envolvidas na degradação de compostos lignocelulósicos como o BCA.

Dentre estes gêneros, *Streptomyces*, (abundância relativa de 20,32%), *Paenibacillus* (abundância relativa de 10,64) *Stenotrophomonas* (abundância relativa de 8,27) e *Sphingomonas* (abundância relativa de 7,01) correspondendo a 48% da abundância relativa total obtida no BCA foram reportados em outros estudos sobre degradação de celulose

(BRITO-CUNHA et al., 2013; BROWN et al., 2011; DE LIMA BROSSI et al., 2015; FRANCO-CIRIGLIANO et al., 2013; JING; WANG, 2012; MASAI et al., 1999) e amido (HWANG et al., 2013; KUMAR et al., 2014; RAJESH et al., 2013; WEST; STROHFUS, 1998).

Ainda, em relação aos gêneros identificados no BCA, *Novosphingobium* (abundância relativa de 1,38 %) e *Paenibacillus* (abundância relativa de 10,64 %) possuem representantes capazes de degradar lignina. *Novosphingobium* sp. B-7 e *Paenibacillus glucanolitycus* são capazes de crescer a partir de licor negro obtido a partir do processo kraft da indústria de papel e celulose (CHEN et al., 2012; MATHEWS; PAWLAK; GRUNDEN, 2014).

Enterobacter (2,89 %) e *Pseudomonas* (1,24 %) também foram identificados neste estudo. Dietrich; Illman; Crooks (2013) e Choi et al. (2015) verificaram que *Pseudomonas olearans*, *Pseudomonas pseudoflana* e *Enterobacter cloacae* GGT036 são tolerantes aos inibidores formados a partir da sacarificação de compostos lignocelulósicos como furfural (excedendo 3 g/L) e 5-HMF (excedendo 6 g/L).

Assim, devido à formação de inibidores como furfural e 5-HMF durante a etapa de pré-tratamento hidrotérmico realizada no BCA, a habilidade de crescimento microbiano e degradação destes compostos torna-se vantajosa para a produção de hidrogênio a partir de biomassa lignocelulósica. Na Figura 5-2 ilustra-se a capacidade de degradação de diversos componentes da biomassa lignocelulósica em função da abundância relativa dos grupos identificados neste estudo. Aproximadamente 50% dos gêneros identificados neste estudo foram relacionados à degradação de biomassa lignocelulósica e amido. No mesmo sentido, foram identificados gêneros degradadores de celulose, hemicelulose e lignina (aproximadamente 40%), enquanto 5% dos gêneros endógenos do BCA foram relacionados a bactérias tolerantes a aldeídos (furfural e 5-HMF).

As bactérias do BCA capazes de degradar os componentes da biomassa lignocelulósica é um indicativo de que estes microrganismos podem ser a chave para a compreensão de rotas microbiana envolvidas na cascata de interações que levam a bioconversão destes resíduos em produtos de alto valor agregado. Ainda neste sentido, a compreensão das relações sintróficas estabelecidas entre estes microrganismos para a degradação de compostos complexos torna-se essencial para favorecer condições nutricionais para maior produção de biohidrogênio.

Figura 5-2: Abundância relativa dos grupos de bactérias identificadas no BCA em função da capacidade de degradação dos componentes da biomassa lignocelulósica.

5.1.2. Fração líquida do pré-tratamento hidrotérmico do BCA

A partir do pré-tratamento hidrotérmico do BCA foram geradas duas frações, líquida e sólida. Na fração líquida do BCA foram observados açúcares, ácidos orgânicos, furfural e 5-HMF, em concentrações crescentes de acordo com o aumento da severidade do pré-tratamento (Tabela 5-1).

Tabela 5-1: Açúcares da fração líquida do BCA após o pré-tratamento hidrotérmico em diferentes severidades

Açúcares (mg/L)	Condições de pré-tratamento hidrotérmico do BCA			
	150 °C - 20 min 4 bar	190 °C - 17 min 11 bar	200 °C - 10 min 16 bar	210 °C 15 min 20 bar
Frutose	325,74	360,11	475,33	-
Sacarose	-	37,49	41,26	-
Xilose	-	472,82	666,19	365,29
Glicose	-	-	-	99,18
Galactose	-	-	-	14,71

Após o pré-tratamento hidrotérmico do BCA de menor severidade (150°C por 20 minutos a 4 bar) foi observada na fração líquida apenas frutose (325, 74 mg/L). A partir do aumento da severidade do pré-tratamento para 190 °C por 17 minutos a 11 bar, verificou-se a liberação de frutose (360,11 mg/L), além de sacarose e xilose (37,49 e 472,82 mg/L, respectivamente). Aumento na liberação de açúcares foi observado com o aumento da severidade do pré-tratamento hidrotérmico (200 °C por 10 minutos a 16 bar). Nesta condição

houve liberação de frutose, xilose e sacarose (475,33; 666,19 e 41,27 mg/L, respectivamente). Por fim, na maior severidade do pré-tratamento hidrotérmico (210°C por 15 minutos a 20 bar) observou-se a liberação de glicose, xilose e galactose (99,18; 365,28 e 14,71 mg/L, respectivamente).

Na hidrólise da hemicelulose ocorre a liberação de manose, galactose, xilose, arabinose e glicose, enquanto na clivagem da celulose tem-se apenas glicose (RASMUSSEN; SØRENSEN; MEYER, 2014). Assim, com o aumento da severidade do processo observa-se a hidrólise da celulose e hemicelulose, bem como a liberação de sacarose e frutose.

Os açúcares disponíveis na fração líquida podem se utilizados como matéria prima para o crescimento de bactérias fermentadoras, que realizam a conversão destes em hidrogênio e outros produtos de valor agregado (KAPARAJU et al., 2009; THOMSEN; THYGESEN; THOMSEN, 2008).

Além dos açúcares, observou-se também na fração líquida do BCA ácidos orgânicos nos pré-tratamentos a 150, 190, 200 e 210 °C (Figura 5-3).

Dentre os ácidos orgânicos observaram-se elevadas concentrações de ácido butírico (1007,26) na condição de 150°C. Nas condições 190, 200 e 210 °C observou-se elevada concentração de ácido isobutírico (904,72; 982,13 e 1746,98 mg/L, respectivamente). Em todas as condições observou-se liberação de ácido propiônico (1049,03; 1207,64; 736,03 e 417,46 mg/L à 150, 190, 200 e 210 °C, respectivamente).

Em relação ao ácido fórmico observou-se na fração líquida concentrações crescentes de 73,7, 427,8, 532,8 e 1.255,7 mg/L à 150, 190, 200 e 210°C, respectivamente. Os ácidos orgânicos e álcoois obtidos a partir da biomassa lignocelulósica são intermediários acessíveis a microrganismos que podem convertê-los a produtos de relevância industrial e biotecnológica (KAMM; KAMM, 2004).

O ácido fórmico gerado em todas as condições de pré-tratamento utilizadas neste estudo é produto da degradação do furfural e do 5-HMF (RASMUSSEN; SØRENSEN; MEYER, 2014) e tem sido considerado um material de armazenamento sustentável do hidrogênio, uma vez que a decomposição deste ácido via reação de desidrogenação, libera como produto principal o hidrogênio (Equação 12), o qual pode ser utilizado em reações de hidrogenação ou em células a combustíveis (JOÓ, 2008).

A formação de ácidos orgânicos provavelmente promoveu a diminuição do pH da fração líquida, o qual em todas as condições testadas foi de 3,5. A liberação de ácidos orgânicos é resultado da hidrólise da biomassa lignocelulósica durante o pré-tratamento hidrotérmico (MOSIER et al., 2005). A água sob elevada pressão e temperatura usada no prétratamento hidrotérmico dissolve a hemicelulose e parte da lignina por meio da quebra de ligações hemiacetais, liberando ácidos orgânicos durante a hidrólise (ANTAL JR, 1996), o que explica a elevada concentração de ácidos orgânicos na fração líquida do BCA após o pré-tratamento hidrotérmico.

Figura 5-3: Ácidos orgânicos da fração líquida do BCA após pré-tratamento hidrotérmico

Além dos ácidos orgânicos, 5-HMF e furfural foram observados na fração líquida em todas as condições de pré-tratamento (Figura 5-4). Em relação ao furfural observou-se aumento da sua concentração em função da severidade do pré-tratamento; ou seja, de 84,0 mg/L à 150°C para 1.660,0 mg/L à 210 °C. Em pré-tratamentos mais severos, sob elevada temperatura, ocorre a hidrólise de xilanas e glicose que pode levar a formação de furfural e 5-HMF (XU; THOMSEN; THOMSEN, 2010).

A presença de inibidores pode impedir o crescimento de bactérias fermentadoras produtoras de hidrogênio (THOMSEN; THYGESEN; THOMSEN, 2008). Embora, os inibidores, furfural e 5-HMF, tenham sido determinados apenas na fração líquida do BCA pré-tratado, provavelmente estão, em menor concentração na fração sólida, já que ambas as frações são liberadas juntas no sistema.

Xu et al. (2008) compararam cinco severidade de pré-tratamento do milho (185°C/3 min, 195°C/3 min, 185°C/7 min, 195°C/7 min e 185°C/15 min). Semelhante ao presente estudo, os autores observaram aumento da concentração de furfural com o aumento da temperatura do pré-tratamento. Entretanto, tais autores reportaram concentrações de furfural abaixo das obtidas neste estudo (0,6 a 51 mg/L), provavelmente devido a menores severidades do pré-tratamento aplicado e ao tipo da biomassa lignocelulósica utilizada como substrato.

Figura 5-4: Furfural e 5-HMF da fração líquida do BCA pré-tratado hidrotermicamente (150, 190, 200 e 210 °C).

5.1.3. Fração Sólida do pré-tratamento hidrotérmico do BCA

5.1.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura

A partir da microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi possível observar diferenças na estrutura do BCA *in natura* e pré-tratado em sistema hidrotérmico (Figura 5-5).

A estrutura do BCA foi claramente afetada pelo pré-tratamento, uma vez que no BCA *in natura* observou-se superfície plana com pouco desgaste, enquanto após o pré-tratamento observou-se rupturas e crescente desintegração do BCA, cujas fibras tornaram-se irregulares e cobertas por saliências e reentrâncias. Pode-se observar que estas modificações no BCA acentuaram-se de acordo com a severidade do processo. Estruturas semelhantes a microrganismos foram observadas no BCA *in natura* e pré-tratado, referindo-se a morfologia de bactérias endógenas. Estas bactérias provavelmente mantiveram-se aderidas nas reentrâncias do BCA, mesmo após o pré-tratamento hidrotérmico.

Figura 5-5: Estrutura do BCA *in natura* (A) e pré-tratado em sistema hidrotérmico em diferentes severidades: (B) 150°C por 20 minutos a 4 bar; (C) 190°C por 17 minutos a 11 bar; (D) 200 °C por 10 minutos a 16 bar; (E e F) 210°C por 15 minutos a 20 bar.

Kumari; Das (2015) realizaram pré-tratamento alcalino (NaOH 0,12 N, 0,25 N e 0,5 N), pré-tratamento enzimático (celulase de 5 a 30U) e pré-tratamento alcalino (0,25N) seguido de enzimático (celulase de 5 a 30U) em BCA. Nestas condições, assim como no presente estudo, os autores observaram por microscopia eletrônica de varredura (MEV) aumento da porosidade do BCA e desorganização das fibras de acordo com o aumento da severidade do pré-tratamento.

5.1.3.2. *Lignina de Klason*

Em relação à porcentagem de lignina insolúvel observou-se aumento de acordo com a severidade do pré-tratamento, variando de 19,0% no BCA *in natura* a 30,4% no BCA pré-tratado à 210°C por 15 minutos a 20 bar (Figura 5-6).

Figura 5-6: Porcentagem de Klason Lignina no BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico à 150 °C por 20 minutos a 4 bar; 190 °C por 17 minutos a 11 bar; 200 °C por 10 minutos a 16 bar e 210 °C por 15 minutos a 20 bar.

A efetiva remoção e/ou modificação da lignina da biomassa lignocelulósica durante o pré-tratamento hidrotérmico interfere diretamente na hidrólise enzimática desta biomassa em processos subsequentes, como a fermentação (MOSIER et al., 2005).

Xu et al. [26] avaliaram o potencial do milho pré-tratado em sistema hidrotérmico (185°C/3 min, 195°C/3 min, 185°C/7 min, 195°C/7 min e 185°C/15 min) como substrato para a produção de bioetanol. Assim como no presente estudo, os autores reportaram aumento na porcentagem de lignina de Klason de acordo com a severidade do pré-tratamento; ou seja, de 9,8 no milho *in natura* a 19,9% no milho pré-tratado na maior severidade de 185°C/15 minutos.

Oliveira et al. (2013) pré trataram palha de cana-de-açúcar por explosão à vapor 180, 190 e 200°C por 15 minutos para produção de etanol de segunda geração e outros produtos de valor-agregado. Nestas condições, os autores observaram aumento na concentração de lignina de Klason com o aumento da severidade do pré-tratamento, de 8,8, 10,3 e 14,0%, à 180, 190 e 200°C, respectivamente). No presente trabalho o teor de lignina de Klason foi de 21,02 e 21,36 % à 190 e 200 °C.

De acordo com Donohoe et al. (2008), pré-tratamentos menos severos, como o hidrotérmico, aumentam significativamente a digestibilidade da biomassa sem remover completamente o conteúdo de lignina da fibra. Este paradoxo destaca que a complexidade da estrutura da biomassa lignocelulósica a nível molecular ainda é pouco compreendida.

A lignina transita entre a fração sólida e líquida durante o pré-tratamento através de um mecanismo complexo que pode envolver transição de fase, reação e/ou solubilização (TRAJANO et al., 2013). Em ambientes aquosos a lignina que é hidrofóbica tem sua superfície de contato reduzida com a água causando a aderência e formação de esferas, (DONOHOE et al., 2008) que após o resfriamento formam *droplets* (TRAJANO et al., 2013).

Como resultado da formação desses *droplets* ocorre aumento no peso molecular da lignina durante curtos pré-tratamentos (LI; HENRIKSSON; GELLERSTEDT, 2007) que podem explicar o aumento da porcentagem de lignina de Klason na fração sólida do BCA pré-tratado de acordo com o aumento da severidade aplicada neste estudo.

Donohoe et al. (2008), observaram por microscopia eletrônica de varredura, a formação de *droplets* de lignina em amostras de casca de caule de milho pré-tratado em sistema hidrotérmico à 120°C. A alta densidade dos *droplets* tem potencial para revestir a superfície, obstruir poros e impedir o acesso enzimático à parede celular.

A remoção da lignina é diretamente correlacionada à capacidade de hidrólise da celulase (LEE; CHUNG; DAY, 2009) e conseqüentemente à liberção de açúcares facilmente fermentáveis, utilizados por bactérias na produção de hidrogênio. Neste sentido, a presença de elevada porcentagem de lignina no BCA, mesmo após o pré- tratamento hidrotérmico, pode explicar o baixo rendimento de hidrogênio obtido neste trabalho a partir da fração sólida do BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico.

5.2. Ensaios em condição Termofílica

5.2.1. Caracterização Filogenética do Inóculo Termofílico

As regiões V3 e V4 do gene RNAr 16S dos microrganismos do lodo termofílico foram sequenciados utilizando a plataforma Illumina-Miseq (2x250 ciclos). Os microrganismos identificados foram agrupados principalmente nos filos Firmicutes (abundância relativa de 78,24%) e Synergistetes (abundância relativa de 21,53 %). Representantes pertencentes a outros filos foram observados em abundância relativa menor do que 1%, tais como Bacteroidetes (0,08%), Proteobacteria (0,06%) e Thermotogae (0,01%).

Em relação às classes, observou-se que as mais abundantes foram pertencentes a Clostridia (76,96%), Synergistia (21,53%) e Bacilli (1,28%). Os principais gêneros identificados (Figura 5-7) foram semelhantes a *Coprothermobacter*, *Anaerobaculum*, *Clostridium*, *Symbiobacterium* e *Thermoanaerobacterium* (41,73; 21,51; 6,42; 6,20 e 1,61%, respectivamente).

Bactérias semelhantes à *Thermoanaerobacterium*, *Clostridium*, *Anaerobaculum* e *Coprothermobacter* foram identificadas no inóculo termofílico e estão relacionadas à produção de hidrogênio (LI; LIU, 2012; MAUNE; TANNER, 2012a; SARIPAN; REUNGSANG, 2013; TANDISHABO et al., 2012).

Cao et al. (2014) relataram que cepas semelhantes à *Thermoanaerobacterium* são capazes de degradar eficientemente muitos substratos lignocelulósicos, tais como celulose microcristalina, papel de filtro, xilanas, xilose, espiga de milho, talo de milho e palha de trigo para produção de hidrogênio. *Anaerobaculum* foi também identificada por (MENES; MUXÍ, 2002) em lodo de estação de tratamento de águas residuárias de lavagem de lã. Microrganismos semelhantes à *Coprothermobacter* foram favorecidos em relações sintróficas com arqueias metanogênicas hidrogenotróficas (GAGLIANO et al., 2015).

As arqueias metanogênicas hidrogenotróficas são amplamente distribuídas em reatores anaeróbios usados para tratamento de resíduos sólidos (SASAKI et al., 2011). Neste estudo, foram identificados microrganismos do domínio Archaea (Figura 5-7), pertencentes ao filo Euryarchaeota (85,42%), classes Methanobacteria (85,42%), Methanomicrobia (8,33%) e Thermoplasmata (6,25%). Os gêneros identificados de arqueia mais abundantes foram *Methanosaeta* (8,33%) e *Methanothermobacter* (6,25%), os quais são produtores de metano (SMITH; INGRAM-SMITH, 2007).

Cheng et al. (2011) reportaram que *Methanothermobacter* é capaz de produzir metano a partir de ácido acético e hidrogênio, metabólitos produzidos em sistemas anaeróbios, como os reatores em batelada usados neste estudo.

Figura 5-7: Abundância relativa dos principais gêneros dos domínios Archaea (Arc) e Bacteria (Bact), identificados no lodo termofílico. Os valores 1 a 7 correspondem aos gêneros *Coprothermobacter*; *Anaerobaculum*; *Clostridium*; *Symbiobacterium*; *Thermoanaerobacterium*; *Methanosaeta* e *Methanothermobacter*.

Dentre os principais microrganismos identificados no inóculo termofílico (abundância relativa maior do que 1%) foi observada semelhança aos gêneros relacionados à produção de hidrogênio, degradação de furfural, 5-HMF e lignina (Figura 5-8).

Figura 5-8: Abundância relativa dos grupos de bactérias identificadas no inóculo termofílico em função da capacidade de degradação da biomassa lignocelulósica, produção de H_2 e tolerância a aldeídos (Furfural e 5-HMF).

5.2.2. Seleção de Meio de Cultura

Três meios de cultura, Logan et al. (2002), Kawagoshi et al. (2005) e Lo et al. (2009) foram testados como fontes de micro e macronutrientes para o enriquecimento de microrganismos celulolíticos e fermentadores utilizando BCA *in natura* (0,5 g/L) como fonte de carbono. Produção de hidrogênio foi observada nos ensaios utilizando os três meios testados (Tabela 5-2) em reatores em batelada incubados a 55 °C.

Produção máxima de hidrogênio de 6,57 mmol/L foi obtida utilizando-se o meio de cultura Kawagoshi et al. (2005) e, portanto, as condições nutricionais deste meio foram utilizadas nos ensaios subsequentes. A taxa de produção de hidrogênio foi de 0,19 mmol/h e o período de início de produção de H_2 (λ) foi de 71,84 horas (Figura 5-9). O meio de cultura Kawagoshi et al. (2005) foi suplementado com extrato de levedura (1 g/L) o que, provavelmente contribuiu para o crescimento de bactérias celulolíticas e fermentadoras.

Figura 5-9: Produção de hidrogênio em meio de cultura Kawagoshi et al., (2005), a partir de BCA *in natura* em reatores em batelada.

Tabela 5-2: Comparação da cinética de produção de hidrogênio para os meios de cultura Logan et al. (2002), Kawagoshi et al., (2005) e Lo et al., (2009).

	P	Rm	λ	R^2
	(mmol/L)	(mmol/h)	(h)	
Logan et al. (2002)	3,24	0,02	35,76	0,93
Kawagoshi et al. (2005)	6,57	0,19	71,84	0,99
Lo et al. (2009)	1,73	0,05	5,05	0,97

P - Produção potencial máxima de hidrogênio; Rm – Taxa máxima de produção de hidrogênio; λ – Tempo para iniciar a produção de hidrogênio.

Os meios de cultura Logan et al (2002), Kawagoshi et al (2005) e Lo et al (2009) contêm em sua composição sais de potássio, fontes de ferro, nitrogênio e enxofre. No entanto, o meio de cultura Kawagoshi et al. (2005) possui em sua composição NH_4NO_3 , CaCl_2 e foi ainda suplementado com extrato de levedura. Tais componentes não fazem parte da constituição dos demais meios de cultura e, provavelmente, foram essenciais para o crescimento microbiano e, conseqüentemente, contribuíram para a maior produção de hidrogênio a partir deste meio de cultura, em relação aos demais.

A partir dos experimentos iniciais procedeu-se a novos ensaios comparativos usando os meios de cultura Del Nery, (1987) e Kawagoshi et al., (2005) em relação a produção de hidrogênio à 55 °C (Tabela 5-3).

Taxa de produção de hidrogênio de 0,003 e 0,001 mmol/h e tempo inicial de produção de H₂ (λ) de 252,48 e 106,10 horas foram obtidas para as condições dos meios Kawagoshi et al. (2005) e Del Nery (1987), respectivamente.

Tabela 5-3: Comparação da cinética de produção de hidrogênio em os meios de cultura Del Nery (1987) e Kawagoshi et al., (2005)

	<i>P</i> (mmol/L)	<i>Rm</i> (mmol/h)	λ (h)	<i>R</i> ²
Del Nery (1987)	0,22	0,001	106,10	0,99
Kawagoshi et al. (2005)	0,46	0,003	252,48	0,98

P- Produção potencial máxima de hidrogênio; *Rm* – Taxa máxima de produção de hidrogênio; λ – Tempo para iniciar a produção de hidrogênio.

Maior produção de hidrogênio (0,46 mmol/L) foi obtida utilizando o meio de cultura Kawagoshi et al., (2005) (Figura 5-10) em relação ao meio Del Nery, (1987) (0,22 mmol/L). Destaca-se que a composição do meio de cultura Del Nery (1987) é mais complexa em relação aquela do meio de cultura Kawagoshi et al (2005). Em ambos os meios de cultura foi suplementado com extrato de levedura. Todavia, na composição do meio de cultura Kawagoshi et al. (2005) são adicionados nitrato de amônio (NH₄NO₃) e sulfato de mangânes (MnSO₄), os quais não fazem parte da composição do meio Del Nery, e provavelmente, são essenciais para o crescimento de bactérias fermentadoras, já que a produção de hidrogênio foi maior utilizando-se o meio de cultura Kawagoshi et al (2005) em relação ao Del Nery (1987).

Figura 5-10: Produção de hidrogênio em meio de cultura Kawagoshi et al., (2005).

Antes da definição do meio de cultura a ser usado para as condições termofílicas procedeu-se a execução de mais uma análise comparativa. Para tanto, foi comparada as condições nutricionais do meio de cultura Kawagoshi et al. (2005) com aquelas do meio Atlas (2005) em relação à produção de hidrogênio (Figura 5-11) em reatores em batelada incubados à 55 °C. A máxima produção de hidrogênio foi de 13,17 mmol/L e 5,15 mmol/L para as condições nutricionais do meio de cultura Atlas (2005) e meio Kawagoshi et al. (2005), respectivamente (Tabela 5-4).

Tabela 5-4: Comparação da cinética de produção de hidrogênio para os meios de cultura Atlas (2005) e meio Kawagoshi et al. (2005).

	P (mmol/L)	Rm (mmol/h)	λ (h)	R^2
Kawagoshi et al. (2005)	5,15	0,21	38,39	0,95
Atlas (2005)	13,17	0,25	5,76	0,95

P - Produção potencial máxima de hidrogênio; Rm – Taxa máxima de produção de hidrogênio; λ – Tempo para iniciar a produção de hidrogênio.

Taxa de produção de hidrogênio de 0,21 e 0,25 mmol/h e tempo inicial de produção de hidrogênio (λ) de 38,39 e 5,76 horas foram obtidas para as condições nutricionais dos meios Kawagoshi et al. (2005) e Atlas (2005), respectivamente.

Figura 5-11: Comparação da cinética de produção de hidrogênio para as condições nutricionais do meio Atlas (2005) e Kawagoshi et al. (2005).

A composição complexa do meio de cultura Atlas, (2005) favoreceu o crescimento de bactérias fermentadoras, levando a alta produção de hidrogênio. Na composição deste meio estão incluídos compostos que não fazem parte do meio Kawagoshi et al (2005), tais como, molibdato de sódio (NaMoO_4), sulfato de cobre (CuSO_4), cloreto de magnésio (MgCl_2), cloreto de cobalto (CoCl_2), Ureia, bicarbonato de sódio (NaHCO_3), cloreto de amônio (NH_4Cl), ácido nitriloacético, cloreto de sódio (NaCl), sulfato de zinco (ZnSO_4), sulfato de alumínio e potássio [$\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$], ácido bórico (H_3BO_3) e solução de vitaminas (riboflavina, piridoxina – HCl, ácidos lipoico, nicotínico e p-aminobenzóico). Tal meio de cultura é descrito como específico para o enriquecimento de bactérias celulolíticas anaeróbias, portanto, adequado para favorecer o crescimento de tais bactérias e, por conseguinte, a conversão da biomassa lignocelulósica (BCA). A composição desse meio foi usada nas etapas seguintes deste estudo.

5.2.3. Pré-tratamento do Inóculo Termofílico

O inóculo termofílico (lodo de reator UASB) foi submetido aos pré-tratamentos térmico, ácido e diluição seriada para redução da atividade metanogênica. Posteriormente, reatores em batelada foram realizados em duplicatas e incubados a 55 °C, com pH inicial de 6,0. A partir da aplicação dos três pré-tratamentos na biomassa termofílica obteve-se inibição das arqueias metanogênicas, uma vez que não foi observada produção de metano, após mais de 200 horas de operação dos reatores em batelada.

Todavia, nos ensaios em que o inóculo termofílico foi submetido aos pré-tratamentos ácido e térmico, as populações de bactérias foram também afetadas, uma vez que, nestas condições, a produção de hidrogênio foi de 1,94 e 0,60 mmol/L, respectivamente. Todavia, nos ensaios com diluição seriada do inóculo diluído (10^{-4}) obteve-se máxima produção de hidrogênio de 5,70 mmol/L (Figura 5-12). Taxa de produção de hidrogênio de 0,008, 0,004 e 0,03 mmol/h e tempo inicial de produção de H_2 (λ) de 51,41, 40,33 e 49,11 horas foram obtidos nos ensaios com o inóculo termofílico após pré-tratamento ácido, térmico e por diluição seriada (Tabela 5-5).

Figura 5-12: Produção de hidrogênio nos reatores em batelada com inóculo termofílico submetido a diferentes pré-tratamentos.

Tabela 5-5: Valores de produção de hidrogênio em reatores em batelada com inóculo termofílico pré-tratado

Pré-tratamentos	P (mmol/L)	Rm (mmol/h)	λ (h)	R^2
Ácido	1,94	0,008	51,41	0,97
Térmico	0,69	0,004	40,33	0,95
Diluição Seriada	5,70	0,030	49,11	0,99

P - Produção potencial máxima de hidrogênio; Rm – Taxa máxima de produção de hidrogênio; λ – Tempo para iniciar a produção de hidrogênio.

Semelhante ao presente estudo, Ren et al. (2008) observaram efeito inibidor dos pré-tratamentos ácido e térmico na metanogênese e fermentação. No entanto, ao contrário do obtido neste estudo, os autores reportaram maior produção de hidrogênio (8,46 mmol) a partir do inóculo pré-tratado termicamente em relação ao ácido (2,32 mmol).

No mesmo sentido, Ratti et al. (2014, 2013) observaram que os pré-tratamentos ácido e térmico do inóculo inibiram a produção de metano em reatores em batelada utilizando celulose como substrato e fluido de rumem e lixiviado de aterro pré-tratados, respectivamente como fontes de microrganismos. No entanto, tais autores reportaram que ambos os tratamentos inibiram a atividade celulolítica uma vez que não foi observada produção de hidrogênio após o pré-tratamento do inóculo, sem adição da enzima celulase. Embora, no presente estudo a produção de metano não tenha sido observada após a aplicação dos pré-tratamento ácido e térmico, a produção de hidrogênio não foi inibida como verificado por Ratti et al. (2014, 2013), porém reduzida como reportado por Ren et al. (2008).

No mesmo sentido, neste estudo, a partir do inóculo pré-tratado por diluição seriada, observou-se a inibição da metanogênese com máxima produção de hidrogênio (5,70 mmol/L), indicando que esta foi a estratégia mais favorável para o pré-tratamento do inóculo, pois não requer a adição de compostos químicos e não causa danos as bactérias celulolíticas, evitando com isso a necessidade da adição de celulase comercial que torna o processo de produção de hidrogênio menos atrativo devido ao elevado custo desta enzima. Tais resultados estão em concordância com aqueles obtidos por Zhang et al. (2013), os quais observaram completa degradação de papel por consórcio microbiano bruto e diluído (10^{-5}) de amostra de solo. Todavia, Zhang et al., (2013) observaram que o consórcio proveniente de amostras de solo diluído de sete a nove vezes (10^{-7} a 10^{-9}) não foi eficiente na degradação de papel, indicando

que dependendo da diluição do inóculo esta estratégia pode também exercer efeito negativo nas populações bacterianas. No presente estudo, não foram realizadas diluições seriadas acima de 10^{-4} e, na diluição testada (10^{-4}), obteve-se a máxima produção de hidrogênio sem produção de metano.

Com isso, dentre os pré-tratamentos realizados nos inóculos observou-se que a metanogênese foi inibida em todas as condições, todavia nos ensaios cujo inóculo foi submetido aos pré-tratamentos ácido e térmico foi observada redução na produção de hidrogênio, permitindo inferir-se que estes pré-tratamentos exerceram efeito negativo nas populações de bactérias fermentativas. Em contrapartida, nos ensaios cujos inóculos foram diluídos foram observadas as maiores produções de hidrogênio, além da inibição da metanogênese.

5.2.4. Suplementação do meio de cultura com extrato de levedura

A partir dos ensaios de seleção de meio de cultura ficou evidente a necessidade da suplementação do meio com extrato de levedura para a produção de hidrogênio, principalmente a partir de biomassa lignocelulósica. Assim, ensaios em batelada foram realizados para verificar se o extrato de levedura era consumido pelos microrganismos como única fonte de substrato ou se este atuava como complemento nutricional. Para tanto, ensaios em batelada em meio Atlas (2005) foram realizados nas seguintes condições: (1) BCA pré-tratado (210°C por 15 minutos) mais extrato de levedura, (2) apenas extrato de levedura e (3) apenas BCA.

Assim, produção de hidrogênio de 0,06, 0,7 e 3,03 mmol/L foi obtida nos ensaios com apenas BCA, apenas extrato de levedura (EL) e BCA+EL, respectivamente (Figura 5-13). Com isso verificou-se que a produção de hidrogênio a partir do BCA foi favorecida pela adição de extrato de levedura no meio de cultura e que este não foi utilizado como substrato exclusivo, mas sim como complemento nutricional, já que na composição do extrato de levedura estão incluídos aminoácidos, peptonas hidrolisadas e elementos traços que atuam como co-fatores de certas enzimas estimulando o crescimento microbiano (HAKOBYAN; GABRIELIAN; TRCHOUNIAN, 2012; ZHANG et al., 2014) e, conseqüentemente, favorecendo a produção de hidrogênio.

Figura 5-13: Produção de hidrogênio a partir do BCA pré-tratado (210°C por 15 minutos) com e sem suplementação do meio de cultura Atlas (2005) com extrato de levedura (EL) e apenas com o extrato de levedura

A produção de hidrogênio iniciou-se após 7,5 horas no ensaio com BCA + EL. No ensaio com apenas BCA como substrato e naquele com somente EL, a produção de hidrogênio iniciou-se após 15,65 horas e 15,05 horas, respectivamente (Tabela 5-6).

Tabela 5-6: Cinética de produção de hidrogênio ajustado por meio de Gompertz-modificado

Ensaio	P (mmol/L)	Rm (mmol/h)	λ (horas)	R ²
BCA+EL	3,09	0,11	7,50	0,96
BCA	0,06	0,04	15,65	0,99
EL	0,70	0,03	15,05	0,97

P - Produção potencial máxima de hidrogênio; *Rm* - Taxa máxima de produção de hidrogênio; λ - Tempo para iniciar a produção de hidrogênio; BCA - Bagaço de cana-de-açúcar; EL - Extrato de Levedura.

A produção de hidrogênio observada utilizando-se apenas BCA ou EL foi inferior àquela obtida a partir do BCA com o meio de cultura suplementado com EL, indicando que o consórcio microbiano foi favorecido a partir da adição de uma fonte de nitrogênio. O mesmo foi verificado em relação à condição termofílica (70 °C) por Van Niel et al (2002) os quais

reportaram elevada produção de H_2 (26,2 mmol H_2 /L) e crescimento de *Caldicelluloseruptor saccharolyticus*, apenas quando extrato de levedura foi adicionado aos reatores em batelada juntamente com sacarose. No caso específico da presente pesquisa com BCA, o valor de produção de H_2 foi menor, em relação a Van Niel et al (2002), provavelmente devido a complexidade do substrato orgânico. Todavia, com produção maior quando comparado com aqueles reatores somente com BCA ou extrato de levedura.

Assim, o extrato de levedura pode ser fonte de carbono, nitrogênio e energia, que são essenciais para o crescimento bacteriano e produção de biohidrogênio. A maior produção de hidrogênio reportada neste trabalho foi proveniente das condições nutricionais com o substrato lignocelulósico e extrato de levedura. A partir disso, em todos os demais ensaios foi usado extrato de levedura (1g/L) na avaliação da produção de H_2 .

5.2.5. Pré-tratamento do BCA para ensaios em condição termofílica

5.2.5.1. Efeito do pré-tratamento hidrotérmico do BCA

Nesta etapa, comparou-se a produção de hidrogênio a partir de substrato simples, glicose em relação ao BCA *in natura* e pré-tratado em sistema hidrotérmico (210 °C por 15 minutos a 20 bar) em condição termofílica (55°C). O pH inicial do meio de cultura foi ajustado para 6,0. No final dos ensaios o pH final foi de 7,08, 7,21 e 7,05 nos ensaios com glicose, BCA *in natura* e BCA pré-tratado.

A produção de hidrogênio foi de 2,04, 1,72 e 5,72 mmol/L a partir do BCA *in natura*, BCA pré-tratado e glicose, respectivamente (Tabela 5-7).

Tabela 5-7 Rendimento de hidrogênio a partir de diferentes substratos

Substrato	H_2 (mmol/L)	Rendimento (mmol H_2 /g substrato)	Rendimento* (mol H_2 /mol glicose consumida)
BCA pré-tratado	2,04	4,13	0,59
BCA <i>in natura</i>	1,72	3,51	0,52
Glicose	5,72	11,42	0,41

* O rendimento de hidrogênio foi calculado considerando-se carboidratos consumidos na forma de glicose.

A maior produção de hidrogênio a partir da glicose deve-se, a simplicidade deste substrato em relação às demais fontes de carbono. O baixo rendimento obtido em todas as condições provavelmente relacionado a baixa concentração de substrato utilizado (0,5 g/L). Ratti et al.(2015) reportaram produção de hidrogênio (2,90 mmol/L) semelhante ao observado neste estudo utilizando 0,5 g/L de BCA pré-tratado por explosão a vapor. Todavia, os autores

verificaram menor produção de hidrogênio (0,8 mmol/L) em relação a esta pesquisa a partir de glicose.

Nos reatores alimentados com glicose foi observado ácido acético (117,93 mg/L), butírico (44,48 mg/L) e isovalérico (26,90 mg/L), além de etanol (54,24 mg/L). No mesmo sentido foram observados ácido acético (44,33 e 75,40 mg/L) butírico (23,34 e 67,47 mg/L) e isovalérico (35 e 25,7 mg/L), além de etanol (14 e 17,2 mg/L) nos reatores com BCA *in natura* e pré-tratado, respectivamente (Figura 5-14).

Figura 5-14: Principais metabólitos gerados nos reatores em batelada a partir de BCA *in natura*, BCA pré-tratado, e glicose.

Em todos os ensaios com BCA *in natura*, BCA pré-tratado e glicose foi favorecida a rota do ácido acético. Assim como no presente estudo, Zheng e Yu, (2005) reportaram produção de hidrogênio a partir da rota do ácido acético (2.223 mg/L) utilizando glicose como substrato. Tais autores reportaram ainda produção de ácido butírico, etanol (1.017 e 85 mg/L, respectivamente) e rendimento de hidrogênio de 1,75 mmol/mol glicose. As maiores concentrações de metabólitos obtidas por Zheng; Yu (2005) em relação às observadas neste trabalho, provavelmente, deveu-se ao uso de glicose como fonte de carbono e a elevada concentração deste substrato (10 g/L). No presente trabalho o BCA foi usado como fonte complexa de carbono em baixa concentração (0,5 g/L).

Em todos os ensaios foi verificado metano (4,7 mmol e 4,9 mmol, e 1,2 mmol, respectivamente) e etanol (14,02 mg/L e 17,2 mg/L, e 54,24 mg/L, respectivamente). Destaca-se que para a produção de metano ocorre consumo de hidrogênio, enquanto na solvetogênese

o substrato é convertido em etanol (Ratti et al., 2014). Desse modo, para todas as condições verificou-se baixa produção de hidrogênio, provavelmente, devido ao favorecimento dessas rotas metabólicas.

Nos ensaios subsequentes, o BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico (210 °C por 15 minutos a 20 bar) foi submetido à deslignificação alcalina visando melhorar a produção de hidrogênio em condição termofílica.

5.2.5.2. Pré-tratamento hidrotérmico e deslignificação alcalina

Nesta etapa realizou-se ensaios de produção de hidrogênio em condição termofílica (55°C) a partir do BCA *in natura*, BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico (210 °C por 15 minutos a 20 bar), glicose, BCA submetido a etapa de deslignificação alcalina após o pré-tratamento hidrotérmico e ensaios misturando BCA *in natura* e pré-tratado, bem como elevou-se a concentração de substrato de 0,5 g/L, na etapa anterior para 2,0 g/L, nesta etapa.

O pH inicial do meio de cultura foi ajustado para 6,0 e no final dos ensaios, foi verificado 5,6, 6,60, 6,08, 6,02 e 6,50 nos ensaios controle (glicose), com BCA *in natura* (C1), BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico (C2), BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico seguido por deslignificação alcalina (C3) e BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico seguido por deslignificação alcalina + BCA *in natura* (C4), respectivamente.

A maior produção de hidrogênio (25,61 mmol/L) foi obtida no ensaio controle com glicose como substrato. Nos reatores com BCA foi observado produção de hidrogênio de 3,52; 5,17; 4,16 e 4,38 mmol/L nos reatores em batelada com BCA *in natura* (C1), BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico (C2), BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico seguido por deslignificação alcalina (C3) e BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico seguido por deslignificação alcalina mais BCA *in natura* (C4), respectivamente (Figura 5-15).

Figura 5-15: Produção de hidrogênio a partir do BCA *in natura* (C1), BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico (C2), BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico seguido por deslignificação alcalina (C3), BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico seguido por deslignificação alcalina + BCA *in natura* (C4).

A maior produção de hidrogênio no ensaio controle, com glicose em relação aos ensaios com BCA, provavelmente foi devido à estrutura recalcitrante e cristalina da biomassa lignocelulósica que atua como barreira aos microrganismos dificultando a hidrólise e, conseqüentemente a fermentação. Além disso, as bolhas de gás produzidas nos processos anaeróbios são facilmente pressas e adsorvidas na parte insolúvel da biomassa lignocelulósica, criando condições termodinâmicas desfavoráveis que inibiram a síntese de hidrogênio (LI; LIU, 2012).

Baixa produção de hidrogênio a partir do BCA pode, ainda, estar relacionada à produção de compostos como o furfural e o 5-HMF liberados a partir de pentoses e hexoses durante o pré-tratamento hidrotérmico (PITARELO et al., 2012), os quais são inibidores da atividade celulolítica/fermentadora (RASMUSSEN; SØRENSEN; MEYER, 2014). Nas condições de pré-tratamento do BCA, aplicadas neste estudo, foram liberadas 1.660 mg/L de furfural e 17,52 mg/L de 5-HMF, na fração líquida.

A maior produção de hidrogênio (5,17 mmol/L), a partir do BCA foi obtida a partir do substrato pré-tratado em sistema hidrotérmico. Provavelmente, sob as condições deste pré-

tratamento ocorreu a liberação de açúcares mais facilmente assimiláveis pelos microrganismos consequentemente favorecendo a fermentação.

O pré-tratamento em sistema hidrotérmico seguido por deslignificação alcalina do BCA resultou em maior produção de hidrogênio em relação ao BCA *in natura* (4,16 e 3,52 mmol/L, respectivamente). No entanto, a deslignificação alcalina provavelmente contribuiu para a geração de compostos tóxicos da fermentação, uma vez que a produção de hidrogênio, nesta condição foi menor, em relação aquela com BCA pré-tratado unicamente em sistema hidrotérmico.

A mistura de BCA *in natura* e pré-tratado (C4) resultou em maior produção de hidrogênio (4,38 mmol/L) em relação ao ensaio apenas com BCA *in natura* (3,52 mmol/L). RATTI et al.(2015) obtiveram produção de hidrogênio de 7,04 mmol/L quando misturaram BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico (2 g/L) com BCA *in natura* (2 g/L). Maior produção de hidrogênio obtida por estes autores em relação ao presente estudo, provavelmente deveu-se a maior concentração de substrato (4 g/L), em relação a concentração (2 g/L) usada no presente estudo.

A taxa de produção de hidrogênio foi de 8,39; 0,16; 0,28; 0,23 e 0,18 mmol/Lh nas condições controle, C1, C2, C3 e C4, respectivamente (Tabela 5-8). A maior taxa de produção de hidrogênio para os ensaios com BCA (0,28 mmol/h) foi obtida em C2 (BCA hidrotérmicamente pré-tratado), provavelmente devido à maior disponibilidade de açúcares facilmente fermentáveis resultantes do pré-tratamento hidrotérmico.

A concentração de açúcares foi avaliada em C2 no tempo de operação inicial e final. Em tal condição observou-se que as concentrações de açúcares redutores, tais como glicose, galactose, manose, xilose, arabinose, celobiose, frutose, lactose e sacarose foram abaixo do limite do método de determinação. Provavelmente, estes açúcares redutores foram produzidos e concomitantemente consumidos. Em contraste, para maltose observou-se aumento de 0,24 g/L para 1.179 g/L após 64 horas de incubação de C2, indicando a presença de bactérias produtoras de amilases. As amilases são enzimas com potenciais tecnológicos e econômicos significativos devido à sua capacidade de hidrolisar amido para gerar açúcares redutores, tais como a maltose (KUMAR et al., 2014). No BCA verificou-se que 48% da abundância relativa de bactérias foram relacionadas com a degradação do amido (seção 5.1.1) e, provavelmente, contribuíram para a produção de maltose no reator C2, em que BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico foi utilizado como substrato. Assim, provavelmente, tais bactérias sobreviveram às condições impostas de pré-tratamento (210 °C por 15 minutos a 20 bar) visto que estruturas

semelhantes a microrganismos foram observadas aderidas no BCA mesmo após o pré-tratamento hidrotérmico (seção 5.1.3).

Tabela 5-8: Produção de hidrogênio nos reatores em batelada termofílico.

Substrato	P (mmol/L)	Rm (mmol/h)	λ (horas)	R^2
Glicose	25,61	8,39	9,32	0,95
C1	3,52	0,16	12,89	0,98
C2	5,17	0,28	16,30	0,98
C3	4,16	0,23	10,65	0,98
C4	4,38	0,18	13,43	0,99

P - Produção potencial máxima de hidrogênio; Rm – Taxa máxima de produção de hidrogênio; λ – Tempo para iniciar a produção de hidrogênio. C1: BCA *in natura*, C2: BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico, C3: BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico seguido por deslignificação alcalina, C4: BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico seguido por deslignificação alcalina + BCA *in natura*

O tempo necessário para o início da produção (λ) de hidrogênio também foi influenciado pelo tipo e pré-tratamento do substrato. No ensaio controle, observou-se que a produção de hidrogênio iniciou-se após 9,32 horas, enquanto nos ensaios com BCA, o λ foi de 12,89; 16,30; 10,65 e 13,43 horas em C1, C2, C3 e C4, respectivamente. O maior λ observado nos ensaios com BCA em relação ao controle deveu-se a menor disponibilidade de açúcares de fácil assimilação pelos microrganismos na biomassa lignocelulósica.

O maior λ (16,30 horas), obtido em C2, provavelmente deveu-se a presença de inibidores da fermentação como o furfural e o 5-HMF. Jacquet et al. (2011) reportaram que o pré-tratamento hidrotérmico da biomassa lignocelulósica libera tais composto, que segundo Quéméneur et al. (2012) afetam a produção de hidrogênio e também o λ . A concentração de furfural e 5-HMF liberados no pré-tratamento hidrotérmico do BCA (210°C por 15 minutos), usado no ensaio C2 foi de 1.660,02 mg/L e 17,52 mg/L, respectivamente (seção 5.1.2).

A produção de furfural no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica ocorre a partir da degradação de pentoses (xilose e arabinose), enquanto que o 5-HMF pode ser produzido pela degradação da glicose ou de hexoses (manose e galactose) (RASMUSSEN, SØRENSEN, MEYER, 2014) e provavelmente influenciou o λ em C2.

Na condição C3 o BCA hidrotérmicamente pré-tratado foi submetido posteriormente a deslignificação alcalina. Sob tais condições observou-se a menor λ (11,57 horas), em relação aos demais reatores com BCA. Isso provavelmente ocorreu devido à remoção de parte da

lignina da biomassa lignocelulósica, o que favoreceu o acesso à celulose pelos microorganismos. De acordo com Levin et al. (2009), a lignina é um polímero polifenólico que preenche as lacunas nas paredes celulares da biomassa lignocelulósica, entre a celulose e a hemicelulose, atuando como barreira para o acesso a celulose pelos microorganismos durante o processo de fermentação. Portanto, a remoção da lignina torna mais acessível o acesso ao substrato pelos microorganismos. Contudo, a etapa de deslignificação alcalina aplicada ao BCA não favoreceu a maior produção de hidrogênio, quando comparada com o ensaio em que o BCA foi pré-tratado apenas hidrotérmicamente. Por conseguinte, a fase de deslignificação alcalina pode ser eliminada do processo, reduzindo os custos do processo.

Apesar da diluição do inóculo, para inibição de arqueias metanogênicas, produção de metano foi observada em C1, C3 e C4 (0,14; 0,40 e 0,92 mmol/L, respectivamente). Não houve produção de metano no ensaio controle e C2, justificando as maiores produções de hidrogênio em ambas as condições. O consumo de hidrogênio por arqueias metanogênicas é uma desvantagem do uso do consórcio microbiano como fonte de inóculo (NISSILÄ et al., 2011), quando o hidrogênio é o produto-alvo final. Neste estudo, a presença de arqueias metanogênicas semelhantes à *Methanothermobacter* no lodo termófilo (seção 5.2.1), provavelmente contribuiu para a conversão do hidrogênio a metano.

Outros metabolitos, tais como ácidos orgânicos foram gerados durante a fermentação do BCA (Tabela 5-9). Em todos os reatores o hidrogênio foi produzido via ácido acético, uma vez que este foi o principal ácido produzido (129,18; 116,84; 150,51; 123,31 e 198,96 mg/L, nos ensaios controle, C1, C2, C3 e C4, respectivamente).

O ácido acético é o principal metabólito produzido por *Coprothermobacter*, *Clostridium* e *Thermoanaerobacterium* (HJ, G, 2005). Tais gêneros foram identificados tanto no BCA quanto no lodo termofílico e, provavelmente exerceram papel fundamental na bioconversão da biomassa lignocelulósica.

O ácido acético (840 mg/L) também foi o principal metabólito produzido por co-cultura de *Clostridium thermocellum* (ATCC 27405) e *Thermoanaerobacterium aotearoense* a partir do BCA em reator em batelada a 55°C (CHENG; ZHU, 2013).

O ácido acético produzido pode ter sido consumido por arqueias metanogênicas, semelhantes à *Methanosaeta*, identificadas no lodo termofílico utilizado como inóculo nesta etapa, contribuindo para a produção de metano observada nos reatores C1, C3 e C4.

Tabela 5-9: Ácidos orgânicos produzidos dos reatores em batelada termofílicos

Ácidos Orgânicos (mg/L)	Glicose	C1	C2	C3	C4
			(mg/L)		
Cítrico	ND	ND	ND	ND	8,60
Lático	ND	ND	ND	ND	45,75
Acético	129,18	116,84	150,51	123,31	198,96
Propiônico	ND	ND	ND	ND	532,52
Butírico	ND	ND	ND	ND	169,06
Isovalérico	10,77	20,26	38,35	14,82	5,18
Valérico	ND	28,60	ND	ND	76,83
Capróico	65,91	ND	101,10	64,09	18,08

ND- Não Detectado. C1 = BCA *in natura*, C2 = BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico, C3 = BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico seguido por deslignificação alcalina, C4 = BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico seguido por deslignificação alcalina + BCA *in natura*.

O ácido propiônico (532,52 mg/L) observado na condição C4 (BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico seguido por deslignificação alcalina + BCA *in natura*) é prejudicial à produção de hidrogênio, uma vez que na sua formação ocorre o consumo de 2 moles de H₂ para cada mol de glicose degradada (LI; FANG, 2007). Tal possibilidade provavelmente justifica a baixa produção de hidrogênio observada nesta condição.

Em C4 observou-se maior diversidade de ácidos, tais como ácido cítrico (8,6 mg/L), láctico (45,75 mg/L) e valérico (76,83 mg/L), provavelmente devido à combinação de BCA pré-tratado e *in natura*. Destaca-se que o BCA *in natura* contém microorganismos endógenos capazes de degradar a biomassa lignocelulósica a partir de diferentes rotas metabólicas, enquanto no BCA pré-tratado tem-se açúcares mais facilmente fermentáveis, resultando na produção de diferentes metabólitos. A alta produção de ácidos orgânicos em C4 resultou em maior produção de metano (0,92 mmol/L) e menor produção de hidrogênio (4,38 mmol/L).

5.2.5.2.1. Caracterização Microbiana

As populações bacterianas e de arqueias dos reatores em batelada com glicose, BCA *in natura* (C1), BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico (C2), BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico seguido por deslignificação alcalina (C3), BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico seguido por deslignificação alcalina + BCA *in natura* (C4), bem como do inóculo termofílico foram comparadas por PCR/DGGE (Figura 5-16).

A

B

Figura 5-16: Perfil de bandas DGGE A- Archaea e B- Bacteria dos ensaios de produção de hidrogênio a partir glicose (Controle), BCA *in natura* (C1), BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico (C2), BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico seguido por deslignificação alcalina (C3), BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico seguido por deslignificação alcalina + BCA *in natura* (C4) e do lodo termofílico (TS).

A estrutura das populações bacterianas foi afetada pelo tipo de substrato utilizado. A maior similaridade (92%) foi observada entre as populações dos ensaios com BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico seguido por deslignificação alcalina (C3), e BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico seguido por deslignificação alcalina + BCA *in natura* (C4), provavelmente, porque metade do substrato utilizado em C4 foi BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico seguido por deslignificação alcalina, o mesmo substrato utilizado em C3.

As populações de C2 (BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico) foi 90% semelhantes à C3 e C4, indicando que a etapa de deslignificação alcalina ocasionou poucas modificações na estrutura das populações bacterianas. Já as populações de bactérias do ensaio com BCA *in natura* (C1) foram 84% semelhantes aquelas dos ensaios com BCA pré-tratado (C2, C3 e C4), indicando maior efeito do pré-tratamento hidrotérmico nestas populações.

As populações de bactérias dos ensaios com BCA (C1, C2, C3 e C4) foram 66% e 61% semelhantes àquelas endógenas do BCA e às populações do lodo termofílico (TS), respectivamente. Em contraste, similaridade de 76% foi observada entre as populações bacterianas do ensaio controle com glicose (sem adição de BCA) e lodo termofílico (TS).

Similaridade de 86% foi observada entre as populações de C1 e C2, ensaios com menor e maior produção de hidrogênio (3,52 e 5,17 mmol/L, respectivamente). A produção de ácido acético (116,84 mg/L), butírico (20,26 mg/L) e metano (0,14 mmol/L) também foi inferior em C1, em relação a C2 (150,51 mg/L, 38,35 mg/L e 0,40 mmol/L, respectivamente). Provavelmente, isso foi devido à aplicação do pré-tratamento hidrotérmico em C2, que ocasionou modificações na estrutura da biomassa lignocelulósica, favorecendo o acesso de microrganismos celulolíticos à estrutura do BCA e, consequentemente facilitando a bioconversão desta biomassa.

Em relação ao domínio Archaea, observou-se similaridade de 96% entre as populações dos reatores com BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico seguido por deslignificação alcalina (C3) e BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico seguido por deslignificação alcalina + BCA *in natura* (C4). Nestas condições, foram observadas produções de ácido acético (123,31 e 198,96 mg/L em C3 e C4, respectivamente) e hidrogênio (4,16 e 4,38 mmol/L em C3 e C4, respectivamente), prováveis substratos para a produção de metano (0,40 e 0,92 mmol/L em C3 e C4, respectivamente). A maior similaridade entre as populações de arqueias em C3 e C4, provavelmente ocorreu porque semelhantes produções de hidrogênio e ácido acético foram observadas nestas condições. Tal possibilidade foi provavelmente devido ao fato de metade do substrato utilizado em C4 foi BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico seguido por deslignificação alcalina, o mesmo substrato utilizado em C3.

Em C2, não foi observada produção de metano, e, consequentemente nesta condição observou-se a máxima produção de hidrogênio (5,17 mmol/L) a partir do BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico. Apesar da ausência de metano em C2, foram observadas bandas de arqueias nesta condição. Braga et al. (2016) reportaram o mesmo padrão quando utilizaram 10 mM de BES em reator em batelada inoculado com lodo de estação de tratamento de águas residuárias, usando BCA como substrato. Os autores atribuíram à redução da taxa de crescimento e não a completa eliminação das arqueias metanogênicas pelo pré-tratamento do inóculo. No presente estudo, o mesmo pode ter ocorrido; isto é, por meio da diluição seriada do inóculo obteve-se redução da taxa de crescimento destes microrganismos sem eliminá-los completamente. Tal possibilidade foi corroborada pela baixa produção de metano observada nas demais condições (0,14, 0,4 e 0,92 mmol/L em C1, C3 e C4, respectivamente).

A maior diversidade (2,81) de arqueias foi observada em C2 (BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico), enquanto que as menores diversidades (2,13 e 2,17) foram observadas

para as arqueias do lodo termofílico e do ensaio controle, respectivamente, o que era esperado devido à origem metanogênica do inóculo.

A diversidade bacteriana dos ensaios com BCA *in natura* e pré-tratados (C1, C2, C3 e C4) foi maior (3,55, 3,47, 3,22 e 3,25, respectivamente) do que a diversidade do ensaio controle (3,01) e do lodo termofílico (3,13), corroborando a entrada de microrganismos endógenos do BCA (Tabela 5-10).

Tabela 5-10: Índice de diversidade de Shannon-Winer para os domínios *Archaea* e *Bacteria*

Inóculo/Reator em Batelada	Índice de diversidade (Shannon-Wiener)	
	<i>Archaea</i>	<i>Bacteria</i>
Lodo Termofílico	2,13	3,13
Controle (Glicose)	2,17	3,01
BCA <i>in natura</i>	-	2,64
C1	2,77	3,55
C2	2,81	3,47
C3	2,38	3,22
C4	2,37	3,25

BCA *in natura* (C1), BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico (C2), BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico seguido por deslignificação alcalina (C3), BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico seguido por deslignificação alcalina + BCA *in natura* (C4).

5.2.5.3. Efeito da severidade do pré-tratamento hidrotérmico

O tempo de adaptação da biomassa (λ) foi afetado pela severidade do pré-tratamento do BCA, uma vez que aumentou de 10,9 horas na condição com a menor severidade do pré-tratamento (150°C) para 17,8 horas na condição de maior severidade (210°C) (Tabela 5-11).

Na condição, cujo bagaço *in natura* foi usado como substrato, foi observado o maior tempo de aclimação da biomassa (24,0 horas). A complexa estrutura do substrato lignocelulósico sem pré-tratamento, provavelmente, foi responsável pelo longo tempo necessário para que os microrganismos obtivessem acesso aos açúcares fermentáveis (Figura 5-17).

Figura 5-17: Produção de hidrogênio a partir do BCA in natura e pré-tratado em sistema hidrotérmico (150 °C por 20 minutos a 4 bar, 190 °C por 17 minutos a 11 bar, 200 °C por 10 minutos a 16 bar e 210 °C por 15 minutos a 20 bar).

O aumento de λ e, conseqüentemente, do início da produção de hidrogênio de acordo com a severidade do pré-tratamento hidrotérmico pode estar relacionado com concentração de inibidores. A produção de furfural e 5-HMF ocorre a partir da desidratação de pentose e hexose, respectivamente (PITARELO et al., 2012) e pode inibir ou retardar a atividade celulolítica/fermentadora (RASMUSSEN; SØRENSEN; MEYER, 2014).

Em contrapartida, λ diminuiu nos ensaios com BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico (10,9, 13,9, 11,1 e 17,8 horas) em relação ao ensaio com BCA *in natura* (24,0 horas), provavelmente devido a maior disponibilidade de açúcares facilmente fermentáveis residuais, liberados a partir do pré-tratamento, já que crescente concentração de açúcares totais foi observada na fração líquida do pré-tratamento do BCA (65,6, 387,3, 417,0 e 1114,3 mg/L à 150, 190, 200 e 210 °C, respectivamente).

Ratti et al. (2015) reportaram o mesmo efeito em relação a λ em ensaios de produção de hidrogênio a partir de 2,0 g/L de BCA pré-tratado por explosão a vapor e BCA *in natura* como fonte de microrganismos. Os autores observaram diminuição de λ de 50,4 horas nos ensaios com BCA *in natura* para 35,0 horas nos ensaios pré-tratado por explosão a vapor

(200°C/ 7 min), corroborando o efeito do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica no tempo de aclimação da biomassa.

A maior produção de hidrogênio (4,88 mmol/L) foi observada na condição de maior severidade do pré-tratamento (210°C), enquanto que a menor (3,51 mmol/L) foi obtida nos ensaios com BCA *in natura* (Tabela 5-11), indicando que o pré-tratamento hidrotérmico favoreceu a hidrólise e fermentação e, conseqüentemente, a produção de hidrogênio. Aumento na produção de hidrogênio de 26,56 e de 28,12% foi obtido a partir dos pré-tratamentos de menor (150°C) e maior severidade (210°C) em relação ao ensaio com BCA *in natura*.

Tabela 5-11: Parâmetros de produção de hidrogênio a partir do BCA *in natura* e em diferentes condições de pré-tratamento hidrotérmico

Substrato	P (mmol/L)	R_m (mmol/h)	λ (horas)	Y (mmol/gBCA)	R^2
<i>In natura</i>	3,51	0,31	24,00	1,82	0,94
150°C	4,77	0,15	10,10	2,27	0,98
190°C	4,00	0,17	13,90	2,12	0,99
200°C	4,62	0,16	11,10	2,36	0,97
210°C	4,88	0,32	17,80	2,50	0,98

O pré-tratamento hidrotérmico favorece o aumento da área superficial da celulose, beneficiando a ação de enzimas celulolíticas. Isto ocorre devido à desestruturação da lignina e hemicelulose e da redução da cristalinidade da celulose (EWANICK; BURA, 2010), facilitando a conversão deste polissacarídeo a açúcares assimiláveis pelas bactérias fermentadoras aumentando, com isso, a produção de hidrogênio e outros produtos de valor biotecnológico.

Devido à escassez de estudos de produção de hidrogênio a partir da fração sólida do BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico, resumiu-se na Tabela 5-12, os valores de produção de hidrogênio reportada na literatura a partir de biomassa lignocelulósica pré-tratada a partir de diferentes processos.

Tabela 5-12: Produção de hidrogênio a partir de biomassa lignocelulósica pré-tratada

Biomassas	Pré-tratamento	mmol/L	Referência
Hidrolisado de BCA	Ácido (2.1 % v/v H ₂ SO ₄)	52,86	Lai et al. (2014)
Hidrolisado de Palma	Ácido (6% v/v H ₂ SO ₄)	31,25	Chong et al. (2013)
Hidrolisado de Trigo	Ácido pH 3.0 (90°C/ 15 min)	24,11	Sagnak; Kargi; Kapdan (2011)
BCA	Explosão a vapor (200°C/ 7min)	2,81	Ratti et al. (2015)
BCA	Hidrotérmico (210°C/15 min – 20bar)	4,87	Este estudo

Os valores inferiores de produção de hidrogênio reportados na Tabela 5-12, obtidos tanto neste estudo, quanto por Ratti et al. (2015) em relação aos demais estudos, foram consequência principalmente do tipo de biomassa utilizada (BCA) e da fração do pré-tratamento usada como substrato para a fermentação (sólida). Pode-se observar que, nos trabalhos com elevada produção de hidrogênio a fração líquida (hidrolisado), mais lábil, foi usado como fonte de carbono, resultando em valores elevados de produção de hidrogênio.

Rendimentos de hidrogênio máximo de 2,50 mmol/g BCA e mínimo de 1,82 mmol/gBCA foram obtidos na condição de maior severidade (4,41) do pré-tratamento do BCA (210°C for 15 minutos at 20 bar) e no ensaio com BCA *in natura*, respectivamente.

Além da produção de hidrogênio, ácidos orgânicos foram obtidos em todas as condições e, pode-se observar que, em todos os reatores, a produção de hidrogênio ocorreu via rota do ácido acético, já que este foi o principal ácido produzido (439,92, 6,99, 239,50, 290,92 e 229,94 mg/L nos ensaios *in natura*, 150, 190, 200 e 210°C, respectivamente). A partir da rota metabólica do ácido acético, a produção teórica é de 4 mols H₂ por mol de glicose (MOSEY, 1983).

Além do ácido acético, dentre os ácidos produzidos, destacam-se também as crescentes concentrações de ácido propiônico (43,36, 26,69, 69,29 e 154,34 nos ensaios com BCA *in natura* e pré-tratados a 190, 200 e 210°C, respectivamente) (Figura 5-18). A produção de ácido propiônico requer o consumo de 2 mols de H₂ por mol de glicose degradada (LI; FANG, 2007) resultando em baixos rendimentos de hidrogênio.

Figura 5-18: Ácidos orgânicos dos reatores em batelada de produção de hidrogênio com BCA *in natura* e pré-tratado em sistema hidrotérmico.

Devido aos grupos funcionais dos ácidos, a produção biológica destes metabólitos é uma promissora fonte de matéria prima e subprodutos para a indústria química, podendo como no caso dos ácidos succínico, fumárico e málico substituir produtos derivados do petróleo como o anidrido maléico (SAUER et al., 2008), usado na produção de plásticos, resinas e óleo, dentre outros. Neste sentido, os ácidos produzidos a partir do BCA, como o acético, propiônico e butírico podem ser usados, por exemplo, na produção de solventes verdes, rações e medicamentos (SAUER et al., 2008).

Na condição de maior severidade (4,41) à 210 °C por 15 minutos a 20 bar houve liberação de maior concentração de açúcares (1.114,3 mg/L), porém maior concentração de furfural (1.660,02 mg/L), o que pode ocasionar inibição da fermentação. Assim optou-se por utilizar nos ensaios seguintes, BCA pré-tratado à 200 °C por 10 minutos a 16 bar, condição cuja produção de hidrogênio foi de 4,62 mmol/L com liberação de 417 mg/L de açúcares e 260 mg/L de furfural na fração líquida.

5.2.6. Planejamento Fatorial Termofílico 1

Nesta etapa ensaios em batelada (1L) foram realizados utilizando o lodo termofílico (10%) diluído (10^{-4}) como inóculo e BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico à 200 °C por 10 minutos a 16 bar (2 g/L) com o meio de cultura Atlas (2005) em pH ajustado para 6,0. Nessa fase aplicou-se delineamento fatorial por composto central (CCD) com a finalidade de avaliar o efeito das variáveis, temperatura de incubação e concentração de extrato de levedura na produção de hidrogênio, metano e ácidos orgânicos. Metodologia de superfície de resposta (RSM) foi utilizada para avaliar a região ótima da produção de hidrogênio a partir do BCA.

Os valores dos pontos centrais de ambas as variáveis foram definidos de acordo com a literatura reportada no presente estudo. Cada variável independente foi estudada em cinco níveis codificados (-1,42; -1; 0; 1; 1,42). Considerou-se significativos os fatores com nível de confiança acima de 95%. Efeito significativo foi observado em relação à produção de etanol e hidrogênio. A matriz com as condições do CCD, valor experimental e predito da produção de hidrogênio está apresentada na Tabela 5-13.

Tabela 5-13: Composto Central da concentração de extrato de levedura e temperatura para a produção de hidrogênio em reatores em batelada termofílicos

Reator em Batelada	Nível	X ₁	Nível	X ₂	Valor experimental	Valor predito
		Extrato de Levedura (g/L)		Temperatura (°C)	Produção de H ₂ (mmol/L)	Produção de H ₂ (mmol/L)
C1	0	2	0	50	9,2	8,9
C2	0	2	0	50	7,9	8,9
C3	0	2	0	50	9,6	8,9
C4	+1,42	3,42	0	50	8,8	11,1
C5	-1,42	0,58	0	50	5,2	4,8
C6	0	2	+1,42	64,2	9,7	11,7
C7	0	2	-1,42	35,8	3,5	3,4
C8	+1	3	-1	40	6,1	4,9
C9	-1	1	-1	40	3,9	4,7
C10	+1	3	+1	60	17,7	15,0
C11	-1	1	+1	60	7,2	6,4

C1, C2 e C3 (pontos centrais - 2,00 g/L de extrato de levedura à 50,0 °C); C4 (3,42 g/L de extrato de levedura à 50,0 °C); C5 (0,58 g/L de extrato de levedura à 50,0 °C); C6 (2,00 g/L de extrato de levedura à 64,2°C); C7 (2,00 g/L de extrato de levedura à 35,8°C); C8 (3,00 g/L de extrato de levedura à 40,0 °C); C9 (1,00 g/L de extrato de levedura à 40,0 °C); C10 (3,00 g/L de extrato de levedura à 60,0 °C) e C11 (1,00 g/L de extrato de levedura à 60,0 °C).

A menor produção de hidrogênio (3,5 mmol/L) foi observada em C7, condição cuja temperatura de incubação foi de 35,8 °C e a concentração de extrato de levedura foi de 2,0 g/L. Em contraste, a máxima produção de hidrogênio (17,7 mmol/L) foi obtida à 60 °C e com

3,0 g/L de extrato de levedura (C10). Isto, provavelmente, ocorreu devido à origem termofílica do inóculo. Lazaro et al. (2014), assim como no presente estudo, reportaram maior produção de hidrogênio em ensaios incubados à temperatura próxima a da aclimação do inóculo. Tais autores, no entanto, obtiveram maior produção de hidrogênio (19 mmol) à 37 °C e menor produção de hidrogênio (5,3 mmol) a 55 °C utilizando 7 gDQO/L de vinhaça e inóculo mesofílico (aclimatado a 30 °C).

No mesmo sentido, baixas produções de hidrogênio (3,9 e 6,1 mmol/L) foram observadas em C9 e C8, respectivamente, cuja temperatura de incubação foi de 40°C e 1,0 g/L e 0,58 g/L de extrato de levedura , respectivamente, corroborando efeito negativo da temperatura de incubação dos ensaios em temperatura diferente daquela em que o inóculo foi aclimatado.

Baixa produção de hidrogênio foi obtida em C5 (5,2 mmol/L), cuja menor concentração de extrato de levedura (0,58 g/L) foi aplicada ao meio de cultura , apesar da temperatura de incubação de 50 °C, próximo a temperatura de aclimação do inóculo, possivelmente devido ao maior requerimento de nitrogênio do que o disponibilizado nesta condição.

De acordo com Maintinguer et al. (2008) a degradação de compostos complexos como fenol é acelerada pela adição de extrato de levedura no meio de cultura. Neste trabalho, a adição de extrato de levedura favoreceu a produção de hidrogênio a partir da bioconversão da biomassa complexa lignocelulósica, BCA, usada como substrato.

Segundo Hakobyan et al. (2012) 2, 0 g/L de extrato de levedura é uma fonte eficaz de nitrogênio para estimular o crescimento bacteriano e favorecer a produção de hidrogênio. Neste estudo, 2,0 g/L de extrato de levedura foi usado como fonte de nitrogênio nos ensaios do ponto central do planejamento fatorial incubados a 50 °C. Esta condição (2,0 g/L de extrato de levedura e 50 °C) foi repetida em três pontos centrais (C1, C2 e C3) nos quais a produção de hidrogênio foi de 9,2, 7,9 e 9,6 mmol/L, respectivamente.

A máxima produção de hidrogênio nos ensaios com 2,0 g/L de extrato de levedura foi de 3,5 mmol/L, 9,6 mmol/L e 9,7 mmol/L nos ensaios incubados a 35,8, 50,0 e 64,2 °C, respectivamente e, com isso pode-se verificar produção de hidrogênio crescente com o aumento da temperatura de incubação para a mesma concentração de extrato de levedura (2,0 g/L).

Assim como no presente estudo, Danko et al. (2008) reportaram aumento na produção de hidrogênio de 6,11 para 7,22 mmol/L com o aumento da temperatura de 37 para 60 °C,

respectivamente, a partir de resíduos de alimentos como substrato e lodo granular de reator UASB do tratamento de resíduos de cervejaria. No entanto, com o aumento da temperatura para 70 °C, os autores não obtiveram produção de hidrogênio.

Efeito linear da concentração de extrato de levedura e quadrático da temperatura (Q) foi observado em relação à produção de hidrogênio (Figura 5-20). Modelo matemático foi para a variação da resposta em função das variáveis independentes codificadas, como descrito na equação 13.

$$Y = 8,91 + 2,21 * X_1 + 2,95 * X_2 \quad (13)$$

Sendo:

Y = produção predita de hidrogênio (mmoL/L);

X₁ = concentração de extrato de levedura (g/L) e

X₂ = temperatura (°C).

Figura 5-19: Teste de Pareto do efeito das variáveis independentes, concentração de extrato de levedura (EL) e temperatura (Temp) na produção de hidrogênio.

A adequação do modelo foi determinada por análise de variância (ANOVA) conforme apresentado na Tabela 5-14.

Tabela 5-14: Tabela ANOVA para o efeito da concentração de extrato e temperatura na produção de hidrogênio

Variável	SS	DF	MS	F- valor	P- valor	Fatores
Extrato de levedura (L)	39,4965	1	39,4964	9,404	0,0278	Significante
Extrato de levedura (Q)	1,2850	1	1,2849	0,3059	0,6039	
Temperatura (L)	69,9482	1	69,9481	16,6544	0,0095	Significante
Temperatura (Q)	2,5844	1	2,5843	0,6153	0,4683	
1L x 2L	17,2225	1	17,2225	4,1006	0,0987	
Erro	20,9998	5	4,1999			
Total SS	150,7218	10				

SS- Soma dos Quadrados; DF – Graus de liberdade; MS – Média dos quadrados; L – Linear; Q- Quadrático. Nível de significância de 95%.

Os valores da produção potencial de H_2 (P), da taxa máxima de produção de H_2 (Rm) e do tempo para iniciar a produção de H_2 (h) estão resumidos na Tabela 5-17. Em todos os testes obteve-se R^2 maior que 0,96, indicando robusto ajuste dos dados (Tabela 5-15).

Tabela 5-15: Parâmetros de produção de hidrogênio a partir do modelo de Gompertz modificado e rendimento de H_2

Reator em Batelada	P	Rm	λ	R^2	Rendimento
	mmol/L	mmol/h	horas		mmol/g BCA
C1	9,2	0,89	6,26	0,97	4,60
C2	7,9	0,90	4,99	0,99	3,95
C3	9,6	0,71	4,17	0,97	4,80
C4	8,8	0,81	5,98	0,97	4,40
C5	5,2	0,35	7,14	0,98	2,60
C6	9,7	0,66	4,70	0,98	4,85
C7	3,5	0,99	11,90	0,99	1,75
C8	6,1	1,22	11,86	0,99	3,05
C9	3,9	0,11	7,18	0,96	1,95
C10	17,7	1,55	6,88	0,98	8,85
C11	7,2	0,24	17,09	0,96	3,60

C1, C2 e C3 (pontos centrais - 2,00 g/L de extrato de levedura à 50,0 °C); C4 (3,42 g/L de extrato de levedura à 50,0 °C); C5 (0,58 g/L de extrato de levedura à

50,0 °C); C6 (2,00 g/L de extrato de levedura à 64,2°C); C7 (2,00 g/L de extrato de levedura à 35,8°C); C8 (3,00 g/L de extrato de levedura à 40,0 °C); C9 (1,00 g/L de extrato de levedura à 40,0 °C); C10 (3,00 g/L de extrato de levedura à 60,0 °C) e C11 (1,00 g/L de extrato de levedura à 60,0 °C).

Maior tempo para iniciar a produção de hidrogênio (44 e 36 horas) do que o observado neste trabalho foi reportado por Fang et al. (2006) a partir de pasta de arroz em condição termofílica (55 °C) e mesofílica (37 °C), respectivamente, por consórcio microbiano proveniente de lodo de digestor anaeróbio, evidenciando o potencial do lodo utilizado nesta pesquisa em iniciar a conversão de biomassas complexas em reduzido tempo de incubação.

O maior tempo necessário para o início da produção de hidrogênio (17,09 horas), no presente estudo, foi a 60 °C em C11 (com 1 g/L) de extrato de levedura), enquanto o menor tempo requerido para o início da produção de hidrogênio foi de 4,17, para as condições do ponto central (50 °C e 2,0 g/L de extrato de levedura), provavelmente devido a proximidade da temperatura em relação aquela do inóculo (55°C).

No presente estudo, observou-se máxima produção de hidrogênio, máxima taxa de produção de hidrogênio e máximo rendimento de hidrogênio de 17,70 mmol/L, 1,55 mmol/L/h e 8,85 mmol/g substrato à 60 °C, 3,0 g/L de extrato de levedura e 2,0 g/L de BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico.

Em contraste, Cao et al. (2014) reportaram menor produção de hidrogênio (8,42, 8,98 e 9,88 mmol/L), taxa de produção (0,10, 0,11 e 0,13 mmol/L/h) e rendimento de hidrogênio (3,47, 3,53 e 3,27 mmol/g substrato) a partir de haste de milho, palha de trigo e espiga de milho, respectivamente à 60 °C usando 2,0 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de substrato.

Maiores valores obtidos no presente estudo em relação aos reportados por Cao et al. (2014), provavelmente deveu-se ao pré-tratamento hidrotérmico do substrato realizado no BCA que causou a desestruturação desta biomassa facilitando o acesso de microrganismos celulolíticos e consequentemente favorecendo a fermentação.

O nível ótimo das variáveis independentes e suas interações na variável resposta de produção de hidrogênio foram avaliados em um gráfico de superfície de resposta (Figura 5-21).

Figura 5-20: Superfície de resposta da interação entre a concentração de extrato de levedura (EL g/L) e temperatura (T °C) na produção de hidrogênio em reatores em batelada

5.2.6.1. Ácidos Orgânicos, Etanol e Metano

Em todos os reatores em batelada do planejamento fatorial 1 (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C10 e C11) observou-se que a produção de hidrogênio foi realizada a partir da via do ácido acético, exceto em C9 (1 g/L de extrato de levedura a 40°C). Nesse último caso, observou-se que foi predominante a rota do ácido butírico (Figura 5-22). Sob tais condições observou-se baixa produção de hidrogênio (3,9 mmol/L). Isto provavelmente ocorreu devido à baixa concentração de extrato de levedura (1 g/L) e baixa temperatura de incubação (40°C) aplicada nessa condição.

A temperatura e concentração do extrato de levedura foram significativas em nível inferior a 10% para o ácido acético. Os valores do efeito da temperatura, linear e quadrático, foram menores do que zero, indicando efeito negativo. Em outras palavras, o aumento da temperatura favoreceu a menor produção de ácido acético.

Figura 5-21: Valores acumulativos de ácidos orgânicos nas diferentes condições experimentais: C1, C2 e C3 (pontos centrais - 2,00 g/L de extrato de levedura à 50,0 °C); C4 (3,42 g/L de extrato de levedura à 50,0 °C); C5 (0,58 g/L de extrato de levedura à 50,0 °C); C6 (2,00 g/L de extrato de levedura à 64,2°C); C7 (2,00 g/L de extrato de levedura à 35,8°C); C8 (3,00 g/L de extrato de levedura à 40,0 °C); C9 (1,00 g/L de extrato de levedura à 40,0 °C); C10 (3,00 g/L de extrato de levedura à 60,0 °C) e C11 (1,00 g/L de extrato de levedura à 60,0 °C).

A produção de ácido acético aumentou com o aumento da concentração de extrato de levedura. Por meio da superfície de resposta tridimensional tem-se o efeito da temperatura e concentração do extrato de levedura na produção de ácido acético (Figura 5-23).

A maior e menor produção de ácido acético (132,14 mg/L e 23,11 mg/L) foram observadas em C4 (3,42 g/L de extrato de levedura à 50°C), e C5 (0,58 g/L de extrato de levedura à 50°C), respectivamente, corroborando o efeito do extrato de levedura na produção desse ácido orgânico.

Baixas produções de ácido acético (23,11, 25,07, 48,64 mg/L) foram observadas nos ensaios com as menores concentração de extrato de levedura (0,58, 1,00 e 1,00 g/L, respectivamente). Em contrapartida, nos ensaios em que utilizou-se as maiores concentrações de extrato de levedura (C4-3,42 g/L de extrato de levedura à 60°C, C8 – 3,00 g/L de extrato de levedura à 40 °C e C10 – 3,42 g/L de extrato de levedura a 50 °C) foram obtidas elevadas produções de ácido acético (132,14, 77,07 e 50,44 mg/L, respectivamente).

Ajustou-se modelo linear aos dados experimentais para avaliar a produção de ácido acético por meio do método de superfície, o qual prediz a resposta em função da variável independente codificada, concentração de extrato de levedura.

$$Y = 83,43 + 51,94 * X_1 - 27,49X_2 - 39,06 * X_2^2 \quad (14)$$

Sendo,

Y = produção predita de ácido acético (mg/L);

X₁ = concentração de extrato de levedura

X₂ = temperatura de incubação (°C)

Figura 5-22: Superfície de resposta da interação entre a concentração de extrato de levedura e temperatura na produção de ácido acético.

Ácido propiônico também foi observado nos reatores do planejamento fatorial 1, principalmente, em C2 e C3 (pontos centrais - 2,00 g/L de extrato de levedura à 50,0 °C), C4 (3,42 g/L de extrato de levedura à 50,0 °C), C8 (3,00 g/L de extrato de levedura à 40,0 °C), C9 (1,00 g/L de extrato de levedura à 40,0 °C), C10 (3,00 g/L de extrato de levedura à 60,0 °C) e C11 (1,00 g/L de extrato de levedura à 60,0 °C) de 3,71 mg/L a 49,2 mg/L. No entanto, não

foi observado efeito significativo do extrato de levedura e da temperatura na produção deste ácido orgânico (valor p superior a 0,1).

Etanol foi observado concomitantemente com a produção de H_2 e ácidos orgânicos, porém as variáveis independentes não exerceram efeito na produção deste metabólito. A maior produção de etanol (38,4 mg/L) foi observada no ensaio C10 (3 g/L de extrato de levedura a 60°C), enquanto a produção mínima de etanol de 12,6 mg/L foi obtida no ensaio C5 (0,58 g/50°C). Dasgupta et al. (2013) também não observaram influência do extrato de levedura (1 a 5 g / L) na produção de etanol a partir de hidrolisado do BCA utilizando a levedura termotolerante *Kluyveromyces* sp. IIPE453. Todavia, os autores relataram que as condições de pH, tempo de fermentação, concentração de fosfato de sódio (Na_2HPO_4) e substrato foram significativos na produção de etanol.

No presente estudo, em todos os reatores em batelada do planejamento fatorial 1 observou-se produção de metano após 40 horas, com aumento até o final dos ensaios (cerca de 200 horas). A temperatura teve um efeito positivo na produção de metano (p-valor 0,05), indicando que as archaea metanogênicas foram afetadas pela variação da temperatura (Tabela 5-16).

A máxima produção de CH_4 (18,07 mmol/L) foi observada na condição de temperatura mais elevada (ensaio C6 com 2 g/L de extrato de levedura a 64,2 °C) e a mínimo (0,17 mmol/L) foi obtida na condição mesofílica (ensaio C7 Com 2 g/L a 35,8 °C). Provavelmente, as arqueias metanogênicas foram mais sensíveis ao efeito da variação de temperatura para uma condição mesofílica. Ressalta-se que o inóculo usado nesses ensaios teve sua origem de reator UASB termofílico e a partir desses resultados pode-se afirmar que foram reduzidos os representantes metanogênicos que se mantiveram em condição mesofílica. A partir das condições experimentais pode-se inferir também que a temperatura ótima para a produção de metano foi a 64,2 °C; ou seja, populações de arqueias metanogênicas foram mantidas em faixa superior de temperatura.

Tabela 5-16: ANOVA para o efeito da concentração de extrato e temperatura na produção de metano dos reatores em batelada do planejamento fatorial 1

Variável	SS	DF	MF	F- valor	P – valor	Fator
Extrato de Levedura (L)	13,8576	1	13,8576	0,5851	0,4788	
Extrato de Levedura (Q)	0,0069	1	0,0069	0,0002	0,9870	
Temperatura (L)	139,3584	1	139,3584	5,8844	0,0596	significante
Temperatura (Q)	0,4174	1	0,4174	0,0176	0,8995	
1L x 2L	7,0225	1	7,0225	0,2965	0,6094	
Erro	118,4123	5	23,6825			
Total SS	279,0812	10				

SS- Soma dos Quadrados; DF – Graus de liberdade; MS – Média dos quadrados; L – Linear; Q- Quadrático. Nível de significância de 95%.

O efeito da concentração do extrato de levedura e temperatura na produção de metano foi visualizado por meio da superfície de resposta tridimensional (Figura 5-24).

Figura 5-23: Superfície de resposta da interação entre a concentração de extrato de levedura e temperatura na produção de metano dos reatores em batelada do planejamento fatorial 1

Ajustou-se modelo linear aos dados experimentais para avaliar a produção de metano por meio do método da superfície, o qual prediz a resposta como uma função da temperatura (Equação 15).

$$Y = 5,40 + 8,33 * X_2 \quad (15)$$

Sendo,

Y = produção predita de metano (mmol/L);

X₂ = temperatura de incubação (°C).

A produção de metano tem sido reportada em ampla gama de temperaturas, mas o processo de digestão anaeróbia é altamente dependente da temperatura (Sánchez et al., 2001). Elevada produção de metano com o aumento na temperatura está provavelmente relacionada à produção de enzimas termoestável por arqueias anaeróbias termofílicas, tornando estes microorganismos de grande interesse em processos biotecnológico.

Canganella e Wiegel (2014) relataram que arqueias metanogênicas, como *Methanothermobacter*, provenientes de lodo de digestores anaeróbios, apresentam crescimento ótimo à 65°C, temperatura próxima aquela em cuja maior produção de metano foi obtida neste estudo (64,2°C).

5.2.6.2. Caracterização Microbiana

Avaliou-se para todos os reatores em batelada do planejamento fatorial 1 variações nas populações de arqueias metanogênicas e bactérias por meio do PCR/DGGE. A partir dessa análise confirmou-se o efeito da temperatura na produção de metano por meio da análise do perfil das populações do Domínio Archaea.

Em função da temperatura de incubação (Figura 5-25) observou-se similaridade das populações, incluídas em quatro grupos distintos, como apresentado a seguir: (1) similaridade de 20% entre as populações de arqueias metanogênicas dos reatores em batelada incubados em condição mesofílica e termofílica, (2) similaridade de 90% para as populações dos reatores C1, C2, C3, C4 e C5 incubados a 50°C; (3) similaridade de 90% foi observada para as populações dos reatores C6, C10 e C11 incubados a 64°C e 60°C e (4) similaridade de 74% para as populações dos reatores incubados em condições mesofílicas (35,8°C e 40°C).

Assim, considerando-se a temperatura de incubação dos reatores, observou-se mudanças significativas na estrutura das populações ao longo das condições experimentais. A maior produção de metano (18,07 mmol/L) foi obtida para o reator incubado a 64,2°C (C6), enquanto a menor produção de metano foi obtida a 35 e 40 °C; ou seja de 0,17 mmol/L, 0,60

mmol/L e 0,41 mmol/L, para as condições operacionais dos reatores C7, C8 e C9, respectivamente.

A

B

Figura 5-24: Perfil de bandas do DGGE para os domínios *Archaea* (A) and *Bacteria* (B).

Em relação ao domínio *Bacteria*, observou-se similaridade de 62% entre as populações dos reatores incubados a 60,0 °C (C10 e C11). A mesma similaridade (62%) foi observada para as populações dos reatores incubados a 50,0 °C (C1, C2, C3, C4 e C5).

Similaridade de 68% foi observada entre as populações de bactérias dos reatores incubados a 35,2 e 40,0 °C (C7-C9). Em contraste, observou-se similaridade de somente 22% entre as populações de bactérias dos reatores incubados em condições mesofílicas (C7 e C9, a 35,2 e 40,0 °C, respectivamente) e aquelas dos reatores incubados a 60 °C (C10 e C11).

Verificou-se similaridade de apenas 22% entre as populações do reator C10, com a maior produção de H₂ (17,7 mmol/L) e C7, com a menor produção de H₂ (3,5 mmol/L). Provavelmente, a variação de temperatura e da concentração de extrato de levedura teve efeito sobre o consórcio microbiano produtor de H₂.

O efeito da temperatura na seleção de microrganismos está bem estabelecido e este efeito foi claramente observado nos ensaios desse trabalho. Lazaro et al., (2014) também observaram esse aspecto em reatores em batelada de produção de H₂ a partir da vinhaça. Os

autores obtiveram 52% de coeficiente de similaridade entre as populações de bactérias na análise comparativa para as condições mesofílicas (37 °C) e termófilas (55 °C). Sob tais condições destaca-se que a origem do inóculo era mesofílica (37 °C) nos ensaios realizados por Lazaro et al. (2014) e termofílica (55°C) no presente estudo.

No entanto, existe uma falta de informação relacionada com o efeito da concentração de extrato de levedura na estrutura da população bacteriana. O extrato de levedura é rico em aminoácidos, nitrogênio, peptídeos e vitaminas que podem melhorar o crescimento microbiano e consequentemente a produção de hidrogênio (Kalil, Alshiyab et al., 2008).

Especificamente nesse trabalho, similaridade de 52% foi observada entre as populações bacterianas do ensaio com a menor (0,58 g/L) e maior (3,42 g/L) concentração de extrato de levedura. Baixa similaridade (66%) foi também observada entre as populações dos ensaios C8 e C9, incubados na mesma temperatura (40 °C), porém com 3,0 e 1,0 g/L de extrato de levedura, respectivamente. No mesmo sentido, similaridade de 64 % foi observada entre as populações dos ensaios incubados à 60 °C (C10 e C11) e 3,0 e 1,0 g/L de extrato de levedura, respectivamente

Em relação ao índice de diversidade de bactérias observou-se 3,15 para a biomassa dos reatores incubados a 60,0 e 35,2°C (Tabela 5-17). A partir desse valor, pode-se inferir que a temperatura não exerceu efeito sobre a diversidade de bactérias. Todavia, para as condições experimentais desses reatores observou-se produção de hidrogênio de 17,7 mmol/L e 3,5 mmol/L, respectivamente. Portanto, a diversidade de bactérias não foi afetada pela temperatura, mas, esta influenciou significativamente a produção de metabólitos.

Por outro lado, observou-se para os reatores incubados a 60°C (C10) maior riqueza de bactérias (índice Chao-1 – 34), em relação aos reatores C7, incubados a 35,2°C (índice Chao-1 – 29). Provavelmente, a mesma fonte de inóculo utilizada, tanto para os reatores mesófilos, como termófilos foi uma das razões pelas quais a temperatura não exerceu efeito sobre a diversidade bacteriana. No entanto, a variação da temperatura levou a diminuição da riqueza de bactérias em condições mesofílicas, o que reduziu significativamente a produção de hidrogênio.

Padrão semelhante foi observado para a população de arqueias metanogênicas. A diversidade de arqueias nos reatores com maior (18,07 mmol/L) e menor (0,17 mmol/L) produção de metano foi de 2,11 e 2,63 a 64°C e 35,2 °C, respectivamente. No entanto, a riqueza de arqueias nos reatores incubados a 64,2 °C e 35,2 °C foi de 22 e 9, respectivamente, indicando que a alteração na temperatura de incubação exerceu efeito significativo nas

populações de arqueias, resultando em baixa produção de metano em condição mesofílica e maior produção deste metabólito em condição termofílica.

Tabela 5-17: Índices de diversidade, dominância e riqueza para os domínios *Archaea* e *Bacteria*

Reator	<i>Archaea</i>		<i>Bacteria</i>			
	Índice de diversidade de Shannon	Dominância	Índice de Riqueza (Chao-1)	Índice de diversidade de Shannon	Dominância	Índice de Riqueza (Chao-1)
C1	2,80	0,07	16	3,32	0,04	34
C2	2,79	0,07	19	3,26	0,04	31
C3	2,76	0,07	19	3,17	0,05	30
C4	2,81	0,07	18	3,21	0,05	28
C5	2,97	0,06	19	3,52	0,03	29
C6	2,11	0,13	22	3,19	0,05	37
C7	2,63	0,09	9	3,15	0,04	29
C8	3,01	0,06	17	3,13	0,05	25
C9	3,16	0,05	24	3,45	0,03	25
C10	2,04	0,13	26	3,15	0,05	34
C11	2,14	0,12	8	3,02	0,05	26
Inóculo	2,64	0,08	16	3,43	0,04	34

C1, C2 e C3 (pontos centrais - 2,00 g/L de extrato de levedura à 50,0 °C); C4 (3,42 g/L de extrato de levedura à 50,0 °C); C5 (0,58 g/L de extrato de levedura à 50,0 °C); C6 (2,00 g/L de extrato de levedura à 64,2°C); C7 (2,00 g/L de extrato de levedura à 35,8°C); C8 (3,00 g/L de extrato de levedura à 40,0 °C); C9 (1,00 g/L de extrato de levedura à 40,0 °C); C10 (3,00 g/L de extrato de levedura à 60,0 °C) e C11 (1,00 g/L de extrato de levedura à 60,0 °C)

As maiores dominâncias de arqueias (0,13, 0,13 e 0,12) foram observadas nos ensaios com as maiores temperaturas de incubação (64,2, 60,0 e 60,0 °C, respectivamente), sendo que a máxima produção de metano (18,07 mmol/L) foi obtida em C6 (64,2 °C e 2,0 g/L de extrato de levedura, enquanto a menor dominância 0,05) foi observada em C9 (40 °C e 1 g/L de extrato de levedura) condição cuja produção de metano foi de 0,41 mmol/L. Assim é possível inferir que a dominância de grupos especialistas levaram a maior produção de metano. Em relação à dominância das populações bacterianas, observou-se pouca variação (0,03 a 0,05).

A diversidade de bactérias foi afetada pela concentração de levedura (p-valor 0,09) e sua interação com a temperatura (p-valor 0,09). A riqueza de bactérias foi positivamente afetada pela temperatura (p-valor 0,04), enquanto a dominância foi afetada pela temperatura (p-valor 0,03), concentração de extrato de levedura (p-valor 0,03) e pela interação entre as duas variáveis (p-valor 0,04) (Tabela 5-18).

Tabela 5-18: ANOVA para o efeito da concentração de extrato de levedura e temperatura nas populações de bactérias dos reatores em batelada do planejamento fatorial 1

Variável	SS	DF	MF	F- valor	P- valor	Fator
Diversidade						
Extrato de Levedura (L)	0,0494	1	0,0494	4,1767	0,0964	Significante
Temperatura x Extrato de Levedura	0,0506	1	0,0506	4,2767	0,0934	Significante
Dominância						
Extrato de Levedura (L)	0,0002	1	0,0002	15,8547	0,0105	Significante
Temperatura (L)	0,0001	1	0,0001	7,9162	0,0373	Significante
Temperatura x Extrato de Levedura (L)	0,0001	1	0,0001	5,4367	0,0670	Significante
Riqueza						
Temperatura (L)	56,7983	1	56,79833	6,8642	0,0471	Significante

SS- Soma dos Quadrados; DF – Graus de liberdade; MS – Média dos quadrados; L – Linear; Q- Quadrático. Nível de significância de 95%.

Em relação às populações de arqueias observou-se a maior diversidade no ensaio C9 (1 g/L de extrato de levedura a 40°C). Sob tais condições observou-se menor dominância (0,05). A menor diversidade (2,04) e maior dominância (0,13) foram observadas no ensaio C10 (3 g/L de extrato de levedura a 60°C). Neste ensaio (C10), obteve-se a maior produção de hidrogênio (17,7 mmol/L) e baixa produção de metano (7,33 mmol/L). Provavelmente, as condições aplicadas neste ensaio favoreceram a atividade bacteriana, mas não favoreceram o metabolismo de arqueias metanogênicas.

A temperatura teve efeito significativo na dominância e diversidade de arqueias metanogênicas (índice de Shannon). Verificou-se interação significativa entre temperatura e concentração de extrato de levedura para a riqueza de arqueias (índice Chao-1). Com base na análise de variância (ANOVA), os efeitos significativos para a dominância, diversidade e riqueza de arqueias são apresentados na Tabela 5-19.

Neste estudo, a diversidade de arqueias diminuiu com o aumento da temperatura. Em contraste, a dominância aumentou com o aumento da temperatura. Portanto, a maior produção

de metano (18,07 mmol/L) foi observada a 64,0 °C, enquanto a menor produção de metano foi obtida a 35,8 °C (0,17 mmol/L). Portanto, pode-se inferir que as populações metanogênicas foram favorecidas em altas temperaturas.

Tabela 5-19: ANOVA para os efeitos significativos na população de arqueias metanogênicas dos reatores em batelada do planejamento fatorial 1

Variável	SS	DF	MF	F- valor	P – valor	Fator
Diversidade						
Temperatura (L)	0,9267	1	0,9267	22,7913	0,0049	Significante
Temperatura (Q)	0,2657	1	0,2657	6,5345	0,0508	Significante
Dominância						
Temperatura (L)	0,0048	1	0,0048	26,8770	0,0035	Significante
Temperatura (Q)	0,0023	1	0,0023	13,3574	0,0146	Significante
Riqueza						
Temperatura x Extrato de Levedura	156,2500	1	156,2500	6,9852	0,0458	Significante

SS- Soma dos Quadrados; DF – Graus de liberdade; MS – Média dos quadrados; L – Linear; Q- Quadrático. Nível de significância de 95%.

5.2.7. Box Hunter e Hunter Termofílico

A partir do planejamento fatorial 1 descrito anteriormente foi possível observar que o aumento na concentração de extrato de levedura e temperatura levou ao aumento na produção de hidrogênio. No entanto, não foi possível a partir da variação das concentrações de extrato de levedura (0,58 a 3,42 g/L) e temperatura (35,8 à 64,4 °C) utilizadas no planejamento 1, definir as concentrações ótimas de extrato de levedura e BCA para alcançar a produção maximizada de hidrogênio.

Assim aplicou-se a ferramenta estatística, Box Hunter & Hunter, para mover a região experimental da variável resposta, produção de hidrogênio, por meio da elevação dos níveis das variáveis independentes. Com isso, foi possível avaliar níveis mais elevados de temperatura que puderam ser aplicados em um novo planejamento fatorial com a finalidade de obter a maximização da produção de hidrogênio. Para tanto, foram realizadas duas análises (Box Hunter & Hunter), sendo que na primeira, variou-se a concentração de extrato de levedura de 1,0 a 3,0 g/L e a temperatura de 40,0 a 60,0 °C. A partir dessas condições observou-se produção crescente de hidrogênio com o aumento de ambas as variáveis independentes (Figura 5-26).

Figura 5-25: Box Hunter e Hunter (1) para a produção de hidrogênio a partir da variação da concentração de extrato de levedura e temperatura.

A partir dos resultados obtidos anteriormente aumentou-se a temperatura de 60,0 à 90,0 °C e manteve-se a concentração de extrato de levedura, variando de 1,0 a 3,0 g/L (Figura 5-27).

Figura 5-26: Box Hunter e Hunter (2) para a produção de hidrogênio a partir da variação da concentração de extrato de levedura e temperatura

Verificou-se aumento da produção de hidrogênio para maiores valores de extrato de levedura, porém foi reduzida a 90°C, assim, novo planejamento experimental foi delineado variando-se a temperatura de 45,8 a 74,2 °C.

A concentração de extrato de levedura foi mantida nos níveis aplicados no planejamento 1 (de 0,58 a 3,42 g/L), uma vez que seria inviável biotecnologicamente o aumento desta variável a níveis superiores ao utilizado neste estudo. Os resultados do Planejamento Fatorial 2 estão apresentados a seguir.

5.2.8. Planejamento Fatorial Termofílico 2

A produção de hidrogênio a partir do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente com diferentes combinações de temperatura (°C) e concentração de extrato de levedura (g /L) com base no CCD é mostrada na Tabela 5-20.

Tabela 5-20: Composto Central dos fatores (decodificados) para a produção de hidrogênio

Reator	X ₁	X ₂	Produção de Hidrogênio (mmol/L)	
			Valor Experimental	Valor Predito
C1	1,00	50,0	5,35	5,88
C2	3,00	50,0	8,70	8,67
C3	1,00	70,0	3,60	2,46
C4	3,00	70,0	14,80	13,09
C5	2,00	45,8	1,75	1,09
C6	2,00	74,2	0,10	1,81
C7	0,58	60,0	8,60	8,81
C8	3,42	60,0	17,30	18,34
C9	2,00	60,0	8,95	9,17
C10	2,00	60,0	9,35	9,17
C11	2,00	60,0	9,20	9,17

X₁ – Concentração de extrato de levedura (mg/L); X₂ – Temperatura (°C)

A produção máxima de hidrogênio foi obtida no ensaio C8 (17,30 mmol/L) conduzido com 3,42 g / L de extrato de levedura à 60°C. Em contraste, a menor produção de hidrogênio 0,1 mmol/L) foi observada em C6 (2,00 g/L de extrato de levedura à 74,2 °C), indicando que a elevada temperatura de incubação foi adversa para as bactérias produtoras de hidrogênio.

Observou-se efeito linear da concentração de extrato de levedura e efeito quadrático da temperatura e concentração de extrato de levedura em nível inferior a 5%, além do efeito da interação entre as variáveis. A importância dos efeitos quadráticos e de interação teria sido perdida se os experimentos tivessem sido realizados usando os métodos convencionais. Além disso, os valores de efeito quadrático da temperatura foram menores que zero, indicando efeito negativo desse parâmetro na resposta, produção de hidrogênio.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para testar a significância das variáveis independentes na produção de hidrogênio (Tabela 5-21). O valor de p do coeficiente de regressão foi significativo ao nível de 0,05% e o coeficiente de determinação (R²) foi de 0,966, o que pode explicar até 96,6% de variabilidade da resposta e indica bom ajuste entre os

valores experimentais e preditos, sugerindo que o modelo foi consistente para a produção de hidrogênio.

Tabela 5-21: Tabela ANOVA para os efeitos significativos na produção de hidrogênio para os reatores em batelada termofílicos do planejamento fatorial 2

Variável	SS	DF	MS	F-valor	P-valor	Efeito
Temperatura (Q)	82,71	1	82,71	45,66	0,0011	Significativo
Extrato de Levedura (L)	90,14	1	90,14	49,76	0,0008	Significativo
Extrato de Levedura (Q)	26,97	1	26,97	14,89	0,0119	Significativo
Temperatura x Extrato de Levedura	15,40	1	15,40	8,50	0,0331	Significativo
Erro	9,06	5	1,81			
Total	265,59	10				

SS- Soma dos Quadrados; DF – Graus de liberdade; MS – Média dos quadrados; L – Linear; Q- Quadrático. Nível de significância de 95%.

Aplicando-se análise de regressão múltipla dos resultados experimentais obteve-se a equação polinomial para descrever a produção de hidrogênio a partir das variáveis independentes codificadas (Equação 16).

$$Y = 9,18 + 0,25 * X_1 - 3,83 * X_1^2 + 3,35 * X_2 + 2,17 * X_2^2 + 1,96 X_1 X_2 \quad (16)$$

Sendo,

Y = produção predita de hidrogênio (mmol/L),

X₁ = concentração do extrato de levedura (g/L) e

X₂ = temperatura de incubação (°C).

A partir do gráfico de superfície de resposta 3D observou-se os efeitos característicos das variáveis-chave do processo de produção de hidrogênio dos reatores em batelada termofílicos (Figura 5-28).

Figura 5-27: Superfície de resposta da interação entre a concentração de extrato de levedura e temperatura na produção de hidrogênio dos reatores em batelada termofílicos do planejamento fatorial 2.

O padrão côncavo da superfície de resposta representa os efeitos quadráticos e de interação, além do efeito linear. A produção de hidrogênio foi significativamente afetada linearmente pela concentração de extrato de levedura e pelo efeito quadrático da temperatura.

A variação da temperatura pode exercer efeito sobre a atividade das enzimas bacterianas. Temperatura elevadas podem provocar a inativação irreversível de algumas enzimas, no entanto, microrganismos hipertermófilos, com temperaturas de crescimento ótimas superiores a 80°C, produzem enzimas tipicamente termoestáveis com atividade ótima em altas temperaturas. As enzimas termoestáveis são extremamente específicas e têm assim aplicação potencial significativa em processos industriais, principalmente na hidrólise da biomassa lignocelulósica, devido à sua solubilidade aumentada a reagentes e produtos, levando ao aumento das velocidades de reação e, conseqüentemente, diminuindo a quantidade de enzima requerida (HAKI; RAKSHIT, 2003).

As enzimas termofílicas atingem a máxima eficiência entre 60 e 80°C e não funcionam adequadamente em temperatura abaixo de 40 °C (VIEILLE; ZEIKUS; VIEILLE, 2001). No presente estudo, observou-se claramente o efeito da temperatura sobre a atividade bacteriana,

uma vez que observou-se, os menores valores de hidrogênio (1,75 e 0,1 mmol/L) em temperaturas mesofílicas (45,8 °C) e hipertermófilas (74,2 °C), respectivamente.

Muitas bactérias têm produzido enzimas celulolíticas termoestáveis, como *Clostridium paradoxum*, os quais podem sobreviver a 121 °C durante 2 horas, antes de terem reduzida sua população (CANGANELLA; WIEGEL, 2014). Neste sentido, os microrganismos termofílicos termoestáveis podem ser a chave para a produção de biogás a partir de biomassa complexa como a lignocelulósica.

A produção biológica de hidrogênio a partir da biomassa lignocelulósica também é afetada pela fonte e disponibilidade de nitrogênio. Ferchichi e colaboradores (FERCHICHI et al., 2005) relataram que a fonte de nitrogênio teve efeito marcante na produção de hidrogênio. Esses autores avaliaram a suplementação do meio de cultura com extrato de levedura, licor de milho, casaminoácidos, triptona e peptona. Entre estas, o extrato de levedura foi a fonte de nitrogênio na qual se obteve maior produção de hidrogênio.

O extrato de levedura é uma fonte complexa de nitrogênio constituída por diferentes peptídeos e aminoácidos, que são incorporados a partir do meio de cultura por células de bactérias para a produção de proteínas e outros componentes nitrogenados celulares (FERCHICHI et al., 2005). No presente estudo, a produção máxima de hidrogênio (17,30 mmol/L) foi obtida utilizando-se a concentração mais alta de extrato de levedura (3,42 g/L). O efeito da concentração de extrato de levedura na produção de hidrogênio foi evidenciado, principalmente na condição com a mesma temperatura, mas com diferentes concentrações de extrato de levedura. A 50 °C (C1 e C2), a produção de hidrogênio foi de 5,35 e 8,70 mmol/L com 1,0 e 3,0 g/L de extrato de levedura, respectivamente. Do mesmo modo, à 70 °C (C3 e C4) o efeito do extrato de levedura foi também observado, uma vez que a produção de hidrogênio foi de 3,60 e 14,80 mmol/L usando 1,0 e 3,0 g/L de extrato de levedura, respectivamente.

5.2.8.1. Ácidos Orgânicos e Metano

Produção de ácidos orgânicos foi observada concomitantemente à formação de hidrogênio (Tabela 5-22) em todas as condições experimentais do planejamento fatorial 2.

Tabela 5-22: Ácidos orgânicos nas diferentes condições experimentais dos reatores em batelada termofílicos do planejamento fatorial 2

Reatores	Fórmico	Acético	Ácidos Propiônico	Orgânicos Isobutírico	(mg/L) Butírico	Isovalérico
C1	309,74	121,52	220,12	80,52	83,54	-
C2	40,45	359,73	139,98	161,48	-	140,79
C3	-	332,68	106,37	161,15	80,27	84,75
C4	69,30	156,57	231,82	416,92	78,51	100,75
C5	-	79,98	38,24	-	-	-
C6	43,96	119,82	40,48	-	-	-
C7	-	92,05	51,04	264,31	-	-
C8	37,07	165,29	50,04	383,24	104,59	-
C9	-	111,14	45,18	230,96	1.205,59	-
C10	-	170,26	68,37	147,25	114,72	127,66
C11	-	69,36	55,73	309,17	-	-

C1 (1,00 g/L de extrato de levedura á 50 °C); C2 (3,00 g/L de extrato de levedura á 50 °C); C3 (1,00 g/L de extrato de levedura á 70 °C); C4 (3,00 g/L de extrato de levedura á 70 °C); C5 (2,00 g/L de extrato de levedura á 45,8 °C); C6 (2,00 g/L de extrato de levedura á 74,2 °C); C7 (0,58 g/L de extrato de levedura á 60 °C); C8 (3,42 g/L de extrato de levedura á 60 °C); C9-C10 e C11 (2,00 g/L de extrato de levedura á 60 °C).

A partir da análise de CCD para os ácidos orgânicos foi possível observar que apenas a produção de ácido isobutírico foi afetada significativamente pela temperatura (p-valor 0,03). A máxima produção de ácido butírico (1.205,59 mg/L) ocorreu em C9 (escrever), ponto central do planejamento experimental (2 g/L de extrato de levedura e 60°C). Nesta condição observou-se produção de hidrogênio de 8,95 mmol/L.de acordo com a tabela esse valor é para o ácido butírico.

Em C8 (3,42 g/L de extrato de levedura à 60 °C) observou-se a máxima produção de hidrogênio (13,30 mmol/L) e predomínio dos ácidos acético, isobutírico e butírico (165,29; 383,24 e 104,59 mg/L, respectivamente).

Em contrapartida, em C6 (2,00 g/L de extrato de levedura), condição com menor produção de hidrogênio (0,1 mmol/L) e maior temperatura de incubação (74,2 °C) observou-se menor concentração de ácido acético, fórmico e propiônico (119,82; 43,96 e 40,48 mg/L, respectivamente).

Produção de metano foi obtida em todas as condições, exceto em C6 (2,00 g/L de extrato de levedura) cuja maior temperatura (74,2°C) foi aplicada (Tabela 5-23).

Tabela 5-23: Parâmetros de produção de metano em diferentes condições experimentais dos reatores em batelada termofílicos do planejamento fatorial 2

Reatores em Batelada	P	R_m	λ	R^2
	mmol/L	mmol/L.h	horas	
C1	7,26	0,03	40,92	0,95
C2	5,96	0,02	3,89	0,88
C3	3,96	0,07	147,73	0,99
C4	2,37	0,11	1,78,63	0,99
C5	3,69	0,04	42,39	0,99
C6	-	-	-	-
C7	0,17	0,02	186,57	0,99
C8	0,61	0,02	151,26	0,99
C9	1,68	0,06	175,26	0,99
C10	1,59	0,04	181,38	0,99
C11	1,78	0,09	173,85	0,99

P - Produção potencial máxima de metano; R_m – Taxa máxima de produção de metano; λ – Tempo para iniciar a produção de metano. C1 (1,00 g/L de extrato de levedura á 50 °C); C2 (3,00 g/L de extrato de levedura á 50 °C); C3 (1,00 g/L de extrato de levedura á 70 °C); C4 (3,00 g/L de extrato de levedura á 70 °C); C5 (2,00 g/L de extrato de levedura á 45,8 °C); C6 (2,00 g/L de extrato de levedura á 74,2 °C); C7 (0,58 g/L de extrato de levedura á 60 °C); C8 (3,42 g/L de extrato de levedura á 60 °C); C9-C10 e C11 (2,00 g/L de extrato de levedura á 60 °C).

A partir da análise de CCD, não foi verificado efeito significativo da temperatura de incubação e concentração de extrato de levedura na produção de metano. A máxima produção de metano (7,26 mmol/L) foi observada em C1 (1,00 g/L de extrato de levedura e 50°C).

Produção de metano superior ao observado neste estudo (291,92 mmol) foi reportada por O-Thong et al, (2012) a partir de efluente da indústria de óleo de palma usando lodo de digestor anaeróbio do tratamento de estrume inóculo à 55°C. Maior produção de metano reportada por estes autores em relação ao presente estudo provavelmente deve-se a elevada concentração de substrato 13 g ST/L usada como substrato e a alta concentração de inóculo (53,5 g STV/L) em relação a menores valores usados neste estudo (2 g/L de BCA e 2,76 gSTV/L).

5.2.8.2. Carboidratos

A degradação da biomassa lignocelulósica (BCA) dos reatores em batelada termofílicos do planejamento fatorial 2 foi confirmada pela observação de açúcares nas amostras do final de operação de todas as condições experimentais (Tabela 5-24).

Tabela 5-24: Principais açúcares dos reatores em batelada termofílicos do planejamento fatorial 2

Reatores	Carboidratos (mg/L)				
	Xilose	Galactose	Arabinose	Manose	Frutose e Sacarose
C1	113,36	67,35	274,88	100,75	51,64
C2	-	166,88	-	-	
C3	-	482,32	310,46	547,75	
C4	670,44	-	640,87	794,85	
C5	-	-	-	-	
C6	-	140,12	218,16	220,21	7,18
C7	-	103,71	-	-	
C8	-	293,95	-	-	
C9	173,92	-	-	-	
C10	287,07	-	-	-	
C11	591,44	-	-	-	

C1 (1,00 g/L de extrato de levedura á 50 °C); C2 (3,00 g/L de extrato de levedura á 50 °C); C3 (1,00 g/L de extrato de levedura á 70 °C); C4 (3,00 g/L de extrato de levedura á 70 °C); C5 (2,00 g/L de extrato de levedura á 45,8 °C); C6 (2,00 g/L de extrato de levedura á 74,2 °C); C7 (0,58 g/L de extrato de levedura á 60 °C); C8 (3,42 g/L de extrato de levedura á 60 °C); C9-C10 e C11 (2,00 g/L de extrato de levedura á 60 °C).

Os principais açúcares obtidos, neste estudo, a partir da hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica foram os seguintes: xilose, galactose, arabinose, manose, frutose e sacarose. A maior produção de açúcar neste estudo, foi observada nos reatores C3 (1,00 g/L de extrato de levedura à 70 °C) e C4 (3,00 g/L de extrato de levedura à 70 °C). Em C3 observou-se produção de 482, 32, 310,46 e 547,75 mg/L de galactose, arabinose e manose, respectivamente, enquanto em C4 foram observados 670,44, 640,87 e 794,85 mg/L de xilose, arabinose e manose, respectivamente.

Polímeros de β -1,4-D-xilose são os principais constituintes da hemicelulose e podem ser utilizados por bactérias termofílicas anaeróbia na produção de etanol e outros compostos biotecnológicos. A conversão da glicose, liberada a partir da hidrólise da celulose e hemicelulose por bactérias sacarolíticas termofílicas é realizada principalmente pela rota Embden Meyerhof Parnas (EMP). O metabolismo de pentoses, como a xilose e arabinose, produzidas no presente estudo, ocorre pela via pentose fosfato, não oxidativa realizada por

bactérias termofílicas a partir da ação de amplo espectro de enzimas, tais como a endo- β -1,4 xilanase depolimerase, β -glicosidases, β -xilosidases, dentre outras, observadas em C8 (sessão 5.2.5.6.5). No mesmo sentido, pentoses, como manose e galactose, ambas observadas neste estudo, podem ser direcionadas a rota EMP pela ação de diversas enzimas de bactérias termofílicas e convertidas a ácidos orgânicos, hidrogênio e etanol (CHANG; YAO, 2011); ou seja, produtos observados neste estudo.

5.2.8.3. *Caracterização Microbiana*

Caracterização das bactérias e arqueias metanogênicas foi realizada por meio de PCR/DGGE para todas as condições finais dos reatores em batelada do planejamento fatorial 2. Similaridade de apenas 6% foi observada entre as populações de arqueias da condição C5 (única condição incubada em temperatura mesofílica – 45,8 °C e 2,00 g/L de extrato de levedura), em relação às demais populações das demais condições do planejamento fatorial 2. A partir dessa análise pode-se inferir que a temperatura afetou as populações de arqueias metanogênicas.

A menor similaridade (8%) foi observada entre as populações de arqueia de C5 (2,0 g/L de extrato de levedura e 45,8 °C) em relação às demais condições, corroborando o efeito da temperatura na estrutura das populações destes organismos.

Na condição C6 (2,0 g/L de extrato de levedura e 74,2 °C) não se obteve perfil de bandas de DGGE. Nesta condição não se obteve produção de metano, sendo observada a menor produção de hidrogênio (0,1 mmol/L), provavelmente, devido à elevada temperatura de incubação (74,2 °C) que causou inibição das arqueias metanogênicas.

Maior similaridade (88%) foi observada entre as populações de arqueias de C3 (1,00 g/L de extrato de levedura à 70 °C) e C4 (3,00 g/L de extrato de levedura à 70 °C), corroborando o efeito da temperatura nas populações de arqueias.

Similaridade de 50% foi observada entre as populações de C7 (0,58 g/L de extrato de levedura á 60 °C) e C8 (3,42 g/L de extrato de levedura á 60 °C), condições com a menor e maior concentração de extrato de levedura, respectivamente (Figura 5-29). A partir desta análise pode-se inferir que a disponibilidade do extrato de levedura no meio de cultura alterou a estrutura das populações de arqueias metanogênicas.

A

B

Figura 5-28: Perfil de bandas do DGGE para os domínios *Archaea* (A) and *Bacteria* (B) para as condições C1 (1,00 g/L de extrato de levedura á 50 °C); C2 (3,00 g/L de extrato de levedura á 50 °C); C3 (1,00 g/L de extrato de levedura á 70 °C); C4 (3,00 g/L de extrato de levedura á 70 °C); C5 (2,00 g/L de extrato de levedura á 45,8 °C); C6 (2,00 g/L de extrato de levedura á 74,2 °C); C7 (0,58 g/L de extrato de levedura á 60 °C); C8 (3,42 g/L de extrato de levedura á 60 °C); CP (2,00 g/L de extrato de levedura á 60 °C).

Similaridade de 10% foi observada entre as populações de bactérias de C3 (1 g/L de extrato de levedura à 70°C) em relação às demais condições, indicando que a menor concentração de extrato de levedura combinada a alta temperatura de incubação foram desfavoráveis para o crescimento microbiano. Nesta condição (C3) observou-se no final do experimento (350 horas) elevada concentração de galactose, arabinose e manose (482,32, 310,46 e 547,75 mg/L, respectivamente) indicando que as bactérias celulolíticas realizaram a hidrólise do BCA, porém a atividade das bactérias fermentativas foi inibida, levando ao acúmulo de açúcares e baixa produção de hidrogênio.

A maior diversidade de arqueias (1,71) foi observada em C1(1,0 g/L de extrato de levedura à 50 °C), condição com a maior produção de metano (7,26mmol/L), enquanto em C6

(2,00 g/L de extrato de levedura à 74,2 °C), condição na qual não se observou produção de metano, também não foram observadas bandas referentes ao domínio archaea (Tabela 5-25).

Tabela 5-25: Índice de diversidade (Shannon-Winner), Dominância e Riqueza (Chao-1) para os domínios Archaea e Bacteria dos reatores em batelada termofílicos do planejamento fatorial 2

Reator	Archaea			Bacteria		
	Diversidade	Dominância	Riqueza	Diversidade	Dominância	Riqueza
C1	1,71	0,19	6	3,40	0,03	32
C2	1,08	0,34	3	2,83	0,06	19
C3	0,69	0,50	2	2,25	0,11	11
C4	1,03	0,37	3	2,82	0,06	18
C5	1,58	0,21	5	3,45	0,03	34
C6	-	-	-	2,49	0,09	14
C7	1,86	0,16	7	3,16	0,04	27
C8	1,02	0,38	3	2,92	0,05	21
C9	0,49	0,68	2	3,02	0,05	24
C10	0,54	0,64	2	2,96	0,05	23
C11	0,53	0,64	2	3,01	0,05	23

C1 (1,00 g/L de extrato de levedura a 50 °C); C2 (3,00 g/L de extrato de levedura a 50 °C); C3 (1,00 g/L de extrato de levedura a 70 °C); C4 (3,00 g/L de extrato de levedura a 70 °C); C5 (2,00 g/L de extrato de levedura a 45,8 °C); C6 (2,00 g/L de extrato de levedura a 74,2 °C); C7 (0,58 g/L de extrato de levedura a 60 °C); C8 (3,42 g/L de extrato de levedura a 60 °C); CP (2,00 g/L de extrato de levedura a 60 °C).

A maior diversidade e riqueza bacteriana (3,45 e 3,40 respectivamente) foram observadas em C5 (2,00 g/L de extrato de levedura à 45,8 °C) e C1 (1,00 g/L de extrato de levedura à 50 °C). Em C5 observou-se a menor produção de hidrogênio (1,75 mmol/L) e de ácidos orgânicos (118,22 mg/L).

Aplicando-se o CCD para avaliar o efeito das variáveis independentes na estrutura da comunidade microbiana observou-se efeito significativo da temperatura e da concentração de extrato de levedura na dominância e diversidade das populações de arqueias metanogênicas, enquanto que a riqueza de arqueias metanogênicas foi afetada apenas pela temperatura (Tabela 5-26).

Tabela 5-26: ANOVA para os efeitos significativos das populações do Domínio Archaea dos reatores em batelada termofílicos do planejamento fatorial 2

Variável	SS	DF	MF	F- valor	P – valor	Efeito
Diversidade						
Temperatura (L)	1,14	1	1,14	9,97	0,02	Significante
Extrato de Levedura (Q)	0,79	1	0,79	6,97	0,04	Significante
Dominância						
Temperatura (Q)	0,16	1	0,16	13,12	0,015	Significante
Extrato de Levedura (Q)	0,25	1	0,25	20,09	0,006	Significante
Riqueza						
Temperatura	13,11	1	13,11	8,72	0,03	Significante

SS- Soma dos Quadrados; DF – Graus de liberdade; MS – Média dos quadrados; L – Linear; Q- Quadrático. Nível de significância de 95%.

No mesmo sentido, a dominância, diversidade e riqueza bacteriana foram afetadas significativamente pela temperatura e pela interação entre as variáveis independentes (Tabela 5-27).

Tabela 5-27: ANOVA para os efeitos significativos na estrutura das populações do Domínio Bacteria dos reatores em batelada termofílicos do planejamento fatorial 2

Variável	SS	DF	MF	F- valor	P – valor	Efeito
Diversidade						
Temperatura (L)	0,800	1	0,800	46,56	0,001	Significante
Interação	0,320	1	0,320	18,77	0,007	Significante
Dominância						
Temperatura (L)	0,003	1	0,003	36,30	0,001	Significante
Interação	0,001	1	0,001	18,36	0,007	Significante
Riqueza						
Temperatura (L)	316,063	1	316,063	41,18	0,001	Significante
Interação	100,000	1	100,000	13,02	0,015	Significante

SS- Soma dos Quadrados; DF – Graus de liberdade; MS – Média dos quadrados; L – Linear; Q- Quadrático. Nível de significância de 95%.

5.2.8.4. *Composição microbiana do reator em batelada termofílico de melhor produção de H₂ do planejamento fatorial 2*

Para avaliar a composição taxonômica dos microrganismos do reator em batelada (C8 – 3,42 g/L de extrato de levedura à 60 °C) de maior produção de hidrogênio, procedeu-se a análise de metagenoma, sendo utilizado os bancos de dados SEED, KEEG, subsystem com valor de corte (E-valor) de 10^{-5} baseado nos bancos de dados disponibilizados no MG-RAST.

Foram utilizadas 1.890.048 sequências nas análises taxonômicas de C8 (Tabela 5-28). O número de OTUs e sequências únicas (singletons) foram de 398 e 159, respectivamente, enquanto os valores dos índices de Shannon_H e Chao-1 foram de 3,164 e 405, respectivamente.

Tabela 5-28: Análise de metagenoma do reator em batelada C8 do planejamento fatorial 2.

Amplicons	
Número de sequências	1890048
Índice de Diversidade	
Shannon_H	3,164
Estimador de riqueza	
Chao-1	405
Dados do rRNA	
Número de OTUs	398
Singletons	158
Cobertura de Good	99,99%

Em nível de domínio, a maioria das leituras foi atribuída ao Domínio Bacteria, com abundância relativa de 93,19%. As leituras para o Domínio Archaea representaram 6,74% (Figura 5-30). Para os representantes do Domínio Eukarya e Vírus verificou-se abundância relativa menor do que 0,1%.

Figura 5-29: Perfil taxonômico em nível de domínio do reator de maior produção de hidrogênio (C8 – 3,42 g/L de extrato de levedura à 60 °C). As sequências do DNA total foram atribuídas aos domínios Archaea, Bacteria, Eukarya, além de Vírus.

Em relação ao domínio Archaea verificou-se que os representantes pertencentes ao filo Euryarchaeota foram os mais abundantes (96,22 %). Nesse filo estão incluídas as arqueias metanogênicas. Todavia, foram identificados ainda representantes pertencentes aos filos Crenarchaeota (3,17 %), Korarchaeota (0,46 %), Thaumarchaeota (0,14 %) e Nanoarchaeota (0,009 %).

Foram identificados 41 gêneros pertencentes ao domínio Archaea, sendo que *Methanothermobacter* foi o mais abundante (59,86%). O gênero *Methanothermobacter* inclui microrganismos termofílicos produtores de metano, não formadores de endósporos, anaeróbios estritos com crescimento ótimo entre 55 e 65 °C e hidrogenotróficos. Algumas espécies podem ainda consumir formiato como doador de elétrons e reduzir enxofre a sulfeto (WASSERFALLEN et al., 2000). Em C8, foi observada produção de metano e hidrogênio de 0,61 e 17,30 mmol/L, respectivamente, ensaios cujos reatores foram incubados à 60°C, indicando que as condições impostas nesta condição foram favoráveis ao desenvolvimento destas arqueias metanogênicas.

Microrganismos semelhantes à *Pyrococcus* foram identificados com abundância relativa de 6,19%. Tais arqueias metanogênicas são termofílicas estritas, com crescimento ótimo entre 70 e 103 °C, capazes de fermentar amido, maltose, peptona e substratos complexos, produzindo H₂ e CO₂ como metabólitos. Em concentrações elevadas de H₂, tem seu crescimento inibido e produz H₂S, caso enxofre seja disponibilizado no meio de cultura (FIALA; STETTER, 1986). A espécie tipo deste gênero é *Pyrococcus furiosus*, os quais sintetizam enzimas termoestáveis com potencial aplicação em processos industriais

(KENGEN, 2017). Então tais arqueias foram favorecidas pela temperatura de incubação aplicada em C8 (60°C).

Foram identificados ainda outros gêneros de arqueias metanogênicas com abundância relativa superior a 1 %, tais como *Thermococcus* (5,43%), *Methanosarcina* (3,96%), *Methanocaldococcus* (2,77%), *Methanococcus* (2,52%), *Archaeoglobus* (2,38%), *Methanosaeta* (1,94%), *Methanobrevibacter* (1,93%), *Methanosphaera* (1,33%) e *Methanocullens* (1,25%).

Thermococcus e *Pyrococcus* pertencem ao filo Euryarchaeota e Família Thermococcaceae. Em relação à *Thermococcus* a espécie tipo é *T. celer*, a qual é quimiorganotrófica, capaz de crescer a partir de extrato de levedura, peptona, extrato de carne e caseína, com crescimento favorecido na presença de enxofre elementar utilizado na produção de H₂S (NEUMER et al., 1990). Neste gênero estão incluídas arqueias hipertermofílicas, anaeróbias barofílicas, como a espécie *T. barophilus*, relacionada ao metabolismo do enxofre com crescimento ótimo a 40 mPa à 95°C (MARTEINSSON et al., 1999). A elevada concentração de extrato de levedura aplicada em C8 (3,42 g/L), provavelmente favoreceu esta arqueia metanogênica.

Microrganismos pertencentes ao gênero *Methanosarcina* apresentam importância biotecnológica devido à plasticidade metabólica de suas espécies, as quais podem utilizar além de hidrogênio, compostos metilados, tais como metanol e metilaminas e acetato em seu metabolismo. Espécies de *Methanosarcina* são encontradas em diversos ambientes naturais e artificiais, como ambientes marinhos, sedimentos de água doce, solo e em digestores anaeróbios (KERN et al., 2016). No reator C8 foi observado 165,29 mg/L de ácido acético, um dos substratos utilizados por estas arqueias em seu metabolismo.

Arqueias pertencentes ao gênero *Methanocaldococcus* podem ser hipertermofílica com crescimento entre 50 e 90 °C e realizam metabolismo hidrogenotrófico para produção de metano. O crescimento destes microrganismos é estimulado pela adição de selênio e extrato de levedura (BELLACK et al., 2011; L'HARIDON et al., 2003). O crescimento de espécies de *Methanococcus*, também é estimulado pela adição de selênio e extrato de levedura. Estas arqueias são anaeróbias estritas com crescimento entre 49 e 89°C e utilizam CO₂ e H₂ na produção de CH₄ (JEANTHON et al., 1999). No reator C8 foi adicionado 3,42 g/L de extrato de levedura e temperatura de incubação de 60 °C, fatores que provavelmente favoreceram estas arqueias metanogênicas.

Arqueias do gênero *Archaeoglobus* são microrganismos anaeróbios estritos, com crescimento entre 60 e 95 °C que utilizam vasta gama de substrato em seu metabolismo, tais como H₂, CO₂, sulfito, tiosulfato, ácidos orgânicos, carboidratos, peptona, etanol, extrato de levedura (HUBER et al., 1997). No presente estudo, estes microrganismos possivelmente foram favorecidos pela temperatura de incubação (60 °C) além de pela produção de hidrogênio, ácidos orgânicos e carboidratos.

As arqueias metanogênicas do gênero *Methanosaeta*, assim como as semelhantes a *Methanosarcina*, ambas identificadas neste trabalho, utilizam acetado em seu crescimento, todavia empregam diferentes enzimas para catálise do primeiro passo da metanogênese acetoclástica. Além disso, menor taxa de crescimento e rendimento de metano é observado para representantes de *Methanosaeta* em relação à *Methanosarcina* (SMITH; INGRAM-SMITH, 2007). Vale ressaltar que no presente estudo utilizou-se lodo granular de reator UASB como inóculo, sendo as arqueias dos gêneros *Methanosaeta* e *Methanosarcina* as principais reesponsáveis pela formação inicial e desenvolvimento dos grânulos (SCHMIDT; AHRING, 1996)

Representantes de *Methanobrevibacter* são anaeróbios estritos, com crescimento ótimo entre 10 e 37°C, o qual é estimulado pela adição de extrato de levedura, aminoácidos ou fluído de rumem e que utilizam H₂ e CO₂ e formiato como fonte de energia. A elevada concentração de extrato de levedura (3,42 g/L), possivelmente estimulou estes organismos nas condições dos reatores C8.

Os microrganismos do gênero *Methanospaera* reduzem metanol com hidrogênio para a produção de metano e requerem vitamina B no crescimento, bem como NH₄ ou aminoácidos como fontes de nitrogênio. A temperatura ótima de crescimento de microrganismos pertencentes a este gênero é de 37°C (MILLER; WOLIN, 1985). No reator C8 identificou-se apenas 1,33% de representantes desse gênero, talvez favorecidos pela vitamina B do extrato de levedura e H₂/CO₂ do processo fermentativo. Além disso, provavelmente, alguns representantes desse gênero bem como *Methanobrevibacter* toleraram temperatura acima do limite ótimo de crescimento, uma vez que o reator em batelada C8 foi incubado a 60°C.

Em relação à *Methanoculleus* estão incluídos microrganismos metanogênicos hidrogenotróficos com crescimento ótimo entre 22 e 50°C, como por exemplo *M. palmolii*, a qual foi isolada de água residuária de biorreator metanogênico do tratamento de efluentes de indústria de óleo de palma (ZELLNER et al., 1998). No presente estudo este gênero foi

identificado em reator em batelada com bagaço de cana-de-açúcar como substrato (Figura 5-31).

Outros gêneros foram identificados no presente estudo, porém em abundância relativa abaixo de 1%, tais como, *Methanosphaerula*, *Methanococcoides*, *Methanospirillum*, *Methanopyrus*, *Thermofilum*, *Sulfolobus*, *Thermoplasma*, *Pyrobaculum*, *CandidatusKorarchaeum*, *Methanocorpusculum*, *Ferroplasma*, *Haloarcula*, *Methanoregula*, *Ignicoccus*, *Staphylothermus*, *Hyperthermus*, *Halobacterium*, *Halogeometricum*, *Picrophilus*, *Halomicrobium*, *Natronomonas*, *Nitrosopumilus*, *Desulfurococcus*, *Metallosphaera*, *Haloquadratum*, *Halorhabdus*, *Thermoproteus*, *Caldivirga*, *Aeropyrum*, *Nanoarchaeum*, possivelmente corroborando em sintrofismo com os microrganismos mais abundantes na geração de produtos de valor biotecnológicos obtidos no presente estudo.

A

B

Figura 5-30: Filos (A) e principais gêneros (B) do domínio Archaea identificados no reator em batelada C8 do planejamento fatorial 2 baseada em análise de Metagenômica

Considerando o domínio Bacteria, o filo mais abundante foi o Firmicutes (70,78%), cuja maioria dos membros estabelece relações sintróficas que podem degradar diversos ácidos orgânicos que são produzidos em reatores anaeróbios (GARCIA-PEÑA et al., 2011). Todavia, foram identificados com abundância relativa acima de 0,5% representantes pertencentes aos filotermotogae (9,87 %), Proteobacteria (5,61 %), Synergistetes (1,16 %) e Actinobacteria (1,02%), Chloroflexi (0,78%) e Cyanobacteria (0,72%).

Foram identificados 328 gêneros do Domínio Bacteria, dos quais apenas 15 estavam em abundância relativa acima de 1 % (*Coprothermobacter* 39,31%, *Clostridium* 9,23 %, *Thermotoga* 5,82 %, *Caldanaerobacter* 4,15 %, *Fervidobacter* 3,25 %, *Moorela* 2,99 %, *Thermoanaerobacter* 2,27 %, *Pelotomaculum* 2,16 %, *Carboxydotherrmus* 1,91 %, *Desulfotomaculum* 1,88 %, *Bacillus* 1,48 %, *Caldicellulosiruptor* 1,37 %, *Desulfitobacterium* 1,35 %, *Alkaliphilus* 1,25 %, *Symbiobacterium* 1,19 % e *Termosipho* 1,00 %) (Figura 5-32).

Bactérias semelhantes a *Coprothermobacter* são termofílicas, anaeróbias estritas, não formadoras de endósporos, proteolíticas, fermentam glicose e lactose, porém utilizam escassamente outros carboidratos a menos que o meio de cultura seja enriquecido com extrato de levedura ou fluído de rumem. Os principais metabólitos produzidos por estes microrganismos são H₂, CO₂ e ácido acético. A temperatura ótima para o crescimento é de 65°C (RAINEY; STACKEBRANDT, 1993). No presente trabalho, *Coprothermobacter* foi o gênero mais abundante (39,31 %) na condição C8 do planejamento fatorial 2, cuja temperatura de incubação e concentração de extrato de levedura foram de 60 °C e 3,42 g/L, respectivamente. A melhor produção de hidrogênio de 17,30 mmol/L foi obtida nessas condições, as quais foram favoráveis para o desenvolvimento e metabolismo destas bactérias semelhantes a esse gênero.

Representantes semelhantes a *Clostridium* (9,23 %), identificado em C8, é um dos principais produtores de hidrogênio e é encontrado em diversos ambientes naturais e artificiais, tais como lodo de lagoa facultativa do tratamento de água residuária proveniente da indústria de papel e celulose (RABELO; SOARES; VARESCHE, 2017), lodo de reator anaeróbio (GUO et al., 2015), grama (DESVAUX, 2005) e fontes termais (LEE et al., 1993).

Espécies do gênero *Thermotoga* são termofílicas ou hipertermofílicas com crescimento ótimo entre 50 e 90°C (KANOKSILAPATHAM et al., 2015), anaeróbios estritos e não formadoras de endósporos (MORI et al., 2014).

Figura 5-31 Filos (A) e principais gêneros (B) do domínio Bacteria identificados no reator em batelada C8 do planejamento fatorial 2 baseada em análise de Metagenômica

O gênero *Caldanaerobacter* compreende espécies produtoras de endósporos, anaeróbias estritas, fermentadoras e termofílicas resistentes a elevadas temperaturas. *C. subterraneus* subsp. *Subterraneus*, por exemplo, após exposição por 45 minutos a 120 °C foi cultivada, indicando a formação de formas de resistência. Tal subespécie apresenta

crescimento entre 40 e 80 °C com temperatura ótima de cultivo entre 65 e 75 °C (FARDEAU et al., 2004).

Em relação a *Fervidobacterium* estão incluídas espécies termofílicas com crescimento ótimo entre 60 e 80 °C, anaeróbias e fermentadoras de carboidratos com formação de etanol, acetado, lactato e H₂, como metabólitos principais (ANDREWS; PATEL, 1996). Em C8, observou-se ácido acético, hidrogênio, possivelmente produzidos, dentre outros, por estes microrganismos.

Gossne et al.(1999) reportaram que solos sujeitos a elevadas temperaturas abrigam microrganismos comensais que estabelecem relações tróficas que contribuem com atividades enzimáticas *in situ* como espécies dos gêneros *Moorella* (*M. thermoacetica*) e *Themicanus* (*T. aegyptius*), as quais via transferência interespecífica de H₂, formiato e lactato, crescem a partir de oligossacarídeos. Em C8, cuja temperatura de incubação foi de 60°C, observou-se bactérias semelhantes ao gênero *Moorella*, possivelmente em associação sintrófica com outros microrganismos relacionados ao metabolismo do hidrogênio.

O gênero *Thermoanaerobacter* inclui bactérias termofílicas com crescimento ótimo a 65°C, anaeróbias estritas, produtoras de etanol, hidrogênio, ácido láctico, ácido acético, CO₂ e H₂S (LEE et al., 1993). Neste estudo, esse gênero provavelmente foi favorecido pela temperatura de incubação (60 °C) em C8, sendo observado ácido acético e hidrogênio.

O gênero *Pelotomaculum* inclui microrganismos anaeróbios estritos, termofílicos capazes de oxidar ácido propiônico, ácido láctico e álcoois em associação sintróficas com arqueias metanogênicas hidrogenotróficas. O ácido propiônico é um dos intermediários do processo de digestão anaeróbia que é acumulado quando o sistema torna-se instável. Microrganismos oxidantes de propionato, como os do gênero *Pelotomaculum* convertem ácido propiônico em acetato, CO₂ e H₂, quando a pressão parcial de hidrogênio é mantida baixa, sendo, portanto altamente dependente de microrganismos consumidores de hidrogênio (IMACHI et al., 2002). Em C8 obteve-se produção de 50,04 mg/L de ácido propiônico, 17,3 mmol/L de hidrogênio e 164,29 mg/L de ácido acético, possivelmente relacionados ao metabolismo destes microrganismos.

Microrganismos anaeróbios termofílicos, com crescimento entre 50 e 70 °C capazes de produzir hidrogênio a partir de CO estão incluídos entre os representantes pertencentes ao gênero *Carboxydotherrmus* (SLEPOVA et al., 2009), favorecidos em C8, provavelmente pela elevada temperatura de incubação (60 °C).

Endósporos são formados por espécies do gênero *Desulfotomaculum*, o qual é redutor de sulfato, com crescimento em condição, tanto mesofílica, quanto termofílica a partir de H₂, CO₂, lactato, piruvato, etanol propanol e butanol (NILSEN; TORSVIK; LIEN, 1996). Em C8, hidrogênio e ácidos orgânicos foram produzidos e possivelmente foram substratos para o crescimento destes microrganismos.

O gênero *Bacillus* inclui microrganismos aeróbios ou anaeróbios facultativos com crescimento ótimo, tanto em condição mesofílica (30°C), quanto em termofílica (40-55°C) e são formadores de endósporos (NISHIDA et al., 2015). No gênero *Symbiobacterium* encontra-se a espécie *S. thermophilum*, a qual foi isolada em associação com *Bacillus* em amostras de compostagem e é microaerófila com crescimento entre 45 e 65°C (OHNO et al., 2000). Microrganismos semelhantes a ambos os gêneros foram identificados no presente em estudo, provavelmente devido à temperatura de incubação dos reatores (60 °C) ser próxima a temperatura ótima de crescimento destes microrganismos.

Microrganismos degradadores de celulose e fermentadores com crescimento ótimo a 70 °C pertencentes ao gênero *Caldicellulosiruptor* (RAYNEY et al., 1994) foram identificados no presente estudo, bem como representantes de *Desulfotomaculum*, as quais são anaeróbias estritas, formadoras de endósporos, consumidoras de acetato e degradadoras de compostos aromáticos como *D. aromaticivorans* (KUNAPULI et al., 2010). Provavelmente, tais representantes estejam relacionados com a degradação da biomassa lignocelulósica (BCA).

O gênero *Alkaliphilus* é constituído por espécies capazes de reduzir metais em pH acima de 11 e em elevados níveis de sais. O crescimento ótimo desses microrganismos ocorre em pH acima de 9,0 e extrato de levedura atua como estimulante do crescimento (YE et al., 2004). Extrato de levedura estimula ainda, o crescimento de microrganismos do gênero *Thermosiphon*, no qual incluem espécies termofílicas com crescimento entre 44 e 75°C em uma ampla faixa de salinidade (PODOSOKORSKAYA et al., 2014). No presente estudo, elevada concentração de extrato de levedura (3,42 g/L) foi utilizada como suplemento do meio de cultura o que provavelmente favoreceu o crescimento destes microrganismos.

Assim, na condição C8 do planejamento fatorial 2, cuja temperatura de incubação foi de 60°C e 3,42 g/L de extrato de levedura foram identificados a partir do sequenciamento do RNAr 16 S gêneros de microrganismos relacionados à degradação de celulose, à fermentação e à metanogênese (Figura 5-33), o que reflete a elevada plasticidade metabólica dos microrganismos e a adaptação destes a diversos ambientes naturais e artificiais, bem como o

potencial destes microrganismos na degradação de compostos lignocelulósicos, produção de hidrogênio, metano, etano e ácidos orgânicos.

Figura 5-32: Abundância Relativa (%) dos principais gêneros identificados no reator em batelada C8 do planejamento fatorial 2. Os valores 1 a 37 correspondem aos gêneros *Methanothermobacter*; *Pyrococcus*; *Thermococcus*; *Methanosarcina*; *Methanocaldococcus*; *Methanococcus*; *Archaeoglobus*; *Methanosaeta*; *Methanobrevibacter*; *Coprothermobacter*; *Clostridium*; *Thermotoga*; *Caldanaerobacter*; *Fervidobacterium*; *Moorella*; *Thermoanaerobacter*; *Pelotomaculum*; *Carboxydotherrhus*; *Desulfotomaculum*; *Bacillus*; *Caldicellulosiruptor*; *Desulfitobacterium*; *Alkaliphilus*; *Symbiobacterium*; *Arabidopsis*; *Rattus*; *Homo*; *Schizosaccharomyces*; *Neurospora*; *Cyanidium*; *Cyanidioschyzon*; *Drosophila*; *Tetraodon*; *unclassified(derivedfromSiphoviridae)*; *Lambda-likeviruses*; *T7-likeviruses*; *T4-likeviruses*, respectivamente. Arc – Archaea; Bact – Bacteria, Euk – Eukarya e Vir – Vírus.

5.2.8.5. Distribuição das funções metabólicas nas comunidades microbianas do reator em batelada termofílico de maior produção de H_2

Para analisar o perfil funcional do reator biológico usado para o tratamento de bagaço de cana-de-açúcar, as sequencias totais foram anotadas de acordo com as categorias do banco de dados *Subsystems* (Figura 5-34). No nível 1 do subsystem as principais categorias foram: agrupamentos baseados no subsystem (13,7 %), metabolismo de proteínas (12,6 %), carboidratos (12,5 %), e aminoácidos e derivados (9,2 %).

Figura 5-33: Distribuição funcional dos genes observados no reator C8 de melhor rendimento de hidrogênio do planejamento fatorial termofílico (Nível 1)

Considerando o nível Carboidratos a principal sub-categoria (nível 2) foi metabolismo central de carboidratos (29,4 %) relacionado ao complexo desidrogenase, rota de conversão de carboidratos (Entner-Doudoroff), glicólise, glicogênese, metabolismo de pentoses. Outras importantes funções relacionadas a carboidratos foram metabolismo de monossacarídeos (15,4 %) e fermentação (10,3 %) (Figura 5-35). Foram ainda identificados genes relacionados à fixação de CO_2 , mono, poli e oligossacarídeos, ácidos orgânicos, açúcares e álcool.

Figura 5-34: Distribuição funcional dos genes relacionados ao metabolismo de carboidratos (nível 2) em C8.

Considerando a categoria Fermentação, seis subcategorias foram observadas, relacionadas ao metabolismo do butanodiol, síntese de acetona, butanol, etanol, butirato, lactato e outros ácidos (Figura 5-36).

Figura 5-35: Distribuição funcional dos genes relacionados à fermentação (nível 2) em C8.

O perfil funcional observado em C8 foi similar ao obtido por Delforno et al. (2016), quando analisaram funções globais de um reator UASB aplicado ao tratamento de águas residuais do matadouro de aves. Assim como no presente estudo, tais autores reportaram o potencial genético dos microrganismos na fermentação.

Na categoria monossacarídeos (nível 2) a abundância relativa atingiu 15,4 %. Nesta categoria, a rota metabólica mais abundante (13,29) foi relacionada ao uso de D-galacturonato e D-glucuronato. Todavia nesta categoria foram ainda encontrados metabolismos relacionados à utilização de frutose, hexose, arabinose, manose açúcares observados em C8 (seção 5.2.5.6.2).

Na categoria co-fatores, vitaminas e pigmentos, observou-se relação com Piridoxina, (7,32 %), ácido lipóico (0,41 %) e biotina (1,09) componentes do meio de cultura usado para o enriquecimento dos microrganismos em C8 (seção 4.5). Em C8, 1,86 % das funções foram relacionadas à resposta a estresse (figura 5-37). A presença de genes de resistência a diversos estresses corrobora o potencial genético da comunidade microbiana de C8 a sobreviver a diferentes flutuações ambientais e, portanto sua potencial aplicação em processos de biorremediação.

Figura 5-36: Distribuição funcional dos genes relacionados à resistência a diversos tipos de estresses em C8.

Na categoria metabolismo de compostos com 1 carbono (8,65 %) a principal função relacionou-se ao metabolismo da serina-glioxilato (77,2 %), metanogênese (15,3 %), metabolismo de compostos com 1 carbono por tetrahydropterinas (3,7 %), metanogênese a partir de compostos metilados (2,8 %) (Figura 5-38).

Figura 5-37: Distribuição funcional dos genes relacionados ao metabolismo de compostos de 1 carbono em C8.

Foram identificados em C8 0,19% de abundância relativa associada ao metabolismo de compostos aromáticos (Figura 5-39).

Figura 5-38: Distribuição funcional dos genes relacionados à resistência ao metabolismo de compostos aromáticos em C8.

Foram ainda observados genes relacionados ao metabolismo de fósforo (1,16 %), nitrogênio (0,45 %), ferro (0,40 %), enxofre (0,31%) e potássio (0,26). Foram identificados genes relacionados à degradação da celulose, hemicelulose e lignina, principais constituintes do bagaço de cana-de-açúcar, biomassa lignocelulósica usada como substrato da fermentação do reator C8. Genes envolvidos na resistência a compostos fenólicos, furfural, choque térmico e formação de células de resistência também foram identificados neste estudo (Tabela 5-29),

corroborando o potencial do consórcio microbiano termofílico na utilização de substratos complexo e participação em todos os ciclos biogeoquímicos.

Tabela 5-29: Principais genes codificantes de enzimas, identificados no reator de melhor desempenho na produção de hidrogênio do planejamento fatorial termofílico, relacionados à degradação da biomassa lignocelulósica e à resistência a estresses em C8.

Composto	Genes referentes às enzimas	EC
Celulose	6-fosfo-beta-glicosidase	3.2.1.86
	Alfa-glicosidase	3.2.1.20
	Oligo-1,6-glicosidase	3.2.1.10
	Beta-glicosidase	3.2.1.21
	Celulose exo-1,4-betacelobiosidase	3.2.1.91
Hemicelulose	Alfa-galactosidase	3.2.1.22
	Alfa-L-fucosidase	3.2.1.51
	Alfa-manosidase	3.2.1.24
	Alfa-N-arabinofuranosidase	3.2.1.55
	Beta - galactosidase	3.2.1.23
	Carboxilesterase	3.1.1.1
Lignina	(s)-2- hidroxí- ácido oxidase	1.1.3.15
Resistência a Furfural	Hidroxiacetilglutathione hydrolase	3.1.2.6
	Timidilato sintase	2.1.1.45
Resistência a compostos fenólicos	UDP- glucose- 4-epimerase	5.1.3.2
Estresse ácido	Arginina decarboxilase	4.1.1.19
Estresse osmótico	Beta-glicana-transporte ATPase	3.6.3.42
Estresse térmico	Nucleosídeo-trifosfato fosfatase	3.6.1.15
	Ribonuclease PH	2.7.7.56
	Ribosomal RNA pequena subunidade metiltransferase E	2.1.1.-

EC: Enzyme Commission

A degradação do BCA por microrganismos resultou na liberação de açúcares solúveis nas diferentes condições do planejamento fatorial termofílico. Em C8 observou-se acúmulo de galactose (293,95 mg/L) no final do período de operação do reator. Foram identificados nesta condição genes responsáveis pela produção de quatro enzimas participantes da rota da galactose. A enzima 6-fosfofrutoquinase (EC: 2.7.1.11) catalisa uma das etapas da glicólise, a conversão da frutose 6-fosfato em frutose 1,6 bi-fosfato. A enzima Tagatose-6-fosfato quinase (EC 2.7.1.144) é responsável pela conversão de tagatose 6-fosfato em tagatose 1,6 bi-fosfato. A enzima Tagatose bi-fosfato aldolase catalisa a reação de conversão de 1,6 bi-fosfato em fosfato de glicerona e 3-fosfato gliceraldeído. Por fim, a enzima galactosamina específica, componente IIB, C e D (EC 2.7.1.69) é responsável por catalisar a conversão de galactosamina em 6-fosfato galactosamina.

Foram identificados ainda, genes codificantes de enzimas relacionadas ao metabolismo de outros açúcares, tais como a pectinesterase (EC 3.1.1.11) envolvida na degradação da pectina, um heteropolissacarídeo altamente ramificado, cuja degradação requer ampla gama de enzimas (CAI et al., 2017); Beta-glucuronidase (EC3.2.1.31) envolvida na degradação da hemicelulose; Beta- fructofuranosidase (EC 3.2.1.26) envolvida na degradação de celo-oligossacarídeos; alfa-glicosidase (EC 3.2.1.20) envolvida na degradação da celulose trealose-6-phosphate hydrolase (EC 3.2.1.93) envolvida na degradação da celo-oligossacarídeo; oligo-1,6-glicosidase (EC 3.2.1.10) envolvida na degradação da celulose (YU et al., 2017). Enzimas celulasas (EC3.2.1.4); celulose 1,4-beta-celobiosidase (non-reducing end) (EC 3.2.1.91) envolvidas na degradação de celulose foram encontradas neste estudo, indicando o potencial da comunidade microbiana na degradação da biomassa lignocelulósica utilizada como substrato.

Foram identificados genes codificantes de enzimas relacionadas à metanogênese (15,3 %) (Figura 5-40) e a metanogênese a partir de compostos metilados (2,8 %). Valores de abundância relativa inferiores ao observado em C8, foram reportados por Delforno et al. (2016) (3,3 e 0,5 % para metanogênese e metanogênese a partir de compostos metilados, respectivamente), provavelmente devido a origem metanogênica do inóculo utilizado no presente estudo e o direcionamento das condições de cultivo aplicadas neste estudo para a geração de metabólitos intermediários da metanogênese, como hidrogênio e ácidos orgânicos.

Os principais genes observados em C8, relacionados à metanogênese codificam enzimas como 5,10-metilenotetrahidrometanopterin redutase (coenzima - F420 oxidoreductase) (EC: 1.5.98.2) que é responsável por catalisar uma etapa intermediária da

metanogênese hidrogenotrófica (KESEN; THAUER, 1990). No mesmo sentido, identificou-se a coenzima F-420 dependente Metilenotetrahidrometanopterin desidrogenase (EC 1.5.98.1) formalmente denominada metilenotetrahidrometanopterin desidrogenase, formadora de H_2 , a qual catalisa a redução reversível da Methylenetetrahydromethanopterin (HMD) com H_2 à Methylenetetrahydromethanopterin (MPT^+) e H^+ (MURRAY et al., 2014). Identificou-se ainda as enzimas formylmethanofurano dehydrogenase (EC 1.2.99.5), formylmethanofurano tetrahydromethanopterin N formyltransferase (EC 2.3.1.101), Methyl coenzyme reductase (EC 2.8.4.1).

Figura 5-39: Enzimas relacionadas ao metabolismo metanogênico codificadas pelos genes identificados em C8

A enzima formilmetanofurano desidrogenase é responsável pela catálise da reação de captura do CO_2 e sua redução a formilmetanofurano na metanogênese (RANA; DEY, 2016). No mesmo sentido, a enzima formilmetanofurano tetrahidrometanopterin N-formiltransferase desempenha importante papel na metanogênese hidrogenotrófica (GUO et al., 2015). Por fim, a coenzima metil-redutase é a chave da metanogênese, pois catalisa a redução da coenzima metil M (methyl-S-CoM) com a coenzima B (CoB-SH) na produção de metano e de heterodissulfeto (WAGNER et al., 2017).

Assim, os dados funcionais e taxonômicos obtidos a partir da análise de Metagenômica do reator de melhor desempenho na produção de hidrogênio do planejamento fatorial termofílico 2 revelou uma descrição robusta da estrutura do microbioma deste reator e forneceu informações fundamentais sobre as principais rotas da digestão anaeróbia desempenhadas pela comunidade microbiana as quais podem ser futuramente exploradas em processos biotecnológicos.

5.3. Ensaios em Condição Mesofílica

5.3.1. Caracterização Filogenética do Inóculo Mesofílico

As regiões V3 e V4 do gene RNAr 16S dos microrganismos da amostra do solo e compostagem foram sequenciados utilizando a plataforma Illumina-Miseq (2x250 ciclos).

Representantes do domínio Bacteria identificados no solo foram semelhantes aos filos Bacteroidetes (53,58%), Firmicutes (11,43 %), TM7 (8,61%), Synergistetes (8,02%), Proteobacteria (4,85%), OP8 (2,05%). Foram identificados 10,48% de microrganismos incluídos em filos não identificados. Outros microrganismos identificados foram semelhantes a representantes dos filos Chloroflex, Thermotogae, Armatimonadetes e Chlorobi, porém com abundância relativa inferior a 1%.

A maior parte das sequências pertencentes ao domínio Archaea (99,72%) identificados no solo não foram identificadas em nível de filo, enquanto que 0,28% das sequências deste domínio, foram semelhantes ao filo Euryarchaeota.

Os principais gêneros de bactéria identificados nas amostras do solo (Figura 5-8) foram semelhantes à *vadinCA02* (7,07%), *Anaerobaculum* (0,91%), *Tatlockia* (0,85%), *Caloramator* (0,71%), *Syntrophus* (0,70%), *Prevotella* (0,66%), *Geobacillus* (0,57%). 86,39% dos gêneros não foram identificados. Outros gêneros foram identificados em abundância relativa menor do que 0,5% e semelhantes à *Symbiobacterium*, *Clostridium*, *Thermoanaerobacter*, *Thermosinus*, *Geobacter*, *Kosmotoga*, *Kouleothrix*, *Phenylobacterium*, *Tepidimicrobium*, *Thermicanes*, *Coprothermobacter*, *Thermomonas*, *Ureibacillus*, *Moorella*, *Lactobacillus*, *Succinidasticum*, *Thermoanaerobacterium*, *Thermoacetogenium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Fervidobacterium*, *Ruminococcus*, *Sporomusa*, *Phaeospirillum*, *Pseudoxanthomonas* e *Fiimbrimonas*.

Os microrganismos do domínio Archaea identificados na amostra de solo foram semelhantes ao gênero *Methanobacterium* (0,23%) e *Methanothermobacter* (0,05%). Em relação às arqueias identificadas na amostra de compostagem verificou-se similaridade aos gêneros *Methanomassiliicoccus* (3,44%), *Methanobacterium* (2,25%), *Methanocella* (0,95%), *Methanobolus* (0,81%), *Methanosaeta* (0,27%) e *Methanoculleus* (0,24%), enquanto que 92,06% das sequências pertencentes ao domínio Archaea obtido em amostra de compostagem não foram identificadas em nível de gênero.

Os microrganismos do domínio Bactéria identificados na amostra de compostagem foram semelhantes aos filos Bacteroidetes (37,35%), Firmicutes (35,23%), Fibrobacteres (17,79%), Proteobacteria (4,30%), Synergistetes (1,57%), enquanto que 3,06 % das

sequências de Bactérias não foram identificadas em nível de filo na amostra de compostagem. Microrganismos foram ainda identificados como pertencentes aos filos Tenericutes, OD1, Actinobacteria, GN04, Chloroflex, OP8, Thermotogae, WWE1 e Elusimicrobia, porém com abundância relativa inferior a 1%.

Os principais gêneros de bactéria identificados nas amostras de compostagem (Figura 5-8) foram semelhantes à *Dysgonomonas* (34,64%), *Coprococcus* (7,11%), *Sporomusa* (4,06%), *Bacteroides* (1,53%), *Sedimentibacter* (1,37%), *Pseudomonas* (1,18%), *Ruminococcus* (1,04%) e *Clostridium* (1,00%), enquanto 40,549% das sequências não foram identificadas em nível de gêneros.

Outros gêneros foram identificados em abundância relativa menor do que 1,00% foram semelhantes à *Oxobacter*, *Desulfovibrio*, *Anaerovorax*, *Anaerobaculum*, *Thermosinus*, *Coprothermobacter*, *Lutispora*, *Thermoanaerobacterium*, *Thermicanus*, *Vadin CA02*, *Paenibacillus*, *Hymenobacter*, *Syntrophomonas*, *Ethanoligenes*, *Gracilibacter*, *Citrobacter*, *Geobacillus*, *Caloramato*, *Oscillospira*, *Thermacetogenium*, *Symbiobacterium*, *Lactobacillus*, *Ureibacillus*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Tepidimicrobium*, *Anoxybacillus*, *Ruminococcus*, *Desulfosporosinus*, *Syntrophus*, *Epulopiscum*, *Prevotella* e *Cohnella*.

Os microrganismos do domínio Archaea identificados na amostra de compostagem foram semelhantes a *Methanomassiliicoccus* (3,44%), *Methanobacterium* (2,55%), *Methanocella* (0,95%), *Methanlobus* (0,81%), *Methanosaeta* (0,27%) e *Methanoculleus* (0,24%), enquanto 92,06% das sequências não foram identificadas em nível de gêneros.

Anaerobaculum é membro do filo Synergistetes, o qual inclui as espécies *Anaerobaculum thermoterrenum* (REES et al., 1997) *Anaerobaculum mobile* (MENES; MUXÍ, 2002) e *Anaerobaculum hydrogeniformans* (MAUNE; TANNER, 2012b), sendo esta última capaz de fermentar d-frutose, d-glicose, maltose, d-manose, α -cetoglutarato, l-glutamato, malonato, piruvato, l-tartarato, l-asparagina, casaminoácidos, l-cisteína, l-histidina, Leucina, l-fenilalanina, l-serina, l-treonina, l-valina, inositol, inulina, triptona e extrato de levedura e produzir hidrogênio (MAUNE; TANNER, 2012b). Microrganismos semelhantes a *Anaerobaculum* foram identificados na amostra do solo (0,91%) e compostagem (0,62%).

Microrganismos semelhantes a *Caloramator* foram identificados em ambas às amostras (solo e compostagem) que compuseram o inóculo misto mesofílico. *Caloramator* inclui espécies termofílicas extremas e produtoras de hidrogênio (YOKOYAMA et al., 2007). CHU et al. (2010) reportaram a presença de microrganismos semelhantes à *Caloramator* em

reator anaeróbio contínuo operado à 55°C utilizando resíduo de alimentos como substrato e lodo de digestor anaeróbio com inóculo.

A identificação de microrganismos termofílicos em amostra de composteira deveu-se a elevadas temperaturas (aproximadamente 60 °C) atingidas nestes sistemas (FIORI; SCHOENHALS; FOLLADOR, 2008).

Os microrganismos do gênero *Clostridium* produzem hidrogênio durante a fase exponencial do crescimento e quando atinge a fase estacionária o metabolismo é alterado para a produção de solventes (KAPDAN; KARGI, 2006). Neste estudo microrganismos semelhantes à *Clostridium* foram identificados no solo (0,31%) e compostagem (1,00%).

Microrganismos semelhantes a *Geobacillus* foram identificados em reatores anaeróbios contínuos operados à 45 e 55°C e alimentados com água residuária sintética (glicose, extrato de levedura, cloreto de amônio di-hidrogenofosfato de potássio, hexahidrato de cloreto de magnésio e cloreto férrico). Esta bactéria apresenta rápido crescimento e pode solubilizar eficientemente diferentes resíduos orgânicos (KUNDU; SHARMA; SREEKRISHNAN, 2012). Neste trabalho, microrganismos semelhantes à *Geobacillus* foram identificados no solo (0,57%) e compostagem (0,07%).

Duan et al. (2016) isolaram de lodo de indústria de papel e celulose, representantes anaeróbios semelhantes a *Dysgonomonas*, capazes de degradar lignina e com potencial para geração de biocombustíveis a partir de efluentes lignocelulósicos. No presente estudo, 34,64 % das bactérias identificadas na amostra da compostagem foram semelhantes a *Dysgonomonas*, corroborando o potencial deste inóculo na conversão da biomassa lignocelulósica em bioprodutos, tais como hidrogênio, metano e ácidos orgânicos.

Microrganismos semelhantes a *Coprococcus* (7,11%) foram identificados na amostra de compostagem. *Coprococcus* inclui microrganismos fermentadores, os quais utilizam carboidratos como fonte de energia e peptonas como fontes de nitrogênio e são produtores de ácidos butírico, acético, fórmico, propiônico e láctico (HOLDEMAN; MOORE, 1974).

Balk et al. (2010) isolaram de reservatório de gás subterrâneo uma cepa de bactérias mesofílicas semelhante a *Sporomusa* capaz de converter vários álcoois, ácidos, frutose e H₂/CO₂ em ácido acético, além de utilizar succinato para produção de ácido propiônico. Neste estudo, 4,06% das bactérias identificadas na compostagem foram semelhantes à *Sporomusa*. Os gêneros com abundância acima de 1% observados neste estudo são fermentadores, degradadores de biomassa lignocelulósica e tolerantes a compostos fenólicos (Figura 5-41).

Figura 5-40: Abundância relativa dos grupos de bactérias identificadas no inóculo mesofílico em função da capacidade de degradação da biomassa lignocelulósica, fermentação, lignina e tolerância a aldeídos (Furfural e 5-HMF).

Os principais gêneros identificados, tanto em amostras de solo, quanto de compostagem são apresentados na Figura 5-42. A mistura desses dois inóculos foi usada como biomassa dos reatores mesofílicos.

Figura 5-41: Principais gêneros de Bactérias identificados em amostras de solo e compostagem (Comp) (Inóculo mesofílico) Os valores 1 a 16 correspondem aos gêneros *Dysgonomonas*; *Coprococcus*; *Sporomusa*; *Bacteroides*; *Sedimentibacter*; *Pseudomonas*; *Ruminococcus*; *Clostridium*; *vadinCA02*; *Anaerobaculum*; *Tatlockia*; *Caloramator*; *Syntrophus*; *Prevotella*; *Geobacillus* e *Symbiobacterium*, respectivamente.

5.3.2. Seleção de Meio de Cultura para a Condição Mesofílica

Três meios de cultura, Logan et al. (2002), Kawagoshi et al. (2005) e Lo et al. (2009) foram testados como fontes de micro e macronutrientes para o enriquecimento de microrganismos celulolíticos e fermentadores utilizando BCA *in natura* (0,5 g/L) como fonte de carbono. Não foi observada produção de hidrogênio nos ensaios nos quais foram usados os meios de cultura Logan et al. (2002) e Lo et al. (2009).

Produção máxima de hidrogênio de 0,1 mmol/L foi obtida utilizando-se o meio de cultura Kawagoshi et al. (2005) e, portanto, este meio foi utilizado nos ensaios subsequentes. A taxa de produção de hidrogênio obtida foi de 0,005 mmol/L.h e o período inicial de produção de H_2 foi de 4,6 horas (Figura 5-43). O meio de cultura Kawagoshi et al. (2005) foi suplementado com extrato de levedura (1 g/L) o que, provavelmente, contribuiu para o crescimento microbiano.

Figura 5-42: Produção de hidrogênio para as condições nutricionais do meio de cultura Kawagoshi et al., (2005).

Semelhante as condições termofílicas procedeu-se também a comparação da produção de H_2 utilizando-se o meio de cultura Del Nery, (1987) e Kawagoshi et al., (2005). Produção de hidrogênio semelhante foi obtida utilizando ambos os meios de cultura; ou seja, 5,91 e 4,88 mmol/L para as condições do meio Kawagoshi et al. (2005) e Del Nery (1987), respectivamente (Figura 5-44).

Taxa de produção de hidrogênio de 0,7 e 0,2 mmol/L.h e tempo de início de produção de H_2 de 0,09 e 3,49 horas foram obtidas para as condições dos meios Kawagoshi et al (2005) e Del Nery (1987), respectivamente. O meio Del Nery tem composição complexa em cuja constituição contém micro e macronutrientes essenciais para o crescimento microbiano, assim como o Kawagoshi et al (2005) suplementado com extrato de levedura.

Figura 5-43: Produção de hidrogênio para as condições nutricionais dos meios de cultura Del Nery (1987) e Kawagoshi et al. (2005), suplementados com extrato de levedura (1 g/L).

Destaca-se que foi observada máxima produção de hidrogênio utilizando-se o meio de cultura Kawagoshi, todavia, diferença significativa ($p > 0,05$) não foi obtida em relação à produção de hidrogênio em relação as condições nutricionais do meio Del Nery (1987).

Para os ensaios em condição mesofílica também se procedeu a comparação das condições nutricionais do meio de cultura Kawagoshi et al. (2005) e Atlas (2005) quanto à produção de hidrogênio. A máxima produção de hidrogênio (Figura 5-45) foi de 12,73 mmol/L e 2,92 mmol/L para as condições do meio de cultura Atlas (2005) e meio Kawagoshi et al. (2005), respectivamente.

Figura 5-44: Produção de hidrogênio para as condições nutricionais dos meios de cultura Atlas (2005) e Kawagoshi et al. (2005), suplementados com extrato de levedura (1 g/L).

5.3.3. Pré-tratamento do Substrato para condição mesofílica

5.3.3.1. Pré-tratamento por Explosão a vapor

O efeito do pré-tratamento explosão a vapor (200°C por 7 minutos) realizado no BCA foi avaliado quanto a produção de hidrogênio em condição mesofílica (37 °C). Para tanto, foram realizados ensaios em reator em batelada nas seguintes condições: (1) ensaio controle com 0,5 g/L de glicose; (2) 0,5 g/L de BCA submetido a explosão a vapor; (3) 0,5 g/L de BCA *in natura*. Todos os ensaios foram mantidos a 37 °C e inóculo foi proveniente de amostra de solo.

A maior produção de hidrogênio (0,69 mmol/L) foi obtida no ensaio controle, com glicose (0,5 g/L) como substrato, enquanto para as demais condições verificou-se produção de hidrogênio de 0,65 e 0,17 mmol/L a partir do BCA pré-tratado por explosão a vapor e *in natura*, respectivamente (Tabela 5-30).

Tabela 5-30: Parâmetros ajustados via Gompertz de produção de hidrogênio nos reatores em batelada mesofílicos

Reatores	P (mmol/L)	Rm (mmol/h)	λ (horas)	Y mmol/L.gSCB	R^2
Controle (Glicose)	0,69	0,05	7,59	1.38	0,97
BCA (explosão a vapor)	0,65	0,04	19,82	1.30	0,97
BCA (in natura)	0,17	0,01	20,53	0.34	0,98

P - Produção potencial máxima de hidrogênio; Rm – Taxa máxima de produção de hidrogênio; λ – Tempo para iniciar a produção de hidrogênio.

A maior produção de hidrogênio na condição controle (0,69 mmol/L) deveu-se a menor complexidade do substrato (glicose) em relação à biomassa lignocelulósica (BCA). No mesmo sentido, a maior produção de hidrogênio no ensaio com BCA pré-tratado (0,65 mmol/L) em relação ao BCA *in natura* (0,17 mmol/L) deveu-se a liberação de açúcares facilmente fermentáveis durante o pré-tratamento. Em contraste, no ensaio com BCA *in natura*, a rigidez e cristalinidade da biomassa lignocelulósica, sem tratamento prévio, dificultou a degradação da celulose e consequentemente a conversão deste substrato em hidrogênio.

Datar et al. (2007) realizaram pré-tratamento por explosão a vapor (200°C por 3 minutos) em palha de milho e utilizaram ambas as frações, sólida e líquida, como substrato em reatores em batelada com lodo de digestor anaeróbico de estação de tratamento de água residuária, como inóculo à 35°C. Nos reatores alimentados com a fração líquida, a produção de hidrogênio iniciou-se após 28 horas de incubação e atingiu valor máximo de 74,26 mmol/L. Em contrapartida, utilizando a fração sólida, os autores não obtiveram produção de hidrogênio, mesmo após três semanas de incubação dos reatores e, portanto, adicionaram celulase comercial (106,6 mg/mL) e, após 20 horas, obtiveram produção de hidrogênio a qual atingiu 128 mmol/L. No caso específico desse trabalho com BCA *in natura* ou pré-tratado, sem adição de enzima verificou-se valores de produção de H₂ extremamente reduzidos e período de 20,53 e 19,22 horas para início de produção desse gás, respectivamente.

Assim como o hidrogênio, a maior produção de metano (17,52 mmol/L) foi observada no ensaio controle, com glicose como substrato (0,5 g/L). Nos ensaios com BCA pré-tratado

por explosão a vapor e *in natura* a máxima produção de metano foi de 16,42 e 16,98 mmol/L, respectivamente (Tabela 5-31). Vale ressaltar que a produção de metano, foi maior do que a produção de hidrogênio, provavelmente devido ao uso do inóculo (solo) sem pré-tratamento. No entanto, foi requerido maior tempo para início da produção de metano, possivelmente devido as taxas de crescimento menores das arqueias metanogênicas em relação às de bactérias fermentativas.

Tabela 5-31: Parâmetros ajustados via Gompertz para a produção de metano nos reatores em batelada mesofílicos

	P (mmol/L)	R_m (mmol/h)	λ (horas)	R^2
Controle (Glicose)	17,52	0,02	779,36	0,99
BCA (explosão a vapor)	16,42	0,01	700,89	0,94
BCA (<i>in natura</i>)	16,98	0,02	683,52	0,99

P - Produção potencial máxima de metano; R_m – Taxa máxima de produção de metano; λ – Tempo para iniciar a produção de metano.

Assim como no presente estudo, baixa produção de metano (7,83 mmol/L) foi reportada por Kumar and Lin (2013) a partir de resíduo celulósico de mamona (*Jatropha* sp.) proveniente da indústria de biodiesel (200 g/L) usando lodo de estação de tratamento de água residuária à 35°C e pH 7,0. Tais autores reportaram aumento na produção de metano (11,65 mmol/L) a partir da biomassa lignocelulósica com o aumento da temperatura de incubação (55°C), indicando que além do pré-tratamento do substrato outros fatores como a temperatura e pH afetam a produção de biocombustíveis a partir de resíduos lignocelulósicos.

5.3.3.2. Pré-tratamento biológico (*Aspergillus niger*)

BCA (0,5 g/L) *in natura* e autoclavado (121°C por 15 minutos) foram pré-tratados utilizando-se o fungo *Aspergillus niger* - Cepa (ATCC 10577). Após o pré-tratamento biológico, com o fungo, e/ou térmico, autoclave, o BCA (0,5 g/L) foi usado como substrato para a produção de H₂ em condição mesofílica (37°C) e pH inicial de 6,0. CMC (Carboxymetilcellulose) e glicose (0,5 g/L) foram usados como substratos nos ensaios controle.

No final do período de operação dos reatores, o pH foi de 6,45, 6,75, 7,25, 7,01, 4,30 e 5,80 nos ensaios com BCA *in natura*, BCA autoclavado, BCA pré-tratado com o fungo, BCA autoclavado e pré-tratado com o fungo, glicose e CMC, respectivamente. A maior produção de hidrogênio foi observada no ensaio controle com glicose (86,20 mmol/L). Em relação ao ensaio controle com CMC, a produção de hidrogênio foi de 0,72 mmol/L.

Para os ensaios com BCA como substrato verificou-se maior produção de hidrogênio (0,66 mmol/L) na condição B2 (BCA autoclavado), enquanto, a menor produção (0,17 mmol/L) ocorreu para a condição B3 (BCA tratado com *A. niger*) (Tabela 5-32).

Tabela 5-32: Parâmetros de produção de hidrogênio ajustados via Gompertz em diferentes condições dos reatores em batelada mesofílicos

Reator em Batelada	P (mmol/L)	Rm (mmol/h)	λ (horas)	R^2
B1 (BCA pré-tratado em autoclave + <i>A. niger</i>)	0,34	0,08	4,47	0,97
B2 (BCA pré-tratado em autoclave)	0,66	0,15	3,37	0,94
B3 (BCA pré-tratado com <i>A. niger</i>)	0,17	0,02	3,65	0,95
B4 (BCA <i>in natura</i>)	0,50	0,13	2,29	0,99
B5 (Glicose)	86,20	3,65	0,75	0,87
B6 (CMC)	0,72	0,04	0,57	0,96

P - Produção potencial máxima de hidrogênio; Rm – Taxa máxima de produção de hidrogênio; λ – Tempo para iniciar a produção de hidrogênio.

Diversos fungos são capazes de degradar compostos lignocelulósicos pela ação de enzimas hidrolíticas e oxidativas (CAMASSOLA; DILLON, 2009). ZHAO et al., (2012) realizaram pré-tratamento de talo de milho com o fungo *Phanerochaete crysisporium* durante 15 dias. Após o tratamento, o substrato foi usado em reatores em batelada inoculado com *T. hermosaccharolyticum* em condição termofílica (60°C). Em tais condições o rendimento de hidrogênio foi de 3,58 mmol H₂/g glicose (80,3 mL/g glicose).

O fungo *A. niger* produz celulasas que degradam materiais lignocelulósicos, disponibilizando açúcares mais facilmente assimiláveis por bactérias fermentativas. No entanto, em seu metabolismo, este organismo pode consumir carboidratos reduzindo a disponibilidade de substrato para bactérias fermentativas e, conseqüentemente, diminuindo a produção de hidrogênio (CAMASSOLA; DILLON, 2009).

A maior produção de hidrogênio (0,66 mmol/L) a partir de BCA foi obtida em B2 (BCA pré-tratado em autoclave) provavelmente o pré-tratamento ocasionou a liberação de açúcares mais facilmente fermentáveis e favoreceu a produção de hidrogênio nesta condição. No entanto maior produção de hidrogênio foi observada a partir de outros pré-tratamento desta biomassa, como o pré-tratamento hidrotérmico, assim nas etapas seguintes deste estudo os pré-tratamentos em autoclave e com o fungo *A. niger* não foram mais utilizados. A rota metabólica favorecida em todos os ensaios foi a do ácido butírico, com máxima produção de 1.206,17 e 265,08 mg/L nos ensaios controle com glicose e CMC respectivamente e de 2,10, 2,35, 4,35 e 1,23 mg/L em B1, B2, B3 e B4 (Tabela 5-33). Nos ensaios utilizando BCA, foi observada elevada produção de ácido propiônico (589, 253, 214 e 760 mg/L em B1, B2, B3 e B4, respectivamente).

Tabela 5-33: Principais ácidos orgânicos produzidos nas diferentes condições dos reatores em batelada mesofílica

Reator	Acido Butírico (mg/L)	Acido Isobutírico (mg/L)	Ácido Propiônico (mg/L)	Etanol (mg/L)
B1	2,10	49,93	589,12	12,52
B2	2,35	13,44	253,86	11,39
B3	4,35	13,93	214,11	11,49
B4	1,23	107,65	760,07	-
B5	1.206,17	369,69	15,87	78,80
B6	265,08	57,58	47,68	64,45

B1 (BCA pré-tratado em autoclave + *A niger*), B2 (BCA pré-tratado em autoclave), B3 (BCA pré-tratado com *A niger*), B4 (BCA in natura) B5 (Glicose) B6 (CMC).

Produção de etanol de 12,52; 11,39; 11,49; 78,80 e 64,45 mg/L foi observada em B1, B2, B3 B5 e B6, respectivamente. De acordo com Ratti et al., (2014) para a produção de álcoois não ocorre consumo de hidrogênio, todavia, consome-se o substrato orgânico usado na fermentação, influenciando negativamente a produção de hidrogênio. Produção de metano de 2,35, 1,08, 4,56 e 3,13 mmol/L foram observadas nos ensaios B1, B2, B3 e B4, respectivamente. Desse modo, a produção de ácido propiônico e metano, justificam a baixa produção de hidrogênio, em todos os ensaios com BCA como substrato, já que hidrogênio é

utilizado como substrato para a produção de ambos, ácido propiônico e metano (Ratti et al., 2014).

5.3.4. Planejamento Fatorial Mesofílico 1

O efeito de duas variáveis independentes (concentração de extrato de levedura e substrato) foi avaliado em relação à produção de ácidos orgânicos, etanol, hidrogênio e metano por metodologia de superfície de resposta (RSM) e composto central (CCD) para a condição mesofílica (37°C). Nesses ensaios foi usado inóculo consorcio mesofílico proveniente de amostras enriquecidas de solo e compostagem. Cada variável independente foi estudada em cinco níveis codificados (-1,42; -1; 0; 1; 1,42). Os fatores com nível de confiança acima de 95% foram considerados significativos. Efeito significativo foi observado em relação à produção de etanol e hidrogênio. A matriz com as condições do CCD, valor experimental e predito da produção de hidrogênio e de etanol dos reatores mesofílicos está apresentada na Tabela 5-34.

Tabela 5-34: Composto Central dos fatores (decodificados) para a produção de etanol e hidrogênio dos reatores mesofílicos

	X ₁	X ₂	Etanol (mg/L)		Hidrogênio (mmol/L)	
			Valores experimentais	Valores preditos	Valores experimentais	Valores preditos
C1	3,00	4,00	12,25	14,21	0,60	0,59
C2	1,00	4,00	8,32	9,14	0,31	0,29
C3	3,00	2,00	11,32	11,23	0,38	0,40
C4	1,00	2,00	17,01	15,79	0,31	0,32
C5	2,00	3,00	17,37	18,49	0,46	0,47
C6	2,00	3,00	20,11	18,49	0,50	0,47
C7	2,00	3,00	18,00	18,49	0,45	0,47
C8	3,42	3,00	13,07	11,91	0,58	0,57
C9	0,58	3,00	11,11	11,52	0,28	0,29
C10	2,00	4,42	13,87	12,06	0,41	0,43
C11	2,00	1,58	13,57	14,66	0,34	0,31

X₁ – Concentração de extrato de levedura (g/L); X₂ – Concentração de BCA (g/L)

Efeito quadrático da concentração de extrato de levedura e substrato foi observado em relação à produção de etanol, que também foi afetada pela interação entre ambas as variáveis independentes (Figura 5-46). O modelo matemático que define a variação da resposta em função das variáveis independentes codificadas é descrito na equação 17.

$$Y = 18,49 - 0,91 * X_1 - 2,54 * X_1^2 + 0,12 * X_2 - 3,35 * X_2^2 + 2,41 X_1 X_2 \quad (17)$$

Sendo:

Y = produção predita de etanol (mg/L);

X₁ = concentração de extrato de levedura (g/L) e

X₂ é a concentração de substrato (g/L).

Figura 5-45: Teste de Pareto do efeito das variáveis independentes, concentração de extrato de levedura (EL) e concentração de bagaço de cana-de-açúcar (BCA) na produção de etanol em reatores em batelada mesofílicos.

O nível ótimo das variáveis independentes e suas interações na variável resposta, produção de etanol foram avaliados em gráfico de superfície de resposta (Figura 5-47).

Figura 5-46: Superfície de resposta da interação entre as variáveis independentes, concentração de extrato de levedura e bagaço de cana-de-açúcar na produção de etanol em reatores em batelada mesofílicos

A adequação do modelo foi determinada por análise de variância (ANOVA) conforme apresentado na Tabela 5-35.

Tabela 5-35: ANOVA para as variáveis independentes com efeito significativos na produção de etanol

Variáveis	SS	DF	MS	F-valor	P-valor
Extrato de Levedura (Q)	64,24	1	64,24	19,89	0,006
BCA (Q)	37,02	1	37,02	11,46	0,019
EL x BCA	23,17	1	23,17	7,17	0,044
Erro	16,15	5	3,23		
Total	125,41	10			

SS- Soma dos Quadrados; DF – Graus de liberdade; MS – Média dos quadrados; L – Linear; Q- Quadrático. Nível de significância de 95%.

A maior produção de etanol (20,11 mg/L) foi obtida no ponto central (2,0 e 3,0 g/L de extrato de levedura e BCA, respectivamente), enquanto a menor produção de etanol (8,32

mg/L) foi obtida na condição C2 (1,0 e 4,0 g/L de extrato de levedura e BCA, respectivamente). Portanto, pode-se inferir efeito negativo de ambas as variáveis independentes na produção de etanol, para menor e maior concentração, respectivamente.

Efeito quadrático na produção de hidrogênio foi observado para a concentração de extrato de levedura. Todavia, foram observados efeitos linear e quadrático para a concentração de BCA na produção de hidrogênio. Foi observado ainda, efeito da interação de ambas as variáveis independentes na produção de hidrogênio (Figura 5-48).

Figura 5-47: Teste de Pareto do efeito da concentração de extrato de levedura (EL) e concentração de BCA na produção de hidrogênio em reatores em batelada mesofílicos.

O modelo matemático que define a variação da resposta em função das variáveis independentes é descrito na equação 18.

$$Y = 0,47 + 0,04 * X_1 - 0,05 * X_1^2 + 0,09 * X_2 - 0,02 * X_2^2 + 0,05 X_1 X_2 \quad (18)$$

Sendo:

Y = produção predita de hidrogênio (mmol/L);

X₁ = concentração de extrato de levedura (g/L) e

X₂ é a concentração de substrato (g/L).

A adequação dos modelos foi determinada por análise de variância (ANOVA) conforme apresentado na Tabela 5-36.

Tabela 5-36: ANOVA para as variáveis independentes com efeito significativos na produção de hidrogênio nos reatores em batelada mesofílicos

Variáveis	SS	DF	MS	F-valor	P-valor
Extrato de Levedura (L)	0,077	1	0,077	109,82	0,0001
BCA (L)	0,03	1	0,026	37,84	0,001
BCA (Q)	0,005	1	0,005	6,93	0,046
EL x BCA	0,012	1	0,012	17,28	0,008
Erro	0,003	5	0,001		
Total	0,126	10			

SS- Soma dos Quadrados; DF – Graus de liberdade; MS – Média dos quadrados; L – Linear; Q- Quadrático. Nível de significância de 95%.

O nível ótimo das variáveis independentes e suas interações na variável resposta produção de hidrogênio foram avaliados em gráfico de superfície de resposta (Figura 5-49).

Os valores de produção acumulada de hidrogênio (P), máxima taxa de produção de hidrogênio (Rm) e tempo de início de produção de hidrogênio (λ) estão apresentados na Tabela 5-37. Em todos os testes, o R^2 foi maior do que 0,95, indicando que o modelo pode ajustar mais de 95% dos resultados observados.

Figura 5-48: Superfície de resposta da interação entre a concentração de extrato de levedura e BCA na produção de hidrogênio nos reatores em batelada mesofílicos.

Tabela 5-37: Parâmetros ajustados (Gompertz-modificado) e rendimento de hidrogênio nos reatores em batelada mesofílicos.

Reator em Batelada	P	X_c	λ	R^2	Produtividade H_2
	mmolH ₂ /L	mmol/h	h		Mmol H ₂ /g BCA
C1	0,60	0,05	2,68	0,99	0,15
C2	0,31	0,08	3,35	0,95	0,07
C3	0,38	0,04	3,41	0,96	0,19
C4	0,31	0,02	2,18	0,98	0,15
C5	0,46	0,03	0,38	0,98	0,15
C6	0,50	0,02	0,46	0,97	0,16
C7	0,45	0,02	0,92	0,95	0,15
C8	0,58	0,09	1,14	0,99	0,18
C9	0,28	0,02	0,02	0,92	0,09
C10	0,41	0,02	1,16	0,97	0,09
C11	0,34	0,04	0,33	0,95	0,21

P - Produção potencial máxima de hidrogênio; R_m – Taxa máxima de produção de hidrogênio; λ – Tempo para iniciar a produção de hidrogênio. C1 (3,0 g/L de extrato de levedura e 4,0 g/L de BCA), C2 (1,0 g/L de extrato de levedura e 4,0 g/L de BCA), C3 (3,0 g/L de extrato de levedura e 2,0 g/L de BCA), C4 (1,0 g/L de extrato de levedura e 2,0 g/L de BCA), C5, C6 e C7 (2,0 g/L de extrato de levedura e 3,0 g/L de BCA, respectivamente), C8 (3,42 g/L de extrato de levedura e 3,0 g/L de BCA), C9 (0,58 g/L de extrato de levedura e 3,00 g/L de BCA), C10 (2,0 g/L de extrato de levedura e 4,42 g/L de BCA), C11 (2,0 g/L de extrato de levedura e 1,58 g/L de BCA).

A maior produção de hidrogênio (0,6 mmol/L) foi observada na condição C1 (3 g/L de extrato de levedura e 4 g/L de BCA). A menor produção de hidrogênio (0,28 mmol/L) foi observada no ensaio C9, (0,58 g/L de extrato de levedura e 3,00 g/L de BCA). Portanto, para maior concentração de BCA e suplemento nutricional observou-se aumento na produção de hidrogênio nos reatores em batelada mesofílicos. A adição de extrato de levedura é uma forma de suplementação de nitrogênio nos meios de cultura, uma vez que este composto é obtido a partir da hidrólise de leveduras e é rico em nitrogênio, aminoácidos, peptídeos, e vitaminas (Kalil et al., 2008) que favorecem o crescimento microbiano (DASGUPTA et al., 2013).

A suplementação de meios de cultura com extrato de levedura em relação a outras fontes orgânicas (peptona, triptona) e inorgânica (sulfato de amônio, cloreto de amônio, nitrato de amônio) resulta em melhor crescimento celular e maior produção de hidrogênio (HAKOBYAN; GABRIELIAN; TRCHOUNIAN, 2012; KALIL; ALSHIYAB; YUSOFF, 2008). Por isso, nessa pesquisa optou-se pela adição de extrato de levedura.

Segundo Fangkum; Reungsang, 2011, a concentração inicial de substrato afeta produção acumulada, a taxa de produção e o rendimento de hidrogênio. No mesmo sentido, o aumento da concentração de substrato, ocorre elevada produção de ácidos orgânicos e a inibição da produção de hidrogênio (FAN et al., 2004). Aparentemente isso foi observado no presente estudo, uma vez que a produção de hidrogênio aumentou de 0,34 mmol/L em C11, cuja menor concentração de substrato (1,58 g/L) foi utilizada para 0,60 mmol/L em C1 (com 4,00 g/L de BCA) e diminuiu para 0,41 mmol/L em C10 (com 4,42 g/L de BCA). Em C1, condição com maior produção de hidrogênio observou-se menor concentração de ácido acético (231 mg/L), enquanto que C10 e C11 as concentrações deste ácido foram de 488 e 457 mg/L, respectivamente (sessão 5.3.3.3.1).

Assim como no presente estudo, Pattra et al. (2008) observaram produção crescente de hidrogênio de 0,9 mmol/L para 8,03 mmol/L com o aumento da concentração de substrato 1,5 para 20,0 gDQO/L de hidrolisado de BCA (0,5% H₂SO₄) e posterior declínio da produção de hidrogênio para 6,7 mmol/L quando aumentou-se a concentração de substrato para 40 g DQO/L como substrato em reatores em batelada inoculados com *Clostridium butyricum* TISTR 1032 em condição mesofílica (37°C), corroborando o fato de que o aumento na concentração de substrato leva ao aumento na produção de hidrogênio até certo nível e posteriormente pode exercer efeito negativo, levando à redução da produção de hidrogênio.

Assim como no presente estudo, o efeto da concentração de substrato foi avaliado por Maintinguer et al. (2011) na produção de etanol. Tais autores reportaram produção de etanol de 41,5 mg/L usando 1848,0 mg xilose/L. No presente estudo, a máxima produção de etanol obtida foi de 20,11 mg/L usando 5000,0 mg BCA/L. Menor produção de etanol nesta pesquisa em relação aos resultados apresentados por Maintinguer et al. (2011) provavelmente deveu-se a maior complexidade do BCA em relação à xilose utilizada como substrato por estes autores.

5.3.4.1. Ácidos Orgânicos Voláteis e Metano

Em todas as condições nutricionais dos reatores em batelada mesofílicos foi observado ácido acético, sendo a principal via de produção de hidrogênio nas condições experimentais de C1, C5, C6, C7, C8, C10 e C11. Em contrapartida, nas condições C2, C3, C4 e C9 a rota do ácido butírico foi favorecida (Tabela 5-38). Nessas últimas condições observou-se baixa produção de hidrogênio, respectivamente de 0,31; 0,38; 0,31 e 0,28 mmol/L. Na condição C1 (4 g/L BCA e 3 g/L de extrato de levedura) observou-se a maior produção de hidrogênio (0,6 mmol/L) e rota metabólica do ácido acético (231,95 mg/L). Nesta condição observou-se baixa

produção de ácido butírico (4,40 mg/L), ácido propiônico (37,13 mg/L) e etanol (12,25 mg/L).

Produção de ácido propiônico foi observada em todas as condições, sendo observada a maior concentração deste metabólito (433,76 mg/L) na condição C9 (3 g/L de BCA e 0,58 g/L de extrato de levedura). Sob tais condições, observou-se baixa produção de hidrogênio (0,28 mmol/L). Em alta concentração de ácidos orgânicos no meio a força iônica da solução aumenta resultando na mudança da rota microbiana de produção de hidrogênio para outras rotas metabólicas (CHONG et al., 2009), o que possivelmente aconteceu em C9. Não foi observado efeito das variáveis independentes (concentração de BCA e extrato de levedura) na produção de ácidos orgânicos. Ratti et al., (2013), assim como no presente estudo não observaram efeito do aumento da concentração de substrato (celulose) na produção de ácidos orgânicos. Todavia, tais autores reportaram menor produção de ácido acético, butírico e propiônico (33,9, 23,4 e 98,6 mg/L, respectivamente) utilizando 5,0 g/L de substrato e 1,0 g/L de extrato de levedura em relação a este estudo (352,49, 45,8, 328,28 mg/L de ácido acético, butírico e propiônico, respectivamente com 5,0 g/L de extrato de levedura e 3,42 g/L de extrato de levedura e 401,57, 94,71 e 433,76 mg/L ácido acético, butírico e propiônico, respectivamente com 5,0 g/L de extrato de levedura e 0,58 g/L de extrato de levedura).

Tabela 5-38: Máxima produção de ácidos orgânicos e etanol nas diferentes condições experimentais

Reator	Ácido Acético (mg/L)	Acido Butírico (mg/L)	Ácido Propiônico (mg/L)
C1	231,95	4,404	37,138
C2	138,584	6,082	275,404
C3	235,778	27,276	372,852
C4	109,378	23,038	244,7
C5	113,14	117,78	9,58
C6	329,816	15,6	27,648
C7	349,58	26,49	128,506
C8	352,49	45,810	328,284
C9	401,57	94,71	433,76
C10	488,852	60,7	105,694
C11	457,604	61,80	300,29

C1 (3,0 g/L de extrato de levedura e 4,0 g/L de BCA), C2 (1,0 g/L de extrato de levedura e 4,0 g/L de BCA), C3 (3,0 g/L de extrato de levedura e 2,0 g/L de BCA), C4 (1,0 g/L de extrato de levedura e 2,0 g/L de BCA), C5, C6 e C7 (2,0 g/L de extrato de levedura e 3,0 g/L de BCA, respectivamente), C8 (3,42 g/L de extrato de levedura e 3,0 g/L de BCA), C9 (0,58 g/L de extrato de levedura e 3,00 g/L de BCA), C10 (2,0 g/L de extrato de levedura e 4,42 g/L de BCA), C11 (2,0 g/L de extrato de levedura e 1,58 g/L de BCA).

Produção de metano foi observada em todas as condições experimentais dos reatores em batelada mesofílicos. A máxima produção de metano foi de 1,4 mmol/L na condição C2 (4 g/L BCA e 1 g/L extrato de levedura), enquanto a menor produção de metano foi observada na condição C4 (2 g/L BCA e 1 g/L de extrato de levedura) (Tabela 5-39). As variáveis independentes não exerceram efeito na produção de metano.

Tabela 5-39: Parâmetros de produção de metano ajustados via Gompertz-modificado dos reatores em batelada mesofílicos

Reator	P (mmol/L)	λ (h)	R^2
C1	0,98	105,49	0,99
C2	1,44	139,54	0,99
C3	0,63	177,58	0,99
C4	0,24	221,01	0,99
C5	0,91	80,33	0,92
C6	0,75	145,68	0,98
C7	1,40	124,11	0,93
C8	0,38	207,56	0,99
C9	0,93	182,15	0,99
C10	1,24	109,01	0,96
C11	1,13	113,79	0,97

P - Máxima produção de metano; λ – Tempo para iniciar a produção de metano. C1 (3,0 g/L de extrato de levedura e 4,0 g/L de BCA), C2 (1,0 g/L de extrato de levedura e 4,0 g/L de BCA), C3 (3,0 g/L de extrato de levedura e 2,0 g/L de BCA), C4 (1,0 g/L de extrato de levedura e 2,0 g/L de BCA), C5, C6 e C7 (2,0 g/L de extrato de levedura e 3,0 g/L de BCA, respectivamente), C8 (3,42 g/L de extrato de levedura e 3,0 g/L de BCA), C9 (0,58 g/L de extrato de levedura e 3,00 g/L de BCA), C10 (2,0 g/L de extrato de levedura e 4,42 g/L de BCA), C11 (2,0 g/L de extrato de levedura e 1,58 g/L de BCA).

5.3.4.2. Caracterização Microbiana

As populações de arqueias metanogênicas foram pouco afetadas pelas condições aplicadas no presente estudo (Figura 5-50). A menor similaridade entre as populações de arqueias (87%) foi obtida entre C8 e C9, condições com a mesma concentração de substrato (3,0 g/L de SCB), mas com a menor (0,58 g/L) e maior (3,42 g/L) concentração de extrato de levedura. A partir desses resultados pode-se inferir que as populações de arqueias metanogênicas foram mais afetadas pela disponibilidade de nitrogênio do que pelo substrato, uma vez que similaridade de 90% foi observada entre C10 e C11, condições com a menor e

maior concentrações de substrato (1,52 e 4,48 g/L, respectivamente) e a mesma quantidade de extrato de levedura (2,0 g/L).

A similaridade entre as populações de arqueias metanogênicas de C2 e C8, condições com a maior e menor produção de metano (1,44 mmol/L e 0,38 mmol/L) foi de 88%. A maior produção de metano em C2 resultou em baixa produção de hidrogênio e ácidos orgânicos (0,31 mmol/L e 420 mg/L, respectivamente) nesta condição.

Arquéias metanogênicas hidrogenotróficas são responsáveis por manter baixa a pressão parcial do hidrogênio (a níveis menores do que 10 Pa) favorecendo a conversão de ácidos orgânicos e álcool à metano (MONTAÑÉS; SOLERA; PÉREZ, 2015). No mesmo sentido, o metabolismo metanogênico é favorecido em pH neutro (TACONI et al., 2007) mantido nesta condição devido à baixa produção de ácidos orgânicos (420 mg/L).

Em contrapartida, em C8, condição com a menor produção de metano (0,38 mmol/L) foi obtida alta produção de hidrogênio e ácidos orgânicos (0,58 mmol/L e 726,58 mg/L, respectivamente). Além dos metabolismos apresentados anteriormente, em C8 foi observado ácido propiônico e etanol (328,28 e 13,07 mg/L, respectivamente) demonstrando a atividade de diversos grupos metabólicos nesta condição.

A

B

Figura 5-49: Padrão de banda do DGGE das populações de *Archaea* (A) e *Bacteria* (B) para as condições C1 (3,0 g/L de extrato de levedura e 4,0 g/L de BCA), C2 (1,0 g/L de extrato de

levedura e 4,0 g/L de BCA), C3 (3,0 g/L de extrato de levedura e 2,0 g/L de BCA), C4 (1,0 g/L de extrato de levedura e 2,0 g/L de BCA), C5, C6 e C7 (2,0 g/L de extrato de levedura e 3,0 g/L de BCA, respectivamente), C8 (3,42 g/L de extrato de levedura e 3,0 g/L de BCA), C9 (0,58 g/L de extrato de levedura e 3,00 g/L de BCA), C10 (2,0 g/L de extrato de levedura e 4,42 g/L de BCA), C11 (2,0 g/L de extrato de levedura e 1,58 g/L de BCA).

A maior similaridade entre as populações de bactérias foi de 92% entre C3 e C4, condições com a mesma concentração de BCA (2,0 g/L), porém, com a concentração de extrato de levedura de 1,0 e 4,0 g/L, respectivamente. Em contraste, similaridade de 50% foi observada entre C10 e C11, condições nas quais 2,0 g/L de extrato de levedura foi adicionado, com a maior (4,42 g/L) e menor (1,58 g/L) concentração de BCA aplicada e, portanto, pode-se inferir que as populações de bactérias foram afetadas pela concentração de BCA.

A similaridade observada entre as populações de bactérias de C6 e C2, condições com a maior e menor produção de etanol (20,11 e 8,32 mg/L, respectivamente) foi de 70%. Em C2 (1,0 e 4,0 g/L de extrato de levedura e BCA, respectivamente) foi também observada baixa concentração de ácido acético e hidrogênio (138,58 mg/L e 0,31 mmol/L, respectivamente), porém, elevada concentração de ácido propiônico e metano (275,4 mg/L e 1,44 mmol/L, respectivamente). Sob tais condições, pode-se destacar o favorecimento de bactérias fermentativas produtoras de ácido propiônico e de arqueias metanogênicas hidrogênotróficas.

Antes de serem convertidos a metano, os produtos da fermentação são convertidos a ácido acético sendo a taxa de conversão do etanol > ácido butírico > ácido propiônico (Wang et al., 2009). No mesmo sentido, o aumento da concentração de ácido propiônico reduz a sua degradação em ácido acético e, conseqüentemente diminui a metanogênese acetoclástica (Mawson et al., 1991). Em C2 observou-se aumento da concentração de ácido propiônico e baixa concentração de ácido acético, e possivelmente, a produção de metano ocorreu via metanogênese hidrogenotrófica, o que foi corroborado pela baixa concentração de hidrogênio nesta condição.

Em contraste, em C6 (2,0 e 3,0 g/L de extrato de levedura e BCA, respectivamente) bactérias acidogênicas e acetogênicas foram favorecidas já que além de elevada produção de etanol foi também observada alta produção de hidrogênio e ácido acético (0,50 mmol/L e 329,82 mg/L, respectivamente).

No mesmo sentido, a similaridade das populações de bactérias em C1 e C9, condições com a maior e menor produção de hidrogênio (0,60 e 0,28 mmol/L) foi de 50% (Figura 5-50). Em ambas as condições, a produção de etanol foi similar (12,25 e 11,11 mg/L, em C1 e C9,

respectivamente). Provavelmente, as variáveis independentes exerceram maior alteração nas populações de bactérias produtoras de hidrogênio em relação às produtoras de etanol.

Na condição C1, com maior produção de hidrogênio (0,60 mmol/L), observou-se baixo acúmulo de ácidos orgânicos, principalmente ácido acético (231,95 mg/L). Provavelmente, sob tais condições os ácidos orgânicos produzidos durante a acidogênese foram convertidos à hidrogênio. Em contrapartida, em C9, condição com menor produção de hidrogênio (0,28 mmol/L) obteve-se alta produção de ácidos orgânicos, principalmente ácido acético e ácido propiônico (401,57 e 433,76 mg/L, respectivamente). Sob tais condições ocorreu o favorecimento do metabolismo acidogênico.

A menor riqueza (Índice de Chao-1 =15) e diversidade bacteriana (Índice de Shannon de 2,68) foram obtidas em C9 (Tabela 5-51) condição com menor produção de hidrogênio (0,28 mmol/L), porém elevada concentração de ácidos orgânicos (930 mg/L). Em contraste, em C9, observou-se a maior riqueza (16) e diversidade (2,72) de arqueias metanogênicas. sob tais condições, pode-se inferir que a elevada concentração de BCA aplicada nestes reatores favoreceu a produção de ácidos orgânicos e, conseqüentemente o enriquecimento das arqueias metanogênicas. Os índices de diversidade (Shannon) e riqueza (Chao-1) para ambos os domínios estão descritos na Tabela 5-40.

Tabela 5-40: Índices de diversidade (Shannon) e de riqueza (Chao-1) para os domínios *Archaea* e *Bacteria* dos reatores em batelada do planejamento fatorial 1.

Reator	Archaea		Bacteria	
	Riqueza (Chao-1)	Diversidade (Shannon)	Riqueza (Chao-1)	Diversidade (Shannon)
C1	5	1,43	24	3,13
C2	12	2,42	23	3,09
C3	15	2,63	16	2,73
C4	13	2,49	20	2,91
C5	13	2,48	21	3,01
C6	11	2,29	17	2,81
C7	12	2,38	17	2,79
C8	15	2,68	16	2,73
C9	16	2,72	15	2,68
C10	15	2,66	28	3,26
C11	11	2,32	21	2,98

C1 (3,0 g/L de extrato de levedura e 4,0 g/L de BCA), C2 (1,0 g/L de extrato de levedura e 4,0 g/L de BCA), C3 (3,0 g/L de extrato de levedura e 2,0 g/L de BCA), C4 (1,0 g/L de extrato de levedura e 2,0 g/L de BCA), C5, C6 e C7 (2,0 g/L de extrato de levedura e 3,0 g/L de BCA, respectivamente), C8 (3,42 g/L de extrato de levedura e 3,0 g/L de BCA), C9 (0,58 g/L de extrato de levedura e 3,00 g/L de BCA), C10 (2,0 g/L de extrato de levedura e 4,42 g/L de BCA), C11 (2,0 g/L de extrato de levedura e 1,58 g/L de BCA).

5.3.5. Box Hunter e Hunter Mesofílico

A partir do planejamento fatorial descrito anteriormente foi possível observar que o aumento na concentração de extrato de levedura e BCA favoreceram o aumento na produção de hidrogênio. No entanto, não foi possível a partir da variação das concentrações de extrato de levedura (0,58 a 3,42 g/L) e substrato (1,58 a 4,42 g/L) utilizada no planejamento fatorial 1, definir as concentrações ótimas de extrato de levedura e BCA para alcançar a produção maximizada de hidrogênio.

Assim, aplicou-se a ferramenta estatística, Box Hunter & Hunter, para mover a região experimental da variável resposta, produção de hidrogênio aumentando os valores dos níveis das variáveis independentes e com isso possibilitar a aplicação de um planejamento fatorial para obtenção dos valores ótimos destes parâmetros e, consequentemente, máxima produção de hidrogênio. Na primeira análise, variou-se a concentração de extrato de levedura de 0 a 3,0 g/L e BCA de 2,0 a 4,0 g/L. Nesses ensaios observou-se produção crescente de hidrogênio com o aumento de ambas as variáveis independentes (Figura 5-51).

Figura 5-50: Box Hunter e Hunter (1) para a produção de hidrogênio a partir da variação da concentração de extrato de levedura e BCA nos reatores em batelada mesofílicos.

A partir dos resultados obtidos anteriormente (Figura 5-25) aumentou-se a concentração de extrato de levedura e BCA de 4 a 20 g/L. Sob tais condições, observou-se aumento da produção de hidrogênio de 0,60 a 36,66 mmol/L nas condições com menor (4,0

g/L de BCA e X mg/L de extrato de levedura) e maior (20,0 g/L de BCA e X mg/L de extrato de levedura) valor de ambas as variáveis independentes (Figura 5-52).

Figura 5-51: Box Hunter e Hunter (2) para a produção de hidrogênio a partir da variação da concentração de extrato de levedura e BCA nos reatores em batelada mesofílico.

Todavia, a aplicação de concentrações elevadas de extrato de levedura, apesar de ser factível em nível de bancada, é desfavorável em condições reais e, principalmente em escalas aumentadas, assim, optou-se por manter as concentrações iniciais desta fonte de nitrogênio (0,58 a 3,42 g/L) e aumentar apenas a concentração de substrato.

5.3.6. Planejamento Fatorial Mesofílico 2

Neste bloco, avaliou-se o efeito de maior concentração de extrato de levedura e BCA na produção de hidrogênio por meio de metodologia de superfície de resposta (RSM) e composto central (CCD).

Cada variável independente foi estudada em cinco níveis codificados (-1,42; -1; 0; 1; 1,42). Consideraram-se significativos os fatores com nível de confiança acima de 95%. A matriz com as condições do CCD, valor experimental e predito da produção de hidrogênio e etanol está apresentada na Tabela 5-41.

Tabela 5-41: Composto Central dos fatores (decodificados) para a produção de hidrogênio nos reatores em batelada mesofílicos do planejamento fatorial 2

Reator	Nível	Extrato de Levedura	Nível	BCA	H ₂ Acumulado	H ₂ Predito
		(g/L)		(g/L)	(mmol/L)	(mmol/L)
C1	+1	3	+1	6	0,95	1,25
C2	-1	1	+1	6	0,98	0,90
C3	+1	3	-1	4	0,60	0,87
C4	-1	1	-1	4	0,31	0,20
C5	0	2	0	5	1,04	1,05
C6	0	2	0	5	1,05	1,05
C7	0	2	0	5	1,06	1,05
C8	+1,42	3,42	0	5	1,53	1,17
C9	-1,42	0,58	0	5	0,28	0,45
C10	0	2	+1,42	6,42	1,30	1,18
C11	0	2	-1,42	3,58	0,50	0,42

A concentração de extrato de levedura e BCA exerceu efeito linear na produção de hidrogênio (Figura 5-53). O modelo matemático que define a variação da resposta em função das variáveis independentes é descrito nas equações 19.

$$Y = 1,05 + 0,25 * X_1 - 0,12 * X_1^2 + 0,27 * X_2 - 0,12 * X_2^2 - 0,08 X_1 X_2 \quad (19)$$

Sendo:

Y = produção predita de hidrogênio (mmol/L);

X₁ = concentração de extrato de levedura (g/L) e

X₂ = concentração de substrato (g/L).

Figura 5-52: Teste de Pareto do efeito da concentração de extrato de levedura (EL) e concentração de BCA na produção de hidrogênio em reatores em batelada mesofílicos do planejamento fatorial

O nível ótimo das variáveis independentes e suas interações na variável resposta produção de hidrogênio foram avaliados em gráfico de superfície de resposta (Figura5-54).

Figura 5-53: Superfície de resposta da interação entre a concentração de EL e BCA na produção de hidrogênio em reatores em batelada mesofílicos do planejamento fatorial 2.

A adequação do modelo foi determinada por análise de variância (ANOVA) conforme apresentado na Tabela 5-42.

Tabela 5-42: ANOVA para as variáveis independentes com efeito significativos na produção de hidrogênio em reatores em batelada mesofílicos do planejamento fatorial 2.

Variáveis	SS	DF	MS	F-valor	P-valor
Extrato de Levedura (L)	0,51	1	0,51	7,16	0,04
BCA (L)	0,58	1	8,04	0,04	8,04
Erro	0,36	5			
Total	1,61	10			

SS- Soma dos Quadrados; DF – Graus de liberdade; MS – Média dos quadrados; L – Linear; Q- Quadrático. Nível de significância de 95%.

A produção de hidrogênio a partir da biomassa lignocelulósica esta diretamente relacionada a atividade das celulasas, as quais podem ser agregadas ou não agregadas. As celulasas não agregadas são essencialmente de três tipos: 1) β -1,4 endoglucanases, as quais clivam ligações internas β -1,4 glicosídicas da celulose; 2) Celobiohidrolase, as quais liberam celobiose a partir de extremidades não redutoras da celulose e 3) β -glicosidase, capaz de

converter a celobiose em glicose. A atuação sinérgica dos três tipos de enzimas resulta na degradação da celulose (GILBERT; HAZLEWOOD, 1993).

Em contraste, as celulasas agregadas fazem parte de complexos multienzimáticos, como o celulosoma, o qual é constituído por pelo menos 14 polipeptídeos, incluindo endoglucanases e ao menos 1 β -glicosidade. Os polipeptídeos associam-se à proteínas (*scaffolding protein*) que favorecem a adesão do complexo à parede celular ou ao substrato possibilitando a ação das enzimas (GILBERT; HAZLEWOOD, 1993). Vlasenko et al. (2010) reportaram especificidade de substratos em aproximadamente 30 endoglucanases devido a estrutura do sítio ativo e do mecanismo catalítico dessas enzimas, indicando que o processo de degradação de biomassa lignocelulósica é altamente dependente do tipo e concentração de substrato disponível.

Em condições de baixa disponibilidade, o aumento na concentração de substrato normalmente favorece o metabolismo bacteriano, no entanto, elevada concentração de substrato pode causar inibição pelo substrato, reduzindo substancialmente a taxa de hidrólise. A extensão da inibição pelo substrato é dependente da proporção do total de substrato pelo total de enzimas (SUN; CHENG, 2002).

A maior produção de hidrogênio (1,53 mmol/L) foi observada no ensaio com maior concentração de extrato de levedura (3,42 g/L) e 5 g/L de BCA, enquanto que a menor produção (0,28 mmol/L) foi obtida no ensaio com menor concentração de extrato de levedura (0,58 g/L) e a mesma concentração de substrato (5 g/L de BCA). Zhang et al. (2014) utilizando 0,6 g/L de extrato de levedura e 7,0 g/L de glicose obtiveram 18,08 mmol/L de hidrogênio. Maior produção de hidrogênio reportada por estes autores em relação ao presente estudo, utilizando semelhante concentração de extrato de levedura, provavelmente deveu-se à maior concentração (7,0 g/L) e menor complexidade do substrato (glicose) utilizado, em relação ao BCA (5,0 g/L) usado no presente estudo.

No presente estudo, o aumento da concentração de substrato levou ao aumento na produção de hidrogênio, o que pode ser constatado nos ensaios com a mesma concentração de extrato de levedura, como por exemplo em C4 e C2 (com 1 g/L de extrato de levedura), já que em tais condições o aumento da concentração de substrato de 4,0 para 6,0 g/L (C4 e C2, respectivamente) ocasionou o aumento da produção de hidrogênio de 0,31 para 0,98 mmol/L. Fangkum; Reungsang (2011) observaram o mesmo padrão para a produção de hidrogênio a partir de hidrolisado de BCA em condição mesofílica (37 °C), isto é, tais autores reportaram aumento na produção de hidrogênio de 31,25 mmol/L para 58,69 mmol/L a partir de 5,0 e

10,0 g/L de hidrolisado de BCA, respectivamente. A maior produção de hidrogênio obtida por estes autores provavelmente deveu-se ao uso da fração líquida, com elevada concentração de açúcares dissolvidos, em relação à fração sólida utilizada neste estudo.

5.3.6.1. Ácidos Orgânicos e Metano

Em todas as condições dos reatores em batelada do planejamento fatorial 2 foram observados principalmente ácidos acético, butírico e propiônico (Tabela 2-19). Nas condições dos reatores C1 C2, C6, C7 e C8, a rota metabólica favorecida foi a do ácido acético (218,23; 407,42; 861,94; 348,84 e 491,53 mg/L, respectivamente). Em tais condições altas concentrações de hidrogênio foram produzidas (0,95; 0,98; 1,05; 1,06 e 1,53 mmol/L, respectivamente).

Em contrapartida nas condições C3, C4, C5, C9, C10, e C11 elevadas concentrações de ácido butírico (648,41; 645,77; 413,13; 638,85; 1117,98 e 899,55 mg/L, respectivamente) foram produzidas. Nestas condições, com exceção de C5 e C10, observou-se menor produção de hidrogênio (0,60; 0,31; 0,28 e 0,50 em C3, C4, C9 e C11, respectivamente). Em C5 e C10 a produção de hidrogênio observada foi de 1,04 e 1,30 mmol/L, respectivamente. Em todas as condições foi observada produção de ácido propiônico (Tabela 5-43). A produção de ácido propiônico é nociva à produção de hidrogênio uma vez que são consumidos 2 mols de hidrogênio para formação desse ácido orgânico (LI; FANG, 2007). Os ácidos butírico e acético, por outro lado, são subprodutos do processo de fermentação, sugerindo que as vias de ácido acético e butírico foram as rotas dominantes de produção de H₂. Não foi observado efeito das variáveis independentes na produção de ácidos orgânicos (p-valor maior do que 0,1).

A maior produção de ácidos orgânicos (1.525,03 mg/L) foi obtida em C10. Nesta condição, alta produção de hidrogênio (1,30 mmol/L), ácido butírico (1.115,98 mg/L) e ácido acético (350,58 mg/L) foram observadas.

Tabela 5-43: Principais ácidos orgânicos produzidos nas diferentes condições dos reatores em batelada mesofílicos do planejamento fatorial 2.

Reator	Ácido Acético	Ácido Butírico	Ácido Propiônico
(mg/L)			
C1	218,23	128,89	118,62
C2	407,42	77,46	53,91
C3	396,31	648,41	68,17
C4	502,40	645,77	80,77
C5	212,16	413,13	36,03
C6	861,94	302,68	98,20
C7	348,84	99,29	72,26
C8	491,53	466,34	84,95
C9	389,06	638,85	71,59
C10	350,58	1115,98	58,47
C11	27,33	899,55	55,03

C1(3,0g/L de extrato de levedura e 6,0 g/L de BCA), C2 (1,0 g/L de extrato de levedura e 6,0 g/L de BCA), C3 (3,0 g/L de extrato de levedura e 4,0 g/L de BCA), C4 (1,0 g/L de extrato de levedura e 4,0 g/L de BCA), C5, C6 e C7 (2,0 g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de BCA), C8 (3,42 g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de BCA), C9 (0,58 g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de BCA), C10 (2,0 g/L de extrato de levedura e 6,42 g/L de BCA), C11 (2,0/L g de extrato de levedura e 3,58 g/L de BCA).

Produção de metano foi observada nas condições C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C11 (Tabela 5-44). A maior produção de metano (1,47 mmol/L) foi obtida em C2 (6,0 e 1,0 g/L de substrato e extrato de levedura, respectivamente). Nesta condição, o hidrogênio (0,98 mmol/L) e ácido acético (407,42 mg/L) produzidos na etapa de acidogênese e acetogênese, provavelmente foram consumidos por arqueias metanogênicas. Não foi observado efeito significativo das variáveis independentes na produção de metano (p-valor maior do 0,1),

provavelmente porque a metanogênese é a etapa fina da digestão anaeróbia e, portanto é afetada principalmente pelos metabolitos gerados nas etapas anteriores.

Tabela 5-44: Produção de metano (mmol/L) na diferentes condições dos reatores em batelada mesofílicos do planejamento fatorial 2.

Reator	P (mmol/L)	R_m (mmol/h)	λ (h)	R^2
C2	1,47	0,01	70,90	0,99
C3	1,21	0,003	92,72	0,99
C4	0,94	0,005	143,53	0,96
C5	0,81	0,003	94,49	0,99
C6	0,80	0,004	89,69	0,97
C7	1,01	0,003	132,67	0,99
C11	0,98	0,002	95,85	0,98

P - Produção máxima de metano; R_m – Taxa de produção de metano; λ – Tempo para iniciar a produção de hidrogênio. Não foi observada produção de metano em C1, C8, C9 e C10.

C2 (1,0 g/L de extrato de levedura e 6,0 g/L de BCA), C3 (3,0 g/L de extrato de levedura e 4,0 g/L de BCA), C4 (1,0 g/L de extrato de levedura e 4,0 g/L de BCA), C5, C6 e C7 (2,0 g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de BCA), C11 (2,0 g/L de extrato de levedura e 3,58 g/L de BCA).

O início da produção de metano mais demorado (143, 53 horas) ocorreu em C4, enquanto o menor período (70,90 horas) ocorreu em C2. A máxima produção de ácidos orgânicos foi de 538,78 e 1.228,94 mg/L em C2 e C4, respectivamente. A concentração de extrato de levedura foi de 1,0 g/L em ambas as condições. Todavia a maior concentração de BCA (6,0 g/L) em C2 em relação a C4 (4,0 g/L) provavelmente exerceu efeito inibitório nas bactérias fermentadoras já que baixa produção de ácidos orgânicos foi obtida nesta condição. Por outro lado, a maior produção de ácidos orgânicos em C4, possivelmente, exerceu efeito inibidor nas arqueias metanogênicas, já que nesta condição obteve-se menor produção de metano. O acúmulo de ácidos orgânicos em sistemas anaeróbios ocasiona diminuição do pH e, conseqüentemente, afeta o metabolismo metanogênico (MOSEY, 1983). Neste trabalho o

pH final em C4 foi de 5,3 corroborando o efeito do acúmulo de ácidos orgânicos, uma vez que o pH inicial foi de 6,0.

5.3.6.2. Carboidratos

A degradação da biomassa lignocelulósica (BCA) foi confirmada pela liberação de açúcares no final de todas as condições experimentais (Tabela 5-45).

Tabela 5-45: Principais açúcares da degradação do BCA em reatores em batelada mesofílicos do planejamento fatorial 2.

Reator	Frutose	Xilose + Glicose mg/L	Total
C1	636,25	36,07	672,31
C2	877,22	108,86	986,08
C3	806,78	33,57	840,35
C4	945,98	123,46	1069,41
C5	271,69	-	271,69
C6	255,90	-	255,90
C7	256,81	-	256,81
C8	418,04	-	418,04
C9	387,91	-	387,91
C10	396,02	-	396,02
C11	415,44	-	415,44

C1(3,0 g/L de extrato de levedura e 6,0 g/L de BCA), C2 (1,0 g/L de extrato de levedura e 6,0 g/L de BCA), C3 (3,0 g/L de extrato de levedura e 4,0 g/L de BCA), C4 (1,0g/L de extrato de levedura e 4,0 g/L de BCA), C5, C6 e C7 (2,0 g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de BCA), C8 (3,42 g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de BCA), C9 (0,58 g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de BCA), C10 (2,0 g/L de extrato de levedura e 6,42 g/L de BCA), C11 (2,0 g/L de extrato de levedura e 3,58 g/L de BCA).

A maior liberação de açúcares a partir da degradação do BCA ocorreu em C4, condição com 1,0 de extrato de levedura e 4 g/L de BCA. A partir de análise de CCD, não observou-se efeito significativo das variáveis independentes na liberação de açúcares.

Frutose foi obtida em todas as condições (C1 a C11) a qual pode ser produzida a partir da hidrólise do amido pelas enzimas amilases. Tais enzimas possuem importância, principalmente, na indústria biotecnológica de produção de xaropes de glicose e frutose

(SAHNI; GOEL, 2015). No presente estudo foi observada a presença da enzima α -amilase (EC 3.2.1.1 - sessão 5.3.3.5.6), corroborando o potencial do consorcio microbiano na produção deste açúcar.

5.3.6.3. Validação Experimental do modelo para a produção de hidrogênio

O modelo estatístico de produção de hidrogênio foi validado usando 2,77 g/L de extrato de levedura e 5,84 g/L de BCA. Nestas condições, a produção de hidrogênio prevista pelo modelo foi de 1,26 mmol/L e o valor obtido experimentalmente foi de 1,50 mmol/L, validando assim o modelo (Figura 5-55).

Figura 5-54: Produção de hidrogênio em condições ótimas de extrato de levedura e BCA em reator em batelada mesofílico (37 °C) do ensaio de otimização.

Produção e consumo de ácidos orgânicos foi observada durante o período experimental no ensaio otimizado (Tabela 2-21). Os ácidos orgânicos observados após 24 horas de operação foram acético (389,06 mg/L), propiônico (71,59 mg/L), butírico (638,85 mg/L) e isovalérico (50,77 mg/L). Após 48 horas observou-se aumento na concentração de ácido butírico (1.115,98 mg/L), e ligeira diminuição dos ácidos acético e propiônico (350,58 e 58,47 mg/L, respectivamente). No final do ensaio observou-se ácido cítrico (6,72 mg/L) e diminuição dos demais ácidos orgânicos (Tabela 5-46).

No início do experimento, foi observado 86,36 mg/L de furfural, proveniente do pré-tratamento do BCA. A concentração deste inibidor diminuiu ao longo do período de incubação (54,34; 44,24 e 25,57 mg/L após 24, 48 e 126 horas, respectivamente).

Tabela 5-46: Ácidos orgânicos ao longo do período experimental da condição otimizada.

Tempo/Ácidos Orgânicos	Ácido Acético	Ácido Butírico	Ácido Cítrico	Ácido Isovalérico	Ácido Propiônico
	(mg/L)				
24 horas	389,06	638,85	-	50,77	71,59
46 horas	350,58	1115,98	-	47,42	58,47
126 horas	25,34	899,55	6,72	-	55,03

5.3.6.4. Caracterização Microbiana

Apesar da produção de metano ter sido observada apenas em C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C11, foram observadas populações de arqueias metanogênicas em todas as condições dos reatores em batelada mesofílico do planejamento fatorial 2 (Figura 5-56). Similaridade de apenas 38% foi observada entre a condição C2 (1,0 e 6,0 g/L de extrato de levedura e BCA, respectivamente) e ponto central (CP- 2,0 e 5,0 g/L de extrato de levedura e BCA, respectivamente), condições com a maior (1,47 mmol/L) e menor produção de metano obtidas neste estudo (0,80 mmol/L). Provavelmente, no caso de C2 ocorreu o favorecimento da metanogênese, mas em C6 as populações de arqueias foram negativamente afetadas.

Na condição C2 observou-se menor concentração acúmulo de ácido acético e hidrogênio (407,42 mg/L e 0,98 mmol/L, respectivamente) em relação a C6 (861,94 mg/L e 1,05 mmol/L, respectivamente). Provavelmente, estes metabólitos produzidos na acidogênese e acetogênese foram utilizados por arqueias metanogênicas hidrogenotróficas e acetoclásticas na produção de metano.

Similaridade de apenas 52% foi observada entre as populações de bactérias de C8 (3,42 e 5,00 g/L de extrato de levedura e BCA, respectivamente) e C9 (0,58 e 5,00 g/L de extrato de levedura e BCA, respectivamente) condições com a maior e menor produção de hidrogênio (1,53 e 0,28 mmol/L, respectivamente). Sob tais condições, provavelmente, as populações de bactérias foram fortemente afetadas pela concentração de extrato de levedura, uma vez que, tanto em C8, quanto em C9 foi utilizada a mesma concentração de BCA (5,0 g/L). A produção de hidrogênio em C8 foi realizada via ácido acético (491,53 mg/L),

enquanto em C9, a principal rota foi a do ácido butírico (638,85 mg/L). Nestas condições foi observada diferença em relação à produção de hidrogênio

A

B

Figura 5-55: Padrão de bandas do DGGE para os domínios Archaea (A) e Bacteria (B) para as condições C1(3,0 g/L de extrato de levedura e 6,0 g/L de BCA), C2 (1,0g/L de extrato de levedura e 6,0 g/L de BCA), C3 (3,0g/L de extrato de levedura e 4,0 g/L de BCA), C4 (1,0 g/L de extrato de levedura e 4,0 g/L de BCA), pontos centrais (CP- 2,0 g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de BCA), C8 (3,42 g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de BCA), C9 (0,58 g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de BCA), C10 (2,0 g/L de extrato de levedura e 6,42 g/L de BCA), C11 (2,0g/L de extrato de levedura e 3,58 g/L de BCA) e otimização (OTM)

A maior riqueza para o Domínio Bacteria (Índice de Chao-1) foi obtida no ponto central (CP- 3,01). Nesta condição observou-se também a maior diversidade de Shannon (22). Sob tal condição, a produção média de hidrogênio foi de 1,05 mmol/L.

Em contrapartida, a menor riqueza e diversidade de bactérias (8 e 1,83, respectivamente) foram obtidas em C11, condição com menor concentração de ácido acético (27,33 mg/L) e baixa produção de hidrogênio (0,5 mmol/L). Sob tais condições, pode-se

inferir sobre o efeito negativo da concentração de BCA e extrato de levedura nas populações de bactérias.

Em relação às populações de arqueias metanogênicas observou-se os maiores valores de riqueza e diversidade (2,31 e 11, respectivamente) para as condições experimentais em C2, condição com maior produção de metano (1,47 mmol/L). Sob tais condições, pode-se inferir que as populações de arqueias metanogênicas foram favorecidas (Tabela 5-47). Para os dois domínios Bacteria e Archaea não foi observado efeito das variáveis independentes na estrutura das comunidades microbianas (p-valor maior do que 0,05).

Tabela 5-47: Índices de diversidade (Shannon) e riqueza (Chao-1) para os domínios Archaea e Bacteria do reator em batelada mesofílico

Reator	Archaea		Bacteria	
	Riqueza (Chao-1)	Diversidade (Shannon)	Riqueza (Chao-1)	Diversidade (Shannon)
C1	7	1,834	18	2,747
C2	11	2,308	20	2,865
C3	7	1,815	18	2,756
C4	8	1,947	16	2,646
CP	6	1,608	22	3,013
C8	8	1,919	12	2,462
C9	10	2,185	18	2,826
C10	10	2,164	18	2,782
C11	10	2,126	8	1,833

C1 (3,00 de extrato de levedura e 6,00 g/L de BCA), C2 (1,00 de extrato de levedura e 6,00 g/L de BCA), C3 (3,00 de extrato de levedura e 4,00 g/L de BCA), C4 (1,00 de extrato de levedura e 4,00 g/L de BCA), pontos centrais (CP- 2,00 de extrato de levedura e 5,00 g/L de BCA), C8 (3,42 de extrato de levedura e 5,00 g/L de BCA), C9 (0,58 de extrato de levedura e 5,00 g/L de BCA), C10 (2,00 de extrato de levedura e 6,42 g/L de BCA), C11 (2,00 de extrato de levedura e 3,58 g/L de BCA).

5.3.6.5. Composição microbiana no reator em batelada mesofílico de maior produção de H_2

Para avaliar a composição taxonômica microbiana do reator com melhor desempenho de produção de hidrogênio (C8 – 3,42 g/L de extrato de levedura e 5,00 g/L de BCA), anotações foram realizadas utilizando os bancos de dados SEED, KEGG e *subsystem* com valor de corte (E-valor) de 10^{-5} baseado nos bancos de dados disponibilizados no MG-RAST. No nível de domínio, a maioria das leituras foi atribuída a Bacteria, com abundância relativa

de 95,39%. As leituras para Archaea representaram 4,57% (Figura 5-57). Para os representantes do domínio Eukarya e Vírus verificou-se abundância relativa menor do que 0,1%.

Figura 5-56: Perfil taxonômico em nível de domínio do reator em batelada mesofílico de maior produção de hidrogênio. As sequências do DNA total foram atribuídas aos domínios Archaea, Bacteria, Eukarya e Vírus do reator C8 mesofílico.

Em relação ao domínio Archaea identificou-se 98,84% dos representantes pertencentes ao filo Euryarchaeota. Todavia, foram identificados ainda representantes pertencentes aos filos Crenarchaeota (0,976 %), Korarchaeota (0,073 %), Thaumarchaeota (0,105 %) e Nanoarchaeota (0,009 %).

Foram identificados 12 gêneros de Archaea com abundância relativa acima de 1% (*Methanothermobacter* – 49,70%; *Methanobrevibacter* – 13,52%; *Methanosphaera* – 10,35%; *Methanosarcina* – 7,01%; *Methanococcus* – 4,02%; *Methanocaldococcus* – 2,99%; *Methanococcoides* – 1,58%; *Methanocullens* – 1,28%; *Methanocorpusculum* – 1,11%; *Pyrococcus* – 1,05%; *Methanosphaerulla* – 1,04%; *Methanosaeta* – 1,01%). Outros gêneros (5,32%) foram identificados em abundância relativa menor do que 1 % (Figura 5-58).

Methanothermobacter; *Methanobrevibacter*; *Methanosphaera*; *Methanosarcina*; *Methanococcus*; *Methanocaldococcus*; *Methanocullens*; *Pyrococcus*; *Methanosaeta* foram descritos previamente (ver sessão 5.2.5.6.4). Neste estudo, abundância relativa de 1,58% foi obtida para *Methanococcoides*. Tais arqueias são metanogênicas metilotrófica, mesofílicas e anaeróbias estritas (L'HARIDON et al., 2014). *Methanocorpusculum*, também identificado no presente estudo (1,11%) representam arqueias metanogênicas hidrogenotróficas e mesofílicas (OREN; GARRITY, 2015). Abundância relativa de 1,04% foi observada para *Methanosphaera*, cujos representantes são metanogênicas hidrogenotróficas e utilizam

metanol para o crescimento celular. Arqueias semelhantes a *Methanosphaera* são características de trato intestinal animal (BIAVATI; VASTA; FERRY, 1988).

Figura 5-57: Filos (A) e principais gêneros (B) do Domínio Archaea baseado na análise de Metagenômica do reator em batelada mesofílico de maior produção de H₂ do reator C8 mesofílico

Em relação ao domínio Bacteria observou-se a seguinte distribuição dos representantes entre os filos: Bacteroidetes (48,58 %) Firmicutes (42,23 %) e Proteobacteria (4,77 %). Representantes pertencentes a outros filos foram identificados com abundância relativa menor do que 1% (Figura 5-59).

Figura 5-58: Filos (A) e principais gêneros (B) do Domínio Bacteria baseado na análise de Metagenômica do reator em batelada mesofílico de maior produção de H₂ do reator C8 mesofílico

Seis gêneros de bactérias foram identificados com abundância relativa acima de 1 %: *Clostridium* (30,80 %); *Bacteroides* (22,42 %); *Parabacteroides* (15,42 %); *Porphyromonas* (5,06 %); *Desulfotobacterium* (1,54 %) e *Bacillus* (1,45 %). Representantes de outros gêneros (23,31 %) foram identificados em abundância relativa abaixo de 1% (Figura 5-60). Dentre os gêneros com abundância relativa maior do que 1 %, *Clostridium*, *Desulfotobacterium*, e *Bacillus* foram previamente descritos (ver sessão 5.2.5.6.4).

Bactérias semelhantes a *Bacteroides* fazem parte da microbiota endógena do trato digestivo de animais, sendo algumas espécies de extrema relevância clínica (SAKAMOTO; SUZUKI; BENNO, 2010). Robert et al., (2007) isolaram e descreveram bactérias anaeróbias estritas semelhantes a *Bacteroides* provenientes de fezes humanas. Os autores verificaram a

degradação de diferentes tipos de celulose e carboidratos para produção, principalmente, de ácido acético, propiônico e succínico por representantes desse gênero. No presente estudo, bactérias semelhantes a *Bacteroides* foram identificadas em abundância relativa elevada (22,42 %) e foram, provavelmente, favorecidas a partir das condições impostas em C8 a partir do inóculo mesofílico (consórcio enriquecido de solo e resíduos de compostagem).

Parabacteroides representam microrganismos anaeróbios obrigatórios, não formadores de endósporos associados à produção de ácidos orgânicos, principalmente acético e propiônico (SAKAMOTO; BENNO, 2006). SHAN et al., (2017) reportaram a produção de ácidos orgânicos (2.318,1 mg/L) por bactérias acidogênicas semelhantes a *Parabacteroides*, *Rumminococcus* e *Prevotella*, a partir de água residuária da indústria de etanol celulósico em sistema de duas fases (aeróbio/anaeróbio). No presente estudo, para a condição experimental C8 verificou-se 1.042,8 mg/L de ácidos orgânicos a partir da fração sólida do BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico em reator anaeróbio em batelada a 37°C.

Porphyromonas representam bactérias anaeróbias obrigatórias, fermentadoras essencialmente de aminoácidos, e produção de ácidos orgânicos, tais como acético, butírico, propiônico, isobutírico e isovalérico (SHAH; COLLINS, 1988). Assim, em C8 foram identificadas bactérias celulolíticas, fermentadoras, produtoras de ácidos, álcoois e metano, além de comunidades do domínio Eukarya e Vírus (Figura 5-55). Portanto, as condições estabelecidas nesta condição favoreceu o crescimento de consórcio microbiano complexo capaz de degradar a biomassa lignocelulósica e converte-la em produtos de interesse biotecnológico.

Figura 5-59: Abundância Relativa (%) dos principais gêneros de Archaea e Bacteria identificados em C8. Onde os valores 1 a 25 correspondem aos gêneros *Methanothermobacter*; *Methanobrevibacter*; *Methanosphaera*; *Methanosarcina*; *Methanococcus*; *Methanocaldococcus*; *Clostridium*; *Bacteroides*; *Parabacteroides*; *Porphyromonas*; *Desulfotobacterium*; *Bacillus*; *Arabidopsis*; *Drosophila*; *Magnaporthe*; *Eremothecium*; *Odontella*; *Gibberella*; *Mus*; *Anopheles*; *unclassified(derivedfromSiphoviridae)*; *T4-likeviruses*; *P1-likeviruses*; *T7-likeviruses*; *P22-likeviruses* Arc – Archaea; Bact – Bacteria, Euk – Eukarya e Vir – Vírus.

5.3.6.6. Distribuição das funções metabólicas na comunidade microbiana do reator em batelada mesofílico de maior produção de H_2

Os genes identificados no reator mesofílico de maior produção de hidrogênio do planejamento fatorial (C8) foram relacionados, principalmente, a carboidratos (17,09 %), aminoácidos e derivados (11,28 %) e metabolismo de proteínas (11,11 %) (Figura 5-61).

Figura 5-60: Distribuição funcional dos genes observados no reator C8 de melhor rendimento de hidrogênio do planejamento fatorial mesofílico (Nível 1).

Considerando o nível Carboidratos, a principal sub-categoria (nível 2) foi metabolismo central de carboidratos (24,4 %) relacionado ao complexo desidrogenase, rota de conversão de carboidratos (Entner-Doudoroff), glicólise, glicogênese, metabolismo de pentoses. Outras importantes funções relacionadas a carboidratos foram metabolismo de monossacarídeos (19,2 %) e fermentação (10,6 %) (Figura 5-62). Foram ainda identificados genes relacionados à fixação de CO_2 , mono, poli e oligossacarídeos, ácidos orgânicos e álcool.

Figura 5-61: Distribuição funcional dos genes relacionados ao metabolismo de carboidratos (nível 2) no reator de melhor desempenho na produção de hidrogênio do planejamento fatorial mesofílico.

Considerando a categoria Fermentação, seis subcategorias foram observadas, relacionadas ao metabolismo do butanodiol (41,58 %), diversos ácidos (16,29 %), síntese de acetona, butanol, etanol (12,43 %), butanol (11,15 %), lactato (10,22 %) e butirato (8,33 %), (Figura 5-63).

Figura 5-62: Distribuição funcional dos genes relacionados à fermentação (nível 3) no reator de melhor desempenho na produção de hidrogênio do planejamento fatorial mesofílico.

Em C8 foram observados genes responsáveis pela codificação de enzimas relacionadas a degradação de monossacarídeos, tais como 1-fosfoquinase (EC 2.7.1.56), frutoquinase (EC 2.7.1.4), α -L/N arabinofurosidase (EC 3.2.1.55), riboquinase (EC 2.7.1.16), L-arabinose isomerase (EC 5.3.1.4), dissacarídeos e oligossacarídeos, como α -manosidase (EC 3.2.1.24), β -glicosidase (EC 3.2.1.21), sacarose-6-fosfato hidrolase (EC 3.2.1.26), sacarose fosforilase (EC 2.4.1.7), celobiose fosforilase (EC 2.4.1.20), glicoamilase (EC 3.2.1.3), maltodextrina glicosidase (EC 3.2.1.20) e polissacarídeos.

Após 31 horas de operação do reator C8 observou-se 418,04 mg/L de frutose, proveniente da degradação do BCA. Nesta condição, foram identificados genes codificantes de enzimas que participam do metabolismo de conversão de diversos açúcares, como a sacarose fosforilase (EC 2.4.1.7), responsável por catalisar a reação de conversão da sacarose à D-frutose e α -D-1-fosfato (Figura 5-64), corroborando com a presença de microrganismos capazes de produzir frutose a partir de carboidratos disponíveis na biomassa lignocelulósica ou provenientes da degradação deste substrato pelo consórcio microbiano mesofílico.

Em C8 foi identificado também o gene codificante da enzima celulase (EC 3.2.1.4), uma endoglucanase responsável pela hidrólise das ligações 1,4 beta glicosídicas da celulose, corroborando a importância celulolítica do consórcio microbiano mesofílico enriquecido nesta condição.

No mesmo sentido, a identificação de genes codificantes da enzima celulose 1,4-beta-celobiosidase (EC 3.2.1.91), uma exoglucanase responsável pela hidrólise das ligações 1,4 beta glicosídicas da celulose liberando celobiose a partir das extremidades não redutoras.

Foram ainda identificados genes codificantes de enzimas catalisadoras de outras reações de conversão de diversos açúcares, tais como xylan 1,4-beta-xylosidase (EC 3.2.1.37), pectinesterase (EC 3.1.1.11), maltose-6'-fosfato glicosidase (EC 3.2.1.122), amilofosforilase (EC 2.4.1.1); α -manosidase (EC 3.2.1.55); α -N-arabinofuranosidase participantes dos metabolismos da xilose, pectina, maltose e amido, manose e arabinose, respectivamente.

Ainda em relação ao metabolismo de carboidratos, observaram-se em C8, 3 % dos genes responsáveis pelo metabolismo de polissacarídeos. Em nível de polissacarídeos, 42,23 % dos genes relacionaram-se a codificação de enzimas do complexo celossoma (Figura 5-64), tais como 1,4 α -glicano (EC 2.4.1.18), α -amilase (EC 3.2.1.1) e α -glicosidase (EC 3.2.1.20).

Figura 5-63: Distribuição funcional dos genes relacionados ao complexo celulosoma no reator de melhor desempenho na produção de hidrogênio do planejamento fatorial mesofílico.

Foram ainda identificados genes responsáveis pela síntese de enzimas de resistência a compostos inibidores da fermentação, tais como, hidroxiacetilglutathione hydrolase (EC 3.1.2.6) tolerante ao furfural, UDP-glicosehidrolase (EC 5.1.3.2) tolerante a compostos fenólicos; arginina descarboxilase (EC 4.1.1.19) tolerante a ácidos. A identificação de genes codificantes de enzimas tolerantes a compostos tóxicos da fermentação é essencial em processos biotecnológicos para a conversão da biomassa lignocelulósica, como o bagaço de cana-de-açúcar, uma vez que devido à complexidade deste substrato, a aplicação de pré-tratamentos da biomassa é crucial para a liberação de açúcares mais facilmente fermentáveis, no entanto, tais procedimentos liberam também furfural, fenóis, ácidos e outros compostos tóxicos a fermentação.

Genes relacionados à síntese de enzimas tolerantes a estresse oxidativo (36,9 %), choque térmico (26,4 %), osmótico (9,9 %), ácido (9,7 %), periplasmático (3,8 %), desintoxicação (0,65 %), choque frio (0,30 %) e dessecação (0,06 %) foram identificados em C8 (Figura 5-65).

Figura 5-64: Distribuição funcional dos genes relacionados à resistência a diversos tipos de estresses no reator de melhor desempenho na produção de hidrogênio do planejamento fatorial mesofílico.

Os genes relacionados ao estresse ácido codificam as enzimas arginina descarboxilase (EC 4.1.1.19) e glutamato descarboxilase (EC 4.1.1.15), enquanto à resistência ao choque térmico está associada às enzimas ribonuclease PH (EC 2.7.7.56); nucleosídeo 5-trifosfatase (EC 3.6.1.15), e ribossomal proteína L11 metiltransferase (EC 2.1.1.-).

Em relação à resistência ao estresse osmótico observou-se genes codificantes das enzimas cíclico beta-1,2-glucan sintase (EC 2.4.1.-); fosfoglicerol transferase I (EC 2.7.8.20); colina desidrogenase (EC 1.1.99.1) e sarcosina alpha oxidase (EC 1.5.3.1).

Por fim, a resistência ao estresse oxidativo está relacionada aos genes codificantes das seguintes enzimas: peroxiredoxina (EC 1.11.1.15); superoxide redutase (EC 1.15.1.2); manganês superoxide dismutase (EC 1.15.1.1); peroxidase (EC 1.11.1.7); NAD-dependente gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (EC 1.2.1.12); NADPH-dependente gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (EC 1.2.1.13); Nicotinato fosforibosil transferase (EC 2.4.2.11); superóxido dismutase [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1); superóxido dismutase [Fe] (EC 1.15.1.1) e catalase (EC 1.11.1.6).

Em C8, não foi observada produção de metano (Figura 5-66), todavia observou-se a presença dos genes codificantes de enzimas relacionadas à metanogênese (15,8 %) e a

metanogênese a partir de compostos metilados (1,8 %). As condições aplicadas nesta condição (3,42' de extrato de levedura e 5,00 g/L de BCA) e a diluição do inóculo provavelmente afetaram negativamente as populações de arqueias metanogênicas, as quais não foram enriquecidas no tempo de incubação (31 horas) destes reatores. No entanto o potencial metanogênico do inóculo mesofílico pode ser verificado pela presença de genes codificantes de enzimas relacionadas à metanogênese (Figura 5-67).

Figura 5-65: Enzimas relacionadas ao metabolismo metanogênico codificadas pelos genes presentes no reator de melhor desempenho na produção de hidrogênio do planejamento fatorial mesofílico.

Por fim neste estudo observaram-se genes relacionados a todas as etapas da digestão anaeróbia tais como os codificantes de enzimas com importante papel na degradação da biomassa lignocelulósica, fermentação de aminoácidos, carboidratos e proteínas, metanogênese, e em outros ciclos biogeoquímicos, a partir do metabolismo do ferro, nitrogênio, fósforo e potássio, corroborando o potencial do inóculo (mistura de resíduos de compostagem com solo) na bioconversão do bagaço de cana-de-açúcar em produtos de valor biotecnológico.

Metabolismo do Metano

Figura 5-66: Mapa metabólico da produção de metano. Em azul, destacam-se as enzimas codificadas pelos genes encontrados em C8 responsáveis por diferentes etapas da metanogênese

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Hipótese Central: A partir da revisão da literatura levantou-se a hipótese de que seria possível a produção de hidrogênio a partir do bagaço de cana-de-açúcar como substrato utilizando consórcio microbiano proveniente de lodo de reator anaeróbico de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB) e a partir de consórcio microbiano proveniente da mistura de solo e de compostagem em reatores em batelada a 55 e 37 °C, respectivamente. De acordo com as etapas estudadas, a hipótese central foi subdividida em:

- **Hipótese Aceita** – Por meio da análise dos resultados verificou-se a possibilidade da produção de hidrogênio e outros bioprodutos a partir do BCA *in natura* e pré-tratado (explosão a vapor, hidrotérmico, deslignificação alcalina) em condição termofílica e, a partir do BCA *in natura* e pré-tratado (pré-tratamento biológico, autoclave, hidrotérmico) em condição mesofílica;

Sub-hipótese 1: O pré-tratamento do inóculo é fundamental para a inibição de microrganismos consumidores de hidrogênio e favorecimento de bactérias celulolíticas e fermentadoras;

- **Hipótese Refutada** – Por meio da análise dos resultados verificou-se que o pré-tratamento do inóculo por diluição seriada pôde reduzir a atividade de arqueias metanogênicas, porém não ocasionou inibição permanente destes microrganismos, bem como a aplicação do pré-tratamento térmico e ácido ocasionaram redução da metanogênese e também da fermentação, resultando em baixa produção de hidrogênio;

Sub-hipótese 2: A composição do meio de cultura afeta o crescimento microbiano e consequentemente a produção de metabólitos;

- **Hipótese Aceita** – Por meio da análise dos resultados verificou-se que a produção de hidrogênio foi favorecida nos ensaios utilizando o meio de cultura mais complexo e suplementado com extrato de levedura.

Sub-hipótese 3: O extrato de levedura usado como suplementação de nitrogênio no meio de cultura não é utilizado como substrato pelos microrganismos fermentadores;

- **Hipótese Aceita** – Por meio da análise dos resultados verificou-se que a produção de hidrogênio foi favorecida nos ensaios em que o meio de cultura foi suplementado com

extrato de levedura, porém mínima produção de hidrogênio foi verificada a partir unicamente do extrato de levedura;

Sub-hipótese 4: O pré-tratamento do BCA é fundamental para a conversão da celulose em açúcares fermentáveis, aumentando o acesso de bactérias ao substrato lignocelulósico;

- **Hipótese Rejeitada** – Por meio da análise dos resultados verificou-se que a produção de hidrogênio foi favorecida nos ensaios com o BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico, autoclave, explosão a vapor e deslignificação alcalina em relação ao BCA in natura. No entanto, a produção de hidrogênio foi menor com o BCA pré-tratado com o fungo *A. niger* em relação ao BCA in natura, provavelmente devido utilização dos açúcares dissolvidos no crescimento do fungo;

Sub-hipótese 5: A severidade do pré-tratamento hidrotérmico é determinante para a produção de metabólitos, uma vez que são formados inibidores como o furfural e 5-HMF que podem comprometer o crescimento dos microrganismos;

- **Hipótese Aceita** – Por meio da análise dos resultados verificou-se que os produtos gerados pela hidrólise do BCA em sistema hidrotérmico aumentaram de acordo com a severidade do pré-tratamento;

Sub-hipótese 6: Fatores como a concentração de extrato de levedura, concentração de substrato e temperatura afetam a dinâmica microbiana e, conseqüentemente, a produção de hidrogênio e ácidos orgânicos voláteis.

- **Hipótese Aceita** – Por meio da análise dos resultados verificou-se efeito significativo (p-valor menor do que 0,05 %) das variáveis independentes, concentração de extrato de levedura, concentração de substrato e temperatura na produção de hidrogênio, porém tais variáveis não exerceram efeito na produção de todos os ácidos orgânicos.

7. CONCLUSÕES

- A metanogênese foi reduzida a partir da aplicação da diluição seriada do inóculo, porém não foi inibida completamente. Em contrapartida, a produção de hidrogênio foi menor nos ensaios em que o inóculo termofílico foi submetido aos pré-tratamentos térmico e ácido;
- Observou-se a possibilidade de aplicação do inóculo termofílico (lodo de reator UASB do tratamento de vinhaça) e mesofílico (solo e compostagem) para a bioconversão do BCA em hidrogênio, metano, etanol e ácidos orgânicos;
- O consócio celulolítico e fermentador proveniente do lodo de reator UASB, solo e compostagem foi favorecido nos ensaios enriquecidos com o meio de cultura mais complexo e suplementado com extrato de levedura;
- A produção de hidrogênio foi favorecida a partir do BCA pré-tratado em sistema hidrotérmico, explosão a vapor, autoclave e após a deslignificação alcalina em relação ao BCA in natura;
- A concentração de extrato de levedura, concentração de substrato e temperatura afetaram a produção de hidrogênio;
- Produção de vasta gama de açúcares foi observada nos ensaios do planejamento fatorial 2, tais como xilose, galactose, arabinose, manose, frutose e sacarose;
- A maior produção de hidrogênio do planejamento fatorial termofílico 2 (17,3 mmol/L) foi obtida com 3,42 de extrato de levedura à 60 °C;
- A maior produção de hidrogênio do planejamento fatorial mesofílico 2 (1,53 mmol/L) foi obtida com 3,42 de extrato de levedura e 5,00 g/L de BCA;
- As populações de arqueias e bactérias foram afetadas pelo pré-tratamento do substrato, pela concentração de substrato, concentração de extrato de levedura e temperatura;
- No reator de melhor desempenho de produção de hidrogênio do planejamento fatorial termofílico 2 (C8) identificou-se bactérias celulolíticas, fermentadoras, tolerantes a compostos tóxicos como furfural e 5-HMF, semelhantes aos gêneros *Clostridium* e *Coprothermobacter*, produtoras de genes codificantes de proteínas envolvidas na degradação de celulose, hemicelulose, lignina, monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos e arqueias metanogênicas, tais como as semelhantes aos gêneros *Methanothermobacter* e *Methanosaeta*, produtoras de genes responsáveis pela codificação de enzimas relacionadas a metanogênese.

- No reator de melhor desempenho de produção de hidrogênio do planejamento fatorial mesofílico 2 (C8) observaram-se bactérias celulolíticas, fermentadoras, tolerantes a compostos tóxicos como furfural e 5-HMF, tais como as semelhantes aos gêneros *Clostridium* e *Bacteroides*, produtoras de genes codificantes de proteínas envolvidas na degradação de celulose, hemicelulose, lignina, monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos e arqueias metanogênicas, semelhantes aos gêneros *Methanothermobacter* e *Methanosarcina*, produtoras de genes responsáveis pela codificação de enzimas relacionadas a metanogênese.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Em função dos resultados obtidos sugerem-se algumas temáticas com potencial para serem exploradas em pesquisas futuras.

- Aplicação de *design* experimental exploratório para avaliar o efeito de outras variáveis independentes, como pH, concentração de micronutrientes e relação C/N;
- Aplicação das condições ótimas em reator contínuo para a degradação do BCA;
- Aplicação de *design* fatorial exploratório para otimizar a produção de hidrogênio a partir do BCA como substrato e fonte de microrganismos endógenos;
- Buscar variáveis que favoreçam o enriquecimento das bactérias celulolíticas e fermentadoras identificadas na análise taxonômica do consórcio termofílico, com potencial para a produção de hidrogênio.

9. REFERÊNCIAS

- ABREU, A. A et al. Biohydrogen production from arabinose and glucose using extreme thermophilic anaerobic mixed cultures. **Biotechnology for biofuels**, v. 5, n. 1, p. 6, 2012.
- ADORNO, M. A. T.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B. A. Development and Validation of Two Methods to Quantify Volatile Acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE). **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 5, n. 7, p. 406–414, 2014.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1729–1738, 2011.
- ALBERTINI, S.; CARMO, L. F. DO; PRADO FILHO, L. G. DO. Utilização de serragem e bagaço de cana-de-açúcar para adsorção de cádmio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 113–118, 2007.
- ALLEN, S. G. et al. A comparison between hot liquid water and steam fractionation of corn fiber. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 40, n. 13, p. 2934–2941, 2001.
- ANDREWS, K. T.; PATEL, B. K. *Fervidobacterium gondwanense* sp. nov., a new thermophilic anaerobic bacterium isolated from nonvolcanically heated geothermal waters of the Great Artesian Basin of Australia. **International journal of systematic bacteriology**, v. 46, n. 1, p. 265–269, 1996.
- ANGELIS-DIMAKIS, A. et al. Methods and tools to evaluate the availability of renewable energy sources. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 2, p. 1182–1200, 2011.
- ANTAL JR, M. J. **Water: A traditional solvent pregnant with new applications**. 12th International Conference on the Properties of Water and Steam. **Anais...**New York: Begell House, 1996
- ATLAS, R. M. **Handbook of Media for Environmental Microbiology**Microbiology, 2005.
- BALK, M. et al. (Per)chlorate reduction by an acetogenic bacterium, *Sporomusa* sp., isolated from an underground gas storage. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 88, n. 2, p. 595–603, 2010.
- BAYER, E. A. et al. Uso de extrato de levedura como fonte de carbono e de mediadores redox, para a degradação anaeróbia de corante azo. **Bioresource Technology**, v. 14, n. 1, p. 209–221, 2009.
- BEHERA, S. et al. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic

- biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 36, p. 91–106, 2014.
- BELLACK, A. et al. Methanocaldococcus villosus sp. nov., a heavily flagellated archaeon that adheres to surfaces and forms cell-cell contacts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 6, p. 1239–1245, 2011.
- BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965–977, 2008.
- BIAVATI, B.; VASTA, M.; FERRY, J. G. Isolation and characterization of “Methanosphaera cuniculi” sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 768–771, 1988.
- BOTTA, L. S. et al. Bioconversion of waste office paper to hydrogen using pretreated rumen fluid inoculum. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2016.
- BRAGA, J. K. et al. Effect of 2-bromoethanesulfonate on anaerobic consortium to enhance hydrogen production utilizing sugarcane bagasse. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 48, p. 22812–22823, 2016.
- BRITO-CUNHA, C. C. D. Q. et al. Screening and xylanase production by streptomyces sp. Grown on lignocellulosic wastes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 3, p. 598–608, 2013.
- BROWN, M. E. et al. Discovery and characterization of heme enzymes from unsequenced bacteria: Application to microbial lignin degradation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 45, p. 18006–18009, 2011.
- CAI, M.; LIU, J.; WEI, Y. Enhanced Biohydrogen Production from Sewage Sludge with Alkaline. **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 11, p. 3195–3202, 2004.
- CAI, Y. et al. Comparative secretomic analysis of lignocellulose degradation by Lentinula edodes grown on microcrystalline cellulose, lignosulfonate and glucose. **Journal of Proteomics**, p. 1–10, 2017.
- CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by Penicillium echinulatum. **Industrial Crops and Products**, v. 29, n. 2–3, p. 642–647, 2009.
- CANGANELLA, F.; WIEGEL, J. Anaerobic thermophiles. **Life (Basel, Switzerland)**, v. 4, n. 1, p. 77–104, 2014.
- CAO, G.-L. et al. Single-step bioconversion of lignocellulose to hydrogen using novel moderately thermophilic bacteria. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 82, 2014.
- CGEE. **Química verde no Brasil: 2010-2030**. [s.l: s.n.].
- CHANG, T.; YAO, S. Thermophilic, lignocellulolytic bacteria for ethanol production: Current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 1, p. 13–

27, 2011.

CHEN, Y. et al. Kraft lignin biodegradation by *Novosphingobium* sp. B-7 and analysis of the degradation process. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 682–685, 2012.

CHENG, L. et al. Isolation and characterization of *Methanothermobacter crinale* sp. nov., a novel hydrogenotrophic methanogen from the shengli oil field. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 15, p. 5212–5219, 2011.

CHOI, S. Y. et al. Extreme furfural tolerance of a soil bacterium *Enterobacter cloacae* GGT036. **Journal of Biotechnology**, v. 193, p. 11–13, 2015.

CHONG, M. L. et al. Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 8, p. 3277–3287, 2009.

CHONG, P. S. et al. Enhancement of batch biohydrogen production from prehydrolysate of acid treated oil palm empty fruit bunch. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 22, p. 9592–9599, 2013.

CHORNET, E.; OVEREND, R. P. Phenomenological kinetics and reaction engineering aspects of steam/aqueous treatment. **Kinetics and Engineering**, 1988.

CHU, C. et al. Characterization of microbial community in the two-stage process for hydrogen and methane production from food waste. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 15, p. 8253–8261, 2010.

COLOMBO, L. T. et al. Applying functional metagenomics to search for novel lignocellulosic enzymes in a microbial consortium derived from a thermophilic composting phase of sugarcane bagasse and cow manure. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 109, n. 9, p. 1217–1233, 2016.

COX, M. P.; PETERSON, D. A.; BIGGS, P. J. SolexaQA: At-a-glance quality assessment of Illumina second-generation sequencing data. **BMC bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 485, 2010.

DA CRUZ, S. H. et al. Hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse using response surface methodology improves digestibility and ethanol production by SSF. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 439–447, 2012.

DANKO, A. S. et al. Effect of methanogenic inhibitors, inocula type, and temperature on biohydrogen production from food components. **Environmental Engineering and Management Journal**, v. 7, n. 5, p. 531–536, 2008.

DASGUPTA, D. et al. Design and optimization of ethanol production from bagasse pith hydrolysate by a thermotolerant yeast *Kluyveromyces* sp. IIPE453 using response surface methodology. **SpringerPlus**, v. 2, n. 159, p. 1–10, 2013.

DATAR, R. et al. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 8, p. 932–939, 2007.

DE LIMA BROSSI, M. J. et al. Soil-Derived Microbial Consortia Enriched with Different Plant Biomass Reveal Distinct Players Acting in Lignocellulose Degradation. **Microbial Ecology**, 2015.

DELFORNO, T. P. et al. Microbial diversity of a full-scale UASB reactor applied to poultry slaughterhouse wastewater treatment: Integration of 16S rRNA gene amplicon and shotgun metagenomic sequencing. **MicrobiologyOpen**, n. November 2016, p. 1–12, 2016.

DELFORNO, T. P. et al. Metagenomic analysis of the microbiome in three different bioreactor configurations applied to commercial laundry wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, v. 587–588, p. 389–398, 2017.

DESVAUX, M. *Clostridium cellulolyticum*: Model organism of mesophilic cellulolytic clostridia. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 741–764, 2005.

DIETRICH, D.; ILLMAN, B.; CROOKS, C. Differential sensitivity of polyhydroxyalkanoate producing bacteria to fermentation inhibitors and comparison of polyhydroxybutyrate production from *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas pseudoflava*. **BMC research notes**, v. 6, n. 1, p. 219, 2013.

DONOHUE, B. S. et al. Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, n. 5, p. 913–925, 2008.

DUAN, J. et al. Kraft Lignin Biodegradation by *Dysgonomonas* sp. WJDL-Y1, a New Anaerobic Bacterial Strain Isolated from Sludge of a Pulp and Paper Mill 5. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 26, n. 10, p. 1765–1773, 2016.

ESCALANTE, H.; GUZMÁN, C.; CASTRO, L. Anaerobic digestion of fique bagasse: An energy alternative [Digestion anaerobia del bagazo de fique: Una alternativa energética]. **Dyna**, v. 81, n. 183, p. 74–85, 2014.

EWANICK, S. M.; BURA, R. **Bioalcohol production: Biochemical conversion of lignocellulosic biomass**. [s.l: s.n.].

FAN, Y. et al. Optimization of initial substrate and pH levels for germination of sporing hydrogen-producing anaerobes in cow dung compost. **Bioresource Technology**, v. 91, n. 2, p. 189–193, 2004.

FANG, H. H. P.; LI, C.; ZHANG, T. Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, n. 6, p. 683–692, 2006.

- FANGKUM, A.; REUNGSANG, A. Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate by elephant dung: Effects of initial pH and substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 14, p. 8687–8696, 2011.
- FARDEAU, M. L. et al. Isolation from oil reservoirs of novel thermophilic anaerobes phylogenetically related to *Thermoanaerobacter subterraneus*: Reassignment of *T. subterraneus*, *Thermoanaerobacter yonseiensis*, *Thermoanaerobacter tengcongensis* and *Carboxydibrachium pacificum* to. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 467–474, 2004.
- FEITOSA, D. G.; MALTONI, K. L.; SILVA, I. P. . F. Avaliação da Cinza , Oriunda da Queima do Bagaço da Cana de Açúcar , na Substituição da Adubação Química Convencional para Produção de Alimentos e Preservação do Meio Ambiente. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, p. 2412–2415, 2009.
- FERCHICHI, M. et al. Influence of culture parameters on biological hydrogen production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ATCC 27021. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 6–7, p. 855–862, 2005.
- FERRAZ JÚNIOR, A. D. N. et al. Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 30, p. 16852–16862, 2014.
- FIALA, G.; STETTER, K. O. *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100°C. **Archives of Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 56–61, 1986.
- FIORI, M. G. S.; SCHOENHALS, M.; FOLLADOR, F. A. C. Análise da evolução tempo-eficiência de duas composições de resíduos agroindustriais no processo de com postagem aeróbia. **Engenharia Ambiental**, v. 5, n. 3, p. 178–191, 2008.
- FRANCO-CIRIGLIANO, M. N. et al. *Streptomyces misionensis* PESB-25 Produces a thermoacidophilic endoglucanase using sugarcane bagasse and corn steep liquor as the sole organic substrates. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.
- GARCIA-PENÑA, E. I. et al. Anaerobic digestion and co-digestion processes of vegetable and fruit residues: Process and microbial ecology. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 20, p. 9447–9455, 2011.
- GHIMIRE, A. et al. A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. **Applied Energy**, v. 144, p. 73–95, 2015.

GILBERT, J.; HAZLEWOOD, P. Review Article Bacterial cellulases and xylanases. v. 139, p. 187–194, 1993.

GOMEZ-ALVAREZ, V.; TEAL, T. K.; SCHMIDT, T. M. Systematic artifacts in metagenomes from complex microbial communities. **The ISME Journal**, v. 3, n. 11, p. 1314–1317, 2009.

GONÇALVES, E. M. et al. Analysis gas emission and particulate materials in boilers of the sugar and ethanol industry. **Ciencia e Tecnologia**, v. 6, p. 15–21, 2014.

GONZALES, R. R. et al. Optimization of substrate concentration of dilute acid hydrolyzate of lignocellulosic biomass in batch hydrogen production. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 113, p. 22–27, 2016.

GÖSSNE, A. S. et al. *Thermicanus aegyptius* gen. nov., sp. nov., isolated from oxic soil, a fermentative microaerophile that grows commensally with the thermophilic acetogen *Moorella thermoacetica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 5124–5133, 1999.

GUO, J. et al. Dissecting microbial community structure and methane-producing pathways of a full-scale anaerobic reactor digesting activated sludge from wastewater treatment by metagenomic sequencing. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p. 33, 2015.

GUO, X. M. et al. Predictive and explicative models of fermentative hydrogen production from solid organic waste: Role of butyrate and lactate pathways. **International Journal of Hydrogen Energy**, n. January, 2013.

HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 17–34, 2003.

HAKOBYAN, L.; GABRIELIAN, L.; TRCHOUNIAN, A. Yeast extract as an effective nitrogen source stimulating cell growth and enhancing hydrogen photoproduction by *Rhodobacter sphaeroides* strains from mineral springs. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 8, p. 6519–6526, 2012.

HALLENBECK, P. C.; ABO-HASHESH, M.; GHOSH, D. Strategies for improving biological hydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 1–9, 2012.

HAN, W. et al. Simultaneous biohydrogen and bioethanol production from anaerobic fermentation with immobilized sludge. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1–5, 2011.

HOLDEMAN, L. V.; MOORE, W. E. C. New Genus, *Coprococcus*, Twelve New Species, and Emended Descriptions of Four Previously Described Species of Bacteria from Human Feces. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 24, n. 2, p. 260–277, 1974.

- HOLLIDAY, R.; KING, J.; LIST, G. Hydrolysis of vegetable oils in sub-and supercritical water. **Industrial & engineering chemistry ...**, v. 36, n. 3, p. 932–935, 1997.
- HUBER, H. et al. *Archaeoglobus veneficus* sp. nov., a Novel Facultative Chemolithoautotrophic Hyperthermophilic Sulfite Reducer, Isolated from Abyssal Black Smokers. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 374–380, 1997.
- HWANG, S. Y. et al. Thermal stability and starch degradation profile of α -amylase from *Streptomyces avermitilis*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 77, n. 12, p. 2449–53, 2013.
- IMACHI, H. et al. *Pelotomaculum thermopropionicum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, syntrophic propionate-oxidizing bacterium. **International Journal of Systematic and evolutionary microbiology**, p. 1729–1735, 2002.
- IVANOVA, G.; RÁKHELY, G.; KOVÁCS, K. L. Thermophilic biohydrogen production from energy plants by *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and comparison with related studies. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 9, p. 3659–3670, 2009.
- JACQUET, N. et al. Influence of steam explosion on the thermal stability of cellulose fibres. **Polymer Degradation and Stability**, v. 96, n. 9, p. 1582–1588, 2011.
- JEANTHON, C. et al. *Methanococcus vulcanius* sp. nov., a novel hyperthermophilic methanogen isolated from East Pacific Rise, and identification of *Methanococcus* sp. DSM 4213T as *Methanococcus fervens* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, n. May, p. 583–589, 1999.
- JING, D.; WANG, J. Controlling the simultaneous production of laccase and lignin peroxidase from *Streptomyces cinnamomensis* by medium formulation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 15, 2012.
- JOÓ, F. Breakthroughs in hydrogen storage-formic acid as a sustainable storage material for hydrogen. **ChemSusChem**, v. 1, n. 10, p. 805–808, 2008.
- KALIL, M. S. et al. Effect of Nitrogen Source and Carbon to Nitrogen Ratio on Hydrogen Production using *C. acetobutylicum* Department of Chemical and Process Engineering, Faculty of Engineering, School of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Science and Technology. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 393–401, 2008.
- KALIL, M. S.; ALSHIYAB, H. S.; YUSOFF, W. M. W. Effect of nitrogen source and carbon to nitrogen ratio on hydrogen production using *C. acetobutylicum*. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 393–401, 2008.

- KAMM, B.; KAMM, M. Principles of biorefineries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 137–145, 2004.
- KANEHISA, M. et al. The KEGG databases at GenomeNet. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 1, p. 42–6, 2002.
- KANOKSILAPATHAM, W. et al. Isolation, characterization, and survival strategies of *Thermotoga* sp. strain PD524, a hyperthermophile from a hot spring in Northern Thailand. **Extremophiles**, v. 19, n. 4, p. 853–861, 2015.
- KAPARAJU, P. et al. Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 9, p. 2562–2568, 2009.
- KAPDAN, I. K.; KARGI, F. Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 5, p. 569–582, 2006.
- KENGEN, S. W. M. “*Pyrococcus furiosus*, 30 years on”. **Microbial Biotechnology**, p. 1–4, 2017.
- KERN, T. et al. *Methanosarcina flavescens* sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from a full-scale anaerobic digester. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1533–1538, 2016.
- KESEN, M.; THAUER, R. Purification and properties of N₅N₁ O-methylenetetrahydromethanopterin reductase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain Marburg). **EUR Journal Biochemistry**, v. 193, p. 187–193, 1990.
- KING, J.; HOLLIDAY, R.; LIST, G. Hydrolysis of soybean oil. in a subcritical water flow reactor. **Green Chemistry**, n. December, p. 261–264, 1999.
- KONGJAN, P.; MIN, B.; ANGELIDAKI, I. Biohydrogen production from xylose at extreme thermophilic temperatures (70 °C) by mixed culture fermentation. **Water Research**, v. 43, n. 5, p. 1414–1424, 2009.
- KRITZER, P.; DINJUS, E. An assessment of supercritical water oxidation (SCWO): Existing problems, possible solutions and new reactor concepts. **Chemical Engineering Journal**, v. 83, n. 3, p. 207–214, 2001.
- KUMAR, G.; LIN, C. Y. Bioconversion of de-oiled *Jatropha* Waste (DJW) to hydrogen and methane gas by anaerobic fermentation: Influence of substrate concentration, temperature and pH. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 1, p. 63–72, 2013.
- KUMAR, S. S. et al. Characterizing novel thermophilic amylase producing bacteria from Taptapani hot spring, Odisha, India. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 7, n. 12, 2014.
- KUMARI, S.; DAS, D. Improvement of gaseous energy recovery from sugarcane bagasse by

dark fermentation followed by biomethanation process. **Bioresource Technology**, v. 194, p. 354–363, 2015.

KUNAPULI, U. et al. *Desulfitobacterium aromaticivorans* sp. nov. and *Geobacter toluenoxydans* sp. nov., iron-reducing bacteria capable of anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 686–695, 2010.

KUNDU, K.; SHARMA, S.; SREEKRISHNAN, T. R. Effect of operating temperatures on the microbial community profiles in a high cell density hybrid anaerobic bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 502–511, 2012.

L'HARIDON, S. et al. *Methanocaldococcus indicus* sp. nov., a novel hyperthermophilic methanogen isolated from the Central Indian Ridge. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 1931–1935, 2003.

L'HARIDON, S. et al. *Methanococcoides vulcani* sp. nov., a marine methylotrophic methanogen that uses betaine, choline and N,N-dimethylethanolamine for methanogenesis, isolated from a mud volcano, and emended description of the genus *Methanococcoides*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. PART 6, p. 1978–1983, 2014.

LAI, Z. et al. Optimization of key factors affecting hydrogen production from sugarcane bagasse by a thermophilic anaerobic pure culture. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 119, p. 1–11, 2014.

LAZARO, C. Z. et al. Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: The effects of temperature and substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 12, p. 6407–6418, 2014.

LEE, K. S.; LIN, P. J.; CHANG, J. S. Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, n. 4, p. 465–472, 2006.

LEE, Y. E. et al. Taxonomic Distinction of Saccharolytic Thermophilic Anaerobes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, n. 2, p. 41–51, 1993.

LEE, Y. J.; CHUNG, C. H.; DAY, D. F. Sugarcane bagasse oxidation using a combination of hypochlorite and peroxide. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 935–941, 2009.

LEVIN, D. B. et al. Challenges for biohydrogen production via direct lignocellulose fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 17, p. 7390–7403, 2009.

LEVIN, D. B.; PITT, L.; LOVE, M. Biohydrogen production: Prospects and limitations to

practical application. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, n. 2, p. 173–185, 2004.

LI, C.; FANG, H. H. P. **Fermentative Hydrogen Production From Wastewater and Solid Wastes by Mixed Cultures** *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2007.

LI, J.; HENRIKSSON, G.; GELLERSTEDT, G. Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 16, p. 3061–3068, 2007.

LI, Q.; LIU, C.-Z. Co-culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermosaccharolyticum* for enhancing hydrogen production via thermophilic fermentation of cornstalk waste. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 14, p. 10648–10654, jul. 2012.

LIN, C. Y.; CHEN, H. P. Sulfate effect on fermentative hydrogen production using anaerobic mixed microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, n. 7, p. 953–960, 2006.

LO, Y. C. et al. Isolation of cellulose-hydrolytic bacteria and applications of the cellulolytic enzymes for cellulosic biohydrogen production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, n. 6–7, p. 417–425, 2009.

LO, Y. C. et al. Characterization of cellulolytic enzymes and bioH₂ production from anaerobic thermophilic *Clostridium* sp. TCW1. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 18, p. 8384–8392, 2011.

LU, L. et al. Enhanced hydrogen production from waste activated sludge by cascade utilization of organic matter in microbial electrolysis cells. **Water Research**, v. 46, n. 4, p. 1015–1026, 2012.

MAINTINGUER, S. I. et al. Degradação anaeróbia de fenol em reatores em batelada sob condições fermentativas. **Tecnologica**, p. 47–55, 2008.

MAINTINGUER, S. I. et al. Fermentative hydrogen production with xylose by *Clostridium* and *Klebsiella* species in anaerobic batch reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 21, p. 13508–13517, 2011.

MAINTINGUER, S. I. et al. Bacterial diversity from environmental sample applied to biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 8, p. 3180–3190, 2015.

MARRONE, P. A. et al. Salt precipitation and scale control in supercritical water oxidation - Part B: Commercial/full-scale applications. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 29, n. 3, p.

289–312, 2004.

MARTEINSSON, V. T. et al. *Thermococcus barophilus* sp. nov., a new barophilic and hyperthermophilic archaeon isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, n. 1 999, p. 351–359, 1999.

MASAI, E. et al. Characterization of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 genes involved in degradation of lignin-related compounds. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 23, p. 364–373, 1999.

MATHEWS, S. L.; PAWLAK, J. J.; GRUNDEN, A. M. Isolation of *Paenibacillus glucanolyticus* from pulp mill sources with potential to deconstruct pulping waste. **Bioresource Technology**, v. 164, p. 100–105, 2014.

MAUNE, M. W.; TANNER, R. S. Description of *Anaerobaculum hydrogeniformans* sp. nov., an anaerobe that produces hydrogen from glucose, and emended description of the genus *Anaerobaculum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 832–838, 2012a.

MAUNE, M. W.; TANNER, R. S. Description of *Anaerobaculum hydrogeniformans* sp. nov., an anaerobe that produces hydrogen from glucose, and emended description of the genus *Anaerobaculum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 832–838, 2012b.

MENES, R. J.; MUXÍ, L. *Anaerobaculum mobile* sp. nov., a novel anaerobic, moderately thermophilic, peptide-fermenting bacterium that uses crotonate as an electron acceptor, and amended description of the genus *Anaerobaculum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 157–164, 2002.

MEYER, F. et al. The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 386, 2008.

MILLER, T. L.; WOLIN, M. J. *Methanosphaera stadtmaniae* gen. nov., sp. nov.: a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen. **Archives of Microbiology**, v. 141, n. 2, p. 116–122, 1985.

MOHAN, D.; PITTMAN, C. U.; STEELE, P. H. Pyrolysis of Wood / Biomass for Bio-oil : A Critical Review. **Energy & Fuesl**, v. 20, n. 4, p. 848–889, 2006.

MONTAÑÉS, R.; SOLERA, R.; PÉREZ, M. Anaerobic co-digestion of sewage sludge and sugar beet pulp lixiviation in batch reactors: Effect of temperature. **Bioresource Technology**,

v. 180, p. 177–184, 2015.

MORI, K. et al. *Thermotoga profunda* sp. nov. and *Thermotoga caldifontis* sp. nov., anaerobic thermophilic bacteria isolated from terrestrial hot springs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. PART 6, p. 2128–2136, 2014.

MOSEY, F. E. **Mathematical modelling of the anaerobic digestion process: Regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose** *Water Science and Technology*, 1983.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673–686, 2005.

MOTTE, J. C. et al. Total solid content drives hydrogen production through microbial selection during thermophilic fermentation. **Bioresource Technology**, v. 166, p. 610–615, 2014.

MU, Y. et al. Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, n. 6, p. 780–785, 2006.

MU, Y.; ZHENG, X.; YU, H. Determining optimum conditions for hydrogen production from glucose by an anaerobic culture using response surface methodology (RSM). **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 19, p. 7959–7963, 2009.

MURRAY, K. A. et al. Toward functional type III [Fe]-hydrogenase biomimics for H₂ activation: Insights from computation. **Chemistry - A European Journal**, v. 21, n. 10, p. 3987–3996, 2014.

NATION, J. L. A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft insect tissues for scanning electron microscopy. **Stain technology**, v. 58, n. 6, p. 347–351, 1983.

NEUMER, A. et al. *Thermococcus litoralis* sp. nov.: A new species of extremely thermophilic marine archaeobacteria Annemarie. **Archives of Microbiology**, v. 153, p. 205–207, 1990.

NILSEN, R. K.; TORSVIK, T.; LIEN, T. *Desulfotomaculum thermocisternum* sp. nov., a Sulfate Reducer Isolated from a Hot North Sea Oil Reservoir. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 2, p. 397–402, 1996.

NISHIDA, A. et al. *Bacillus hisashii* sp. Nov., isolated from the caeca of gnotobiotic mice fed with thermophilefermented compost. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 3944–3949, 2015.

O-THONG, S.; BOE, K.; ANGELIDAKI, I. Thermophilic anaerobic co-digestion of oil palm empty fruit bunches with palm oil mill effluent for efficient biogas production. **Applied Energy**, v. 93, p. 648–654, 2012.

OHNO, M. et al. *Symbiobacterium thermophilum* gen. nov., sp. nov., a symbiotic

- thermophile that depends on co-culture with a *Bacillus* strain for growth. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 1829–1832, 2000.
- OLIVEIRA, F. M. V et al. Industrial-scale steam explosion pretreatment of sugarcane straw for enzymatic hydrolysis of cellulose for production of second generation ethanol and value-added products. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 168–173, 2013.
- OREN, A.; GARRITY, G. M. The correct name of the type species of the genus *methanocorpusculum*. Request for an opinion. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2013–2014, 2015.
- PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues . I: sugarcane bagasse. v. 74, 2000.
- PARKS, D. H. et al. STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, v. 30, n. 21, p. 3123–3124, 2014.
- PATTRA, S. et al. Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 19, p. 5256–5265, 2008.
- PAWAR, S. S.; VAN NIEL, E. W. J. **Thermophilic biohydrogen production: How far are we?** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013.
- PÉREZ-RANGEL, M. et al. Microscopic analysis of wheat straw cell wall degradation by microbial consortia for hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 1, p. 151–160, 2015.
- PITARELO, A. et al. Effect of moisture content in the steam treatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Química Nova**, v. 35, n. 8, p. 1502–1509, 2012.
- PODOSOKORSKAYA, O. A. et al. *Thermosiphon activus* sp. nov., a thermophilic, anaerobic, hydrolytic bacterium isolated from a deep-sea sample. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. June 2010, p. 3307–3313, 2014.
- QUÉMÉNEUR, M. et al. Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 4, p. 3150–3159, 2012.
- RABELO, C. AMILA A. B. S.; SOARES, L. A.; VARESCHE, M. B. A. Comparison and Evaluation of Hydrogen and Methane Productions from Hydrothermal Pretreated Sugarcane Bagasse by Two Microbial Consortium. **Austin Clinical Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 1–6, 2017.
- RAINEY, F. A.; STACKEBRANDT, E. Transfer of the Type Species of the Genus

Thermobacteroides to the Genus Thermoanaerobacter as Thermoanaerobacter acetoethylicus (Ben-Bassat and Zeikus 1981) comb. nov., Description of Coprothermobacter gen. nov., and Reclassification of Thermobacteroides. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 857–859, 1993.

RAJESH, T. et al. Identification and functional characterization of an α -amylase with broad temperature and pH stability from paenibacillus sp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 2, p. 359–369, 2013.

RANA, A.; DEY, A. Theoretical exploration of the mechanism of formylmethanofuran dehydrogenase: the first reductive step in CO₂ fixation by methanogens. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 21, n. 5–6, p. 703–713, 2016.

RASMUSSEN, H.; SØRENSEN, H. R.; MEYER, A. S. Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the biorefinery: Sugar reaction mechanisms. **Carbohydrate Research**, v. 385, p. 45–57, 2014.

RATTI, R. P. et al. Microbial diversity of hydrogen-producing bacteria in batch reactors fed with cellulose using leachate as inoculum. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 23, p. 9707–9717, 2013.

RATTI, R. P. et al. Production of H₂ from cellulose by rumen microorganisms: Effects of inocula pre-treatment and enzymatic hydrolysis. **Biotechnology Letters**, v. 36, n. 3, p. 537–546, 2014.

RATTI, R. P. et al. Thermophilic hydrogen production from sugarcane bagasse pretreated by steam explosion and alkaline delignification. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 19, p. 6296–6306, 2015.

RAYNEY, F. A. et al. Description of Caldicellulosiruptor saccharolyticus. v. 120, p. 263–266, 1994.

REES, G. N. et al. Anaerobaculum thermoterrenum gen. nov., sp. nov., a novel, thermophilic bacterium which ferments citrate. **International journal of systematic bacteriology**, v. 47, n. 1, p. 150–4, 1997.

REN, N. Q. et al. Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 16, p. 4318–4324, 2008.

ROBERT, C. et al. Bacteroides cellulosilyticus sp. nov., a cellulolytic bacterium from the human gut microbial community. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 7, p. 1516–1520, 2007.

ROCHA, G. J. M. et al. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline

delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 35, n. 1, p. 274–279, 2012.

SAGNAK, R.; KARGI, F.; KAPDAN, I. K. Bio-hydrogen production from acid hydrolyzed waste ground wheat by dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 20, p. 12803–12809, 2011.

SAHNI, T. K.; GOEL, A. Microbial Enz Ymes With Special Reference To A -Amylase. v. 2, n. 1, p. 19–25, 2015.

SAKAMOTO, M.; BENNO, Y. Reclassification of *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides goldsteinii* and *Bacteroides merdae* as *Parabacteroides distasonis* gen. nov., comb. nov., *Parabacteroides goldsteinii* comb. nov and *Parabacteroides merdae* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 7, p. 1599–1605, 2006.

SAKAMOTO, M.; SUZUKI, N.; BENNO, Y. hsp60 and 16S rRNA gene sequence relationships among species of the genus *Bacteroides* with the finding that *Bacteroides suis* and *Bacteroides tectus* are heterotypic synonyms of *Bacteroides pyogenes*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 2984–2990, 2010.

SANTOS, S. C. et al. Hydrogen production from diluted and raw sugarcane vinasse under thermophilic anaerobic conditions. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 18, p. 9599–9610, 2014.

SANTUCCI, M. C. C. et al. EFEITO DO ENRIQUECIMENTO DE BISCOITOS TIPO ÁGUA E SAL , COM EXTRATO DE LEVEDURA (*Saccharomyces* sp .). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 441–446, 2003.

SARIPAN, A. F.; REUNGSANG, A. Biohydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* KKU-ED1: Culture conditions optimization using xylan as the substrate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 14, p. 6167–6173, 2013.

SAUER, M. et al. Microbial production of organic acids: expanding the markets. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 100–108, 2008.

SCHMIDT, J. E.; AHRING, B. K. Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, n. 3, p. 229–246, 1996.

SCHWARZ, W. H. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 5–6, p. 634–649, 2001.

SGARBIERI, V. C. et al. Produção Piloto de Derivados de Levedura (*Saccharomyces* sp .) para Uso como Ingrediente na Formulação de Alimentos Pilot Plant Production of Yeast (*Saccharomyces* sp .) Derivatives for Use as Ingredients in Food Formulations. **Brazilian**

Journal of Food Technology, v. 2, n. 1, p. 119–125, 1999.

SHAH, H. N.; COLLINS, M. D. Proposal for Reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a New Genus, *Porphyromonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, n. 1, p. 128–131, 1988.

SHAN, L. et al. Performance of CSTR–EGSB–SBR system for treating sulfate-rich cellulosic ethanol wastewater and microbial community analysis. **Environmental Science and Pollution Research**, 2017.

SINGH, A. et al. Biohydrogen Production from Lignocellulosic Biomass : Technology and Sustainability. p. 13062–13080, 2015.

SINGH, P. et al. Biological pretreatment of sugarcane trash for its conversion to fermentable sugars. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 667–673, 2008.

SINGH, R. et al. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 32, p. 713–728, 2014.

SLEPOVA, T. V. et al. *Carboxydotherrmus siderophilus* sp. nov., a thermophilic, hydrogenogenic, carboxydophilic, dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium from a Kamchatka hot spring. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 213–217, 2009.

SLUITER, A. et al. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. **Biomass Analysis Technology Team Laboratory Analytical Procedure**, v. 2011, n. July, p. 1–14, 2004.

SMITH, K. S.; INGRAM-SMITH, C. *Methanosaeta*, the forgotten methanogen ? **TRENDS in Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 150–155, 2007.

SONG, Z. X. et al. Effects of pretreatment method of natural bacteria source on microbial community and bio-hydrogen production by dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 7, p. 5631–5636, 2012.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review q. **Bioresource technology**, v. 83, n. 1, p. 1–11, 2002.

TACONI, K. A. et al. Feasibility of methanogenic digestion applied to a low pH acetic acid solution. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 8, p. 1579–1585, 2007.

TANDISHABO, K. et al. Distribution and role of *Coprothermobacter* spp. in anaerobic digesters. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 5, p. 518–520, 2012.

THI, H. et al. Bioprocessing & Biotechniques Optimization of Culture Conditions for

- Hydrogen Production by an Anaerobic Bacteria Strain on Soluble Starch Using Response Surface Methodology. **Bioprocessing and Biotechniques**, v. 5, n. 12, 2015.
- THOMSEN, M. H.; THYGESEN, A.; THOMSEN, A. B. Hydrothermal treatment of wheat straw at pilot plant scale using a three-step reactor system aiming at high hemicellulose recovery, high cellulose digestibility and low lignin hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4221–4228, 2008.
- TRAJANO, H. L. et al. The fate of lignin during hydrothermal pretreatment. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1, 2013.
- UNICA. **Bioeletricidade: a energia verde e inteligente do Brasil**. São Paulo: [s.n.].
- UNICA, S. P. S. A. **Report of sugarcane cultivated area**.
- VAN NIEL, E. W. J. et al. Distinctive properties of high hydrogen producing extreme thermophiles, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga elfii*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 11–12, p. 1391–1398, 2002.
- VENKATA MOHAN, S.; LALIT BABU, V.; SARMA, P. N. Anaerobic biohydrogen production from dairy wastewater treatment in sequencing batch reactor (AnSBR): Effect of organic loading rate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 4, p. 506–515, 2007.
- VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J.; VIEILLE, C. Hyperthermophilic Enzymes : Sources , Uses , and Molecular Mechanisms for Thermostability Hyperthermophilic Enzymes : Sources , Uses , and Molecular Mechanisms for Thermostability. **Microbiology and Molecular Biology reviews**, v. 65, n. 1, p. 1–43, 2001.
- VLASENKO, E. et al. Substrate specificity of family 5, 6, 7, 9, 12, and 45 endoglucanases. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2405–2411, 2010.
- WAGNER, T. et al. Phylogenetic and structural comparisons of the three types of methyl-coenzyme M reductase from Methanococcales and Methanobacteriales. **Journal of Bacteriology**, n. May, p. JB.00197-17, 2017.
- WANG, G.; MU, Y.; YU, H.-Q. Response surface analysis to evaluate the influence of pH, temperature and substrate concentration on the acidogenesis of sucrose-rich wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, n. 2, p. 175–184, 2005.
- WANG, H. et al. Effects of sludge pretreatments and organic acids on hydrogen production by anaerobic fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8731–8735, 2010.
- WANG, J.; WAN, W. Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 1, p. 235–244, 2009a.
- WANG, J.; WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review.

International Journal of Hydrogen Energy, v. 34, n. 2, p. 799–811, 2009b.

WASSERFALLEN, A. et al. Phylogenetic analysis of 18 thermophilic *Methanobacterium* isolates supports the proposals to create a new genus, *Methanothermobacter* gen. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 2000, p. 43–53, 2000.

WEST, T. P.; STROHFUS, B. Short Communication. **Microbiological research**, v. 153, n. 4, p. 327–329, 1998.

WHITE, R. A. et al. Metagenomic analysis suggests modern freshwater microbialites harbor a distinct core microbial community. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. JAN, p. 1–14, 2016.

WU, K. J.; CHANG, C. F.; CHANG, J. S. Simultaneous production of biohydrogen and bioethanol with fluidized-bed and packed-bed bioreactors containing immobilized anaerobic sludge. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 7, p. 1165–1171, 2007.

XU, J.; THOMSEN, M. H.; THOMSEN, A. B. Feasibility of hydrothermal pretreatment on maize silage for bioethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 1, p. 33–42, 2010.

XU, L. et al. Biohydrogen production by *Ethanoligenens harbinense* B49: Nutrient optimization. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 23, p. 6962–6967, 2008.

YANG, Y. et al. Metagenomic analysis of sludge from full-scale anaerobic digesters operated in municipal wastewater treatment plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5709–5718, 2014.

YE, Q. et al. Alkaline Anaerobic Respiration : Isolation and Characterization of a Novel Alkaliphilic and Metal-Reducing Bacterium Alkaline Anaerobic Respiration : Isolation and Characterization of a Novel Alkaliphilic and Metal-Reducing Bacterium. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 9, p. 5595–5602, 2004.

YOKOYAMA, H. et al. Community analysis of hydrogen-producing extreme thermophilic anaerobic microflora enriched from cow manure with five substrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, n. 1, p. 213–222, 2007.

YU, C. et al. Nitrogen amendment of green waste impacts microbial community, enzyme secretion and potential for lignocellulose decomposition. **Process Biochemistry**, v. 52, p. 214–222, 2017.

ZELLNER, G. et al. *Methanoculleus palmolei* sp. nov., an irregularly coccoid methanogen from an anaerobic digester treating wastewater of a palm oil plant in north-Sumatra, Indonesia. **International journal of systematic bacteriology**, v. 48 Pt 4, n. 1 998, p. 1111–7, 1998.

ZHANG, L. et al. Assessment of Effects of Yeast Extract on Bio - hydrogen Production from Anaerobic Activated Sludge. **International journal of agriculture and biology**, p. 1189–1193, 2014.

ZHAO, L. et al. Fungal pretreatment of cornstalk with *Phanerochaete chrysosporium* for enhancing enzymatic saccharification and hydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 365–369, 2012.

ZHENG, X. J.; YU, H. Q. Inhibitory effects of butyrate on biological hydrogen production with mixed anaerobic cultures. **Journal of Environmental Management**, v. 74, n. 1, p. 65–70, 2005.

ZHENG, Y. et al. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 42, n. 1, p. 35–53, 2014.