

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA HIDRÁULICA E
SANEAMENTO

VANESSA CRISTINA DA SILVA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL DE
BACTÉRIAS ANAERÓBIAS TERMÓFILAS PARA OBTENÇÃO DE
HIDROGÊNIO E ETANOL A PARTIR DA VINHAÇA DE CANA-DE-
AÇÚCAR



São Carlos - SP

2019

100

1

11 11 11

11 11

11 11



VANESSA CRISTINA DA SILVA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL DE
BACTÉRIAS ANAERÓBIAS TERMÓFILAS PARA OBTENÇÃO DE
HIDROGÊNIO E ETANOL A PARTIR DA VINHAÇA DE CANA-DE-
AÇÚCAR



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. Assoc. Maria Bernadete Amâncio Varesche

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos - SP
2019

Class.	TESE
Cutt.	10.379
Tombo	T203/19
Sysno	2954438

02.08.19

31100213598

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

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

S586i Silva, Vanessa
Isolamento e caracterização nutricional de bactérias anaeróbias termófilas para obtenção de hidrogênio e etanol a partir da vinhaça de cana-de-açúcar / Vanessa Silva; orientadora Maria Bernadete Amâncio Varesche. São Carlos, 2019.

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

1. Hidrogênio. 2. Etanol. 3. Fermentação. 4. Pentoses. 5. Vinhaça de cana-de-açúcar. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

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

Título da tese: "Isolamento e caracterização nutricional de bactérias anaeróbias termófilas para obtenção de hidrogênio e etanol a partir da vinhaça de cana-de-açúcar".

Data da defesa: 07/06/2019.

Comissão Julgadora:

Resultado:

Profa. Associada **Maria Bernadete Amancio Varesche Silva**
(Orientadora)

(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Reprovada

Profa. Dra. **Sandra Imaculada Maintinguer**

(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP - Araraquara)

Aprovada

Prof. Dr. **Guilherme Peixoto**

(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP - Araraquara)

Aprovada

Profa. Dra. **Valéria Reginatto Spiller**

(Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/FFCLRP-USP)

Aprovada

Prof. Dr. **Clovis Wesley Oliveira de Souza**

(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)


Aprovada

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

Prof. Dr. **Eduardo Mario Mendiolo**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

31 07 2019


AGRADECIMENTOS

À Deus e à Virgem Maria, razões de minha existência.

À minha orientadora Maria Bernadete, pela oportunidade, apoio, conselhos, instruções, e por todo aprendizado.

À Isabel Sakamoto, por ser meu braço direito, e por toda a sua dedicação.

À Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa no início de doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento deste projeto de pesquisa.

Às profissionais Janja Adorno, Carol Sabatini, Eloisa Pozzi e Juliana Custódio, por toda amizade, apoio e trabalho dedicados a este projeto.

Ao apoio técnico do Fernando, Seu Rodrigues, Silvana, Sá, Rose e Priscila.

Ao professor Tininho, pela contribuição e toda atenção disposta.

Aos amigos Marcus Vinicius Andrade, Ahmad Fiaz, Kiemi Murata, Clara Faria, Rodrigo Carneiro e Bruno Garcia, pelo companheirismo nestes 5 anos. Eterna gratidão e amizade. Amo vocês.

As meninas da República Maria Groselha, pela família construída.

A equipe de orientados da professora Bernadete, Alejandra Villa, Raíssa Mazarelli, Thaís Macedo, Franciele Camargo, Alana Lima, Jeny Ventura, Henrique Dornelles, Marina Gomes, Carolina Granatto, Fabrício Motteran, Tiago Palladino, Dagoberto Okada, Regiane Ratti, Camila Rabelo, Lais Américo e Juliana Kawanishi pelo convívio agradável, troca de experiências, ajuda, discussões e amizade. Muito obrigada.

Aos amigos Lucas Fuess, Fabrício Moterran e Camila Rabelo que colaboraram com o desenvolver deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, que propuseram um ambiente de trabalho amigável, obrigada pelas conversas e risadas.

Aos professores Marcelo Zaiat, Eugênio Foresti, Marcia Damianovic, Wiclef, Simone Damasceno, e a amiga Valéria Del Nery, pelo convívio e o orgulho em tê-los como companheiros de trabalho.

RESUMO

SILVA, V. **Isolamento e caracterização nutricional de bactérias anaeróbias termófilas para obtenção de hidrogênio e etanol a partir da vinhaça de cana-de-açúcar.** 183 p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

A obtenção de biocombustíveis a partir de resíduos agroindustriais vem sendo um desafio para o novo cenário de biorefinaria. Um dos principais entraves refere-se em utilizar microrganismos capazes de degradar diferentes compostos orgânicos, como pentoses e hexoses. Duas cepas de bactérias anaeróbias e termófilas foram isoladas de consórcio enriquecido de lodo de reator UASB termófilo usado no tratamento de vinhaça de cana de açúcar. Bactéria produtora de etanol e hidrogênio a partir de xilose, *Thermoanaerobacterium calidifontis* VCS1 (99% de similaridade), e bactéria produtora de hidrogênio, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* VCS6 (100% similaridade). Para a cultura VCS1, nas condições de isolamento com 13,3 mmol/L de xilose, pH 7 e 55°C, em meio de cultivo AMM modificado, obteve-se tempo de geração (Tg) e velocidade específica de crescimento (μ) de 9,12 horas e 0,076 h⁻¹, respectivamente, e rendimentos de 0,79 mol H₂/mol xilose e 0,59 mol etanol/ mol de xilose. Para a cultura VCS6, obteve-se Tg de 6,1 horas e μ 0,011 h⁻¹, e rendimento de 2,69 mol-H₂/mol-xilose a partir de 13,3 mmol/L da pentose, meio *T. ethanolicus*, pH 6,8 a 55°C. A principal rota de produção de hidrogênio para VCS6 foi a via acética-butírica, entretanto na ausência de glicose, a cultura pode metabolizar ácido acético e ácido láctico em hidrogênio e ácido butírico. As condições ótimas de cultivo para a cultura *T. calidifontis* VCS1 foi avaliada a partir da análise de delineamento por composto central rotacional, sendo analisadas as variáveis: concentração de xilose (3,6 a 69,5 mmol/L) e pH (5,9 a 8,1). Obteve-se pH ótimo entre 6,8 e 7,4 e 20,0 mmol/L de xilose a 55°C. As variáveis pH e concentração de xilose interferiram significativamente no metabolismo da cultura VCS1, sendo que a produção de hidrogênio foi favorecida em pH 6,2, e a produção de etanol em pH mais alcalino, entre 7,8 e 8,13. Além disso, para 60,0 mmol/L de xilose, a remoção não foi maior que 70%, indicando assim, possível inibição por substrato. Foram realizados ensaios de fermentação em vinhaça de cana-de-açúcar, na condição de cultura pura e bioaugmentação da vinhaça com VCS1 e VCS6. Não se observou significativa produção de metabólitos a partir da vinhaça por VCS1 em condição de cultura pura, provavelmente, as condições nutricionais da vinhaça bruta foram desfavoráveis para o metabolismo dessa bactéria, e alta concentração de matéria orgânica e carboidratos foram inibitórios para a cultura. Para VCS6, obteve-se resultados de produção de metabólitos, tanto para a condição de cultura pura, quanto na condição de bioaugmentação. Observou-se crescimento de VCS6 em elevado teor de matéria orgânica (31,9 g/L de DQO) em vinhaça de cana-de-açúcar. O rendimento em hidrogênio foi considerado significativo em relação ao obtido por consórcios microbianos em reatores com vinhaça, de 1,22 mmol-H₂/g-DQO em cultura pura e 1,03 mmol-H₂/g-DQO em condição de bioaugmentação. Concluiu-se que as culturas VCS1 e VCS6 crescem e consomem eficientemente pentoses e hexoses, com produção hidrogênio e etanol, podendo assim, contribuir para produção de biocombustíveis a partir de vinhaça de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: *Thermoanaerobacterium calidifontis*. Hexoses. Pentoses.

ABSTRACT

SILVA, V. **Isolation and nutritional characterization of thermophilic anaerobic bacteria to obtain hydrogen and ethanol from sugarcane vinasse.** 183 p. Thesis (PhD) - School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2019.

The production of biofuels derived from agro-industrial waste has been a challenge for the new biorefinery scenario. One of the main obstacles relates to using microorganisms capable of degrading different organic compounds, such as pentoses and hexoses. The ethanol and hydrogen-producing bacteria from xylose, *Thermoanaerobacterium calidifontis* VCS1 (99% of similarity), was isolated from the consortium enriched with sludge from thermophilic UASB reactor used in the treatment of sugarcane vinasse. In the isolation conditions with 13.3 mmol/L xylose, at pH 7 and 55°C, in the culture medium AMM modified, doubling time (Dt) and specific growth rate (μ) of 9.12 hours and 0.076 h⁻¹ were obtained, respectively, with yields of 0.79 mol H₂/mol xylose and 0.59 mol ethanol/mol xylose. For the VCS6 culture, doubling time of 6.1 hours, specific growth rate of 0.011 h⁻¹, and yield of 2.69 mol-H₂ / mol-xylose were obtained from 13.3 mmol / L pentose, *T. ethanolicus* medium, pH 6.8 at 55°C. The hydrogen production from VCS6 was the acetic-butyric type fermentation, however in the absence of glucose, the culture can produce hydrogen from acetic acid and lactic acid by fermentation. Based on the analysis of the central composite rotational design, xylose (3.6 to 69.5 mmol/L) and pH (5.9 to 8.1) were evaluated, with pH between 6.8 and 7.4 and 20.0 mmol/L xylose at 55°C, which were the optimum cultivation conditions of the isolated *T. calidifontis* VCS1. A trend in the metabolic flux of the isolated culture VCS1 was observed from the pH variation, and the production of hydrogen was favored at pH 6.2, in contrast, the ethanol production at more alkaline pH, was between 7.8 and 8.13. Furthermore, the xylose removal was not greater than 70% at xylose concentrations greater than 60.0 mmol/L, thus indicating possible inhibition by substrate. Fermentation tests were carried out on sugarcane vinasse, in the condition of pure culture and bioaugmentation of vinasse with VCS1 and VCS6. There was no significant production of metabolites from vinasse by VCS1 in pure culture condition, probably the nutritional conditions of vinasse were unfavorable for the metabolism of this bacterium, and high concentration of organic matter and carbohydrates were inhibitory to the culture. For VCS6, metabolite production results were obtained for the pure culture condition and the bioaugmentation condition. Growth of VCS6 in high organic matter (31.9 g/L COD) was observed in sugarcane vinasse. The hydrogen yield was considered significant in relation to that obtained by microbial consortia in vinasse reactors of 1.22 mmol-H₂ / g-COD in pure culture and 1.03 mmol-H₂ / g-COD in a bioaugmentation condition. It was concluded that the cultures VCS1 and VCS6 grow and consume efficiently pentoses and hexoses, with hydrogen and ethanol production, thus contributing to the production of biofuels from sugar cane vinasse

Keywords: *Thermoanaerobacterium calidifontis*. Hexoses. Pentoses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 Via metabólica de produção de hidrogênio por bactérias anaeróbias termófilas - Via EMP (Embden Meyerhof Parnas)	45
Figura 3.2 Via metabólica de produção de etanol	49
Figura 4.1 Fluxograma experimental	60
Figura 4.2 Fluxograma etapa de reativação do inóculo.....	67
Figura 4.3 Fluxograma da etapa de adaptação em meios de cultivos.....	68
Figura 4.4 Fluxograma da etapa de diluição seriada	69
Figura 4.5 Fluxograma de aumento de escala de diluições seriadas	70
Figura 4.6 Fluxograma da etapa de plaqueamento	72
Figura 4.7 Cinética de crescimento celular das culturas isoladas VCS1 e VCS6	75
Figura 4.8 Características fisiológicas da culturas isoladas	76
Figura 4.9 Fluxograma consumo de substratos	78
Figura 4.10 Fluxograma da etapa de aplicação das culturas isoladas VCS1 e VCS6 em vinhaça de cana-de-açúcar, nas condições de bioaugmentação em vinhaça bruta e cultura pura em vinhaça estéril	81
Figura 4.11 Fluxograma da etapa de consumo de ácido láctico por cultura isolada VCS6	83
Figura 5.1 Porcentagem de metabólitos em função do aumento de volume do reator a partir da diluição 10^{-6} referente a cultura D1 em meio AMM modificado com 6,6 mmol/L de xilose..	87
Figura 5.2 Porcentagem de metabólitos em função do aumento de volume reacional a partir da diluição 10^{-8} referente a cultura D2 em meio <i>T. ethanolicus</i> alimentado com 6,6 mmol/L de xilose.....	88
Figura 5.3 Porcentagem de metabólitos em função do aumento de volume partir da diluição 10^{-6} em D3 em meio <i>Ethanoligenens</i> com 2,92 mmol/L de celobiose.....	89
Figura 5.4 Dendrograma representando a similaridade genética (Correlação de Pearson) para o Domínio Bacteria a partir do perfis de bandas do DGGE.	89
Figura 5.5 Índices de Riqueza em relação a cada etapa de isolamento	90
Figura 5.6 Dendrograma representando a similaridade genética (Correlação de Pearson) para o Domínio Bacteria a partir do perfis de bandas do DGGE.	92
Figura 5.7 – Dendrograma filogenético das culturas isoladas VCS1, VCS2, VCS3, VCS4, VCS5 e VCS6.....	94

Figura 5.8 Microscopia de contraste de fase (a) e microscopia de luz comum (b) de bactérias gram-positivas da cultura VCS1	95
Figura 5.9 Microscopia de contraste de fase de bacilos de <i>Thermoanaerobacterium calidifontis</i>	96
Figura 5.10 Crescimento <i>Thermoanaerobacterium calidifontis</i> VCS1, nas condições de 2,0 g/L (13,3 mmol/L) de xilose, meio AMM modificado, pH 7 e 55°C.....	97
Figura 5.11 Variação temporal de xilose (a), hidrogênio e dióxido de carbono (b) e ácido acético, ácido láctico e etanol (c) por <i>T. calidifontis</i> VCS1 em meio de cultivo AMM modificado, pH 7 e 55°C	99
Figura 5.12 (a) Crescimento celular em diferentes carboidratos e (b) Redução de carboidratos para <i>Thermoanaerobacterium calidifontis</i> VCS1 em pH 7 e 55°C	105
Figura 5.13 Produtos formados por <i>Thermoanaerobacterium calidifontis</i> VCS1 a partir de pentoses e hexoses (1,0 g/L) em pH 7 à 55°C	107
Figura 5.14 Produção de H ₂ , etanol, ácido acético e ácido láctico em reatores em batelada dos ensaios C1, C2, C3, C4, C5 e C6	110
Figura 5.15 Produção de H ₂ , etanol, ácido acético e ácido láctico em reatores em batelada dos ensaios C7, C8, C9 e C10	111
Figura 5.16 Diagramas de Pareto dos efeitos da concentração de xilose e pH inicial para: a) Potencial máximo de produção H ₂ , b) Potencial máximo de produção de etanol, c) Potencial máximo de produção de ácido acético, e d) Potencial máximo de produção de ácido láctico	114
Figura 5.17 Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) em função da concentração de xilose e pH inicial para produção de hidrogênio.....	117
Figura 5.18 Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) em função da concentração de xilose e pH inicial para produção de etanol	118
Figura 5.19 Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) em função da concentração de xilose e pH inicial para produção de ácido láctico.....	119
Figura 5.20 Curvas de contorno em função da degradação de xilose.....	123
Figura 5.21 Sobreposição das respostas de produção de H ₂ , etanol e degradação de xilose a partir das variáveis pH e xilose para cultura isolada VCS1. A área hachurada corresponde a região ótima.....	124
Figura 5.22 Microscopia de contraste de fase (a) e microscopia de luz comum (b) de bactérias gram-positivas da cultura VCS6	125

Figura 5.23 Curva de crescimento da cultura isolada VCS6 em 2,0 g/L (13,3 mmol/L) de xilose, meio <i>T. ethanolicus</i> , pH 6,8 e 55°C.....	126
Figura 5.24 Produtos formados a partir do consumo de xilose (10 mmol/L) para a cultura isolada VCS6 em meio de cultivo <i>T. ethanolicus</i> , pH 6,8 e 55°C.....	128
Figura 5.25 Crescimento celular (a) e consumo de substrato (b) por cultura isolada VCS6 a partir de pentoses e hexoses em pH 7 e 55°C.....	134
Figura 5.26 Produtos formados para acultura isolada VCS6 a partir de pentoses e hexoses (1,0 g/L) em pH 7 e 55°C	135
Figura 5.27 Caracterização da vinhaça de cana-de açúcar bruta e estéril	137
Figura 5.28 Produção de hidrogênio a partir de vinhaça de cana-de-açúcar por auto-fermentação e bioaumentação com VCS1 e VCS6, em pH 7 e 55°C	138
Figura 5.29 Variação temporal de etanol em reatores alimentados com vinhaça a partir por VCS1 e VCS6 em 55°C.....	142
Figura 5.30 Variação temporal de ácido acético em reatores alimentados com vinhaça a partir por VCS1 e VCS6 em 55°C	144
Figura 5.31 Variação temporal de ácido butírico em reatores alimentados com vinhaça a partir por VCS1 e VCS6 em 55°C	146
Figura 5.32 Variação temporal de ácido láctico em reatores alimentados com vinhaça a partir por VCS1 e VCS6 em 55°C	147
Figura 5.33 Variação temporal de glicerol em reatores alimentados com vinhaça a partir por VCS1 e VCS6 em 55°C.....	148
Figura 5.34 Dendrograma representando a similaridade genética (Correlação de Pearson) para o Domínio Bacteria a partir do perfis de bandas do DGGE.....	152
Figura 5.35 Caracterização filogenética do Domínio Bacteria da vinhaça bruta inoculada com VCS1	153
Figura 5.36 Caracterização filogenética do Domínio Bacteria da vinhaça bruta inoculada com VCS6	156
Figura 5.37 Rotas de conversão da vinhaça de cana-de-açúcar bioaumentada com as culturas VCS1 e VCS6.....	158
Figura 5.38 Produção de metabólitos por cultura VCS6 a partir de glicose (1,0 g/L ou 5,2 mmol/L) em meio de cultivo <i>T. ethanolicus</i> , pH 6,8 e 55°C.....	160
Figura 5.39 Metabolismo da cultura VCS6 a partir de glicose e ácido láctico (0,5 g/L cada) em meio de cultivo <i>T. ethanolicus</i> , pH 6,8 e 55°C.....	160

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Produção biológica de hidrogênio a partir de diferentes mecanismos de produção	40
Tabela 3.2 Parâmetros referentes as condições fermentativas para produção de hidrogênio...	43
Tabela 3.3 Presença de bactérias fermentativas anaeróbias e termófilas da classe Clostridia, como precursoras da produção de hidrogênio	47
Tabela 3.4 Presença de bactérias fermentativas anaeróbias e termófilas da classe Clostridia, como precursoras da produção de etanol.....	53
Tabela 4.1 Composição do meio para <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	62
Tabela 4.2 Composição da Solução de Vitaminas	62
Tabela 4.3 Composição da Solução de minerais modificada por Wolfe.....	63
Tabela 4.4 Composição do meio AMM Modificado.....	63
Tabela 4.5 Composição do Meio A.....	64
Tabela 4.6 Composição do Meio B.....	64
Tabela 4.7 Composição do Meio D - Solução de Minerais traços modificado	64
Tabela 4.8 Composição do Meio E - Solução de Vitaminas DSMZ 141	65
Tabela 4.9 Composição do Meio <i>Ethanoligenens</i> DSMZ 1057.....	65
Tabela 4.10 Planejamento experimental do efeito da concentração de xilose e pH na formação de produtos finais para cultura isolada VCS1	79
Tabela 5.1 Comparação de produção de metabólitos entre consórcio microbiano enriquecido por Silva et al (2018) e reativação do consórcio	85
Tabela 5.2 Parâmetros ajustados via Gompertz para os produtos formados a partir de xilose (2,0 g/L) em meio AMM modificado, pH 7, 55°C por <i>T. calidifontis</i> VCS1.....	101
Tabela 5.3 Balanço final de <i>T. calidifontis</i> VCS1 em meio AMM modificado, pH 7 à 55°C	102
Tabela 5.4 Delineamento por Composto Central da Concentração de xilose e pH para o Potencial Máximo de Produção (<i>P</i>) e ácidos orgânicos	109
Tabela 5.5 Análise de variância dos efeitos estimados da concentração de xilose e pH inicial para produção de H ₂ , etanol ácido acético e ácido láctico.....	115
Tabela 5.6 ANOVA de modelos propostos para potencial máximo de produção molar de H ₂ , etanol, ácido acético e ácido láctico	116
Tabela 5.7 Delineamento por Composto Central da conversão de xilose pela cultura isolada VCS1	120

Tabela 5.8 Análise de variância dos efeitos estimados da concentração de xilose e pH na degradação de xilose	122
Tabela 5.9 ANOVA de modelo proposto para degradação de xilose	122
Tabela 5.10 Parâmetros ajustados via Gompertz para os produtos formados a partir de xilose (1,5 g/L) em meio <i>T. ethanolicus</i> , pH 6,8 e 55°C para a cultura isolada VCS6	129
Tabela 5.11 Balanço da fermentação de xilose (1,5 g/L ou 10,0 mmol/L) por cultura isolada VCS6 em meio <i>T. ethanolicus</i> , pH 6,8 e 55°C	131
Tabela 5.12 Rendimento em hidrogênio a partir de bactérias anaeróbias e termófilas da espécie <i>T. thermosaccharolyticum</i>	132
Tabela 5.13 Parâmetros ajustados ao modelo de Gompertz para produção de hidrogênio pela cultura isolada de VCS1 e VCS6 a partir de vinhaça em meio <i>T. ethanolicus</i> , pH 6,8 e 55°C	139
Tabela 5.14 Balanço de massa referente a auto-fermentação e bioaumentação da vinhaça bruta, e da fermentação por cultura pura de VCS1 e VCS6, em condições anaeróbias, pH 7 e 55°C	150

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta G^{0'}$	Energia livre de Gibbs.
16S rRNA	RNA ribossomal subunidade 16S
5-HMF	5-hidroxiacetilfurfural
A1	Consórcio R1 adaptado em meio AMM modificado
A2	Consórcio R1 adaptado em meio <i>T. ethanolicus</i>
A3	Consórcio R1 adaptado em meio <i>Ethanoligenens</i>
ABNT	Associação brasileira de normas técnicas
Acetil-CoA	Acetil Coenzima A
Adh	Álcool desidrogenase
ADP -	Adenosina difosfato
Aldh	Aldeído desidrogenase
anSBBR	Reator anaeróbico operado em batelada e alimentado em sequenciamento com biomassa imobilizada
APBR	Reator acidogênio
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
atm	Atmosfera
C	Ponto central
CCR	<i>Carbon Catabolite Repression</i>
CH ₄	Metano
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO ₂	Dióxido de carbono
D1	Cultura obtida na etapa de diluição mantendo as condições de cultivo A1
D2	Cultura obtida na etapa de diluição mantendo as condições de cultivo A2
D3	Cultura obtida na etapa de diluição mantendo as condições de cultivo A3
DCC	Desenho de composto central
DGGE	<i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i>
DQO	Demanda química de oxigênio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSMZ	<i>German Collection of micro-organism and cell cultures</i>
ED	Via metabólica Entner-Doudoroff

EMP	Via metabólica Embden Meyerhof Parnas
EtOH	Etanol
EUA	Estados Unidos da América
Fd(ox)	Ferredoxina oxidada
Fd(red)	Ferredoxina reduzida
FID	Detector de ionização de chama
FNOR	Ferredoxina NAD(P) oxidoredutase
H ⁺	Prótons de hidrogênio
<i>H</i>	Produção acumulada de H ₂
H ₂	Hidrogênio
H ₂ O	Água
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPr	Histidina
K	Temperatura de Kelvin
Ldh	Lactato desidrogenase
<L D	Inferior ao limite de detecção
N ₂	Nitrogênio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
NBR	Normas brasileiras
NFOR	NADH ferredoxina oxidoredutase
NREL	<i>National Renewable Energy Laboratory</i>
O ₂	Oxigênio
<i>P</i>	Potencial máximo de produção
PBS	Tampão fosfato salino
Pi	Fosfato inorgânico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDC	Piruvato descarboxilase
PFK	Fosfofrutoquinase
PFL	Piruvato formato liase
PFOR	Piruvato Ferredoxina oxidoredutase

pH	Potencial hidrogeniônico
q.s.p	Quantidade suficiente para
R1	Consórcio microbiano reativado em xilose
R2	Consórcio microbiano reativado em celobiose
RFA	<i>Renewable Fuels Association</i>
RFL	Reator de leito fluidificado
R_m	Velocidade máxima de produção
RNA _r	Ácido ribonucleico ribossomal
rpm	Rotação por minuto
sp.	Espécie
SP	São Paulo
ST	Sólidos totais
t	Tempo
T	Temperatura
TAE	Tris Acetato EDTA
TDC	Detector de condutividade térmica
TDH	Tempo de detenção hidráulica
UASB	Reator Anaeróbico de Fluxo Ascendente com Manta de Lodo
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
VCS1	Cultura isolada a partir da cultura D1
VCS2	Cultura isolada a partir da cultura D1
VCS3	Cultura isolada a partir da cultura D2
VCS4	Cultura isolada a partir da cultura D3
VCS5	Cultura isolada a partir da cultura D3
VCS6	Cultura isolada a partir da cultura D3
α	Significância
λ	Tempo de início da fermentação

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	graus Celsius
µl	microlitro
abs	absorbância
d	dia
g DQO /L	grama de demanda química de oxigênio por litro
g /L	grama por litro
h	hora
kg	quilograma
kg DQO m⁻³ d⁻¹	quilograma de DQO por metro cúbico por dia
kJ g⁻¹	quilojoule por grama
L	litro
mg DQO / L	miligrama de DQO por litro
mg /L	miligrama por litro
min	minuto
MJ/Kg	Megajoule por quilograma
ml	mililitro
mM	milimolar
mm	milímetro
mmol /g DQO	milimol por grama de DQO
mmol /L	milimol por litro
mmol/L.h	milimol por litro por hora
mol / mol	mol por mol
N	normal
nm	nanômetro
N ml /g DQO	mililitro por grama de DQO nas CNTP

Sumário

1	INTRODUÇÃO	29
2	OBJETIVO GERAL	33
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	34
	3.1 Produção biológica de hidrogênio	34
	3.2 Produção biológica de etanol	48
	3.3 Vinhaça	54
	3.4 Considerações do autor	58
4	MATERIAL E MÉTODOS	60
	4.1 Inóculo	61
	4.2 Meios de cultivo.....	61
	4.3 Reativação do Inóculo	66
	4.4 Isolamento de bactérias fermentativas.....	67
	4.4.1 Adaptação ao meio de cultura.....	67
	4.4.2 Diluição seriada.....	68
	4.4.3 Plaqueamento	70
	4.5 Identificação filogenética.....	73
	4.5.1 Extração de DNA	73
	4.5.2 PCR e DGGE	73
	4.5.3 Sequenciamento	74
	4.6 Caracterização morfológica e fisiológica.....	74
	4.6.1 Cinética de Crescimento Celular.....	74
	4.6.2 Consumo de xilose e cinética de produção de metabólito	76
	4.6.3 Degradação de substratos.....	77
	4.6.4 Planejamento Experimental	78
	4.6.5 Aplicação na vinhaça	80

4.6.6	Consumo de ácido láctico.....	82
4.7	Análises cromatográficas	83
4.7.1	Determinação de ácidos orgânicos voláteis e álcoois.....	83
4.7.2	Determinação do biogás	84
4.8	Análises físico-químicas.....	84
4.9	Ajuste ao modelo de Gompertz e avaliação dos métodos estatísticos	84
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
5.1	Reativação do inóculo	85
5.2	Isolamento	86
5.2.1	Adaptação ao meio de cultivo e diluição seriada	86
5.2.2	Plaqueamento por semeadura	91
5.2.3	Sequenciamento.....	92
5.3	Características Morfológicas e fisiológicas: Cultura isolada VCS1 – <i>Thermoanaerobacterium calidifontis</i>	95
5.3.1	Morfologia.....	95
5.3.2	Cinética de crescimento.....	96
5.3.3	Produção de metabólitos.....	98
5.3.4	Consumo de hexoses e pentoses.....	103
5.4	Otimização das condições de cultivo em concentração de xilose (mmol/L) e pH 107	
5.4.1	Produção de metabólitos.....	107
5.4.2	Remoção de xilose.....	119
5.5	Características morfológicas e fisiológicas de <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> VCS6	125
5.5.1	Morfologia.....	125
5.5.2	Cinética de crescimento.....	125
5.5.3	Produção de metabólitos.....	127
5.5.4	Consumo de hexoses e pentoses.....	133

5.6	Fermentação e bioaugmentação das culturas isoladas VCS1 e VCS6 em vinhaça de cana-de-açúcar	136
5.6.1	Caracterização da vinhaça de cana-de-açúcar.....	136
5.6.2	Produção de Hidrogênio.....	137
5.6.3	Produção de etanol e ácidos orgânicos	141
5.6.4	Balanço de massa	149
5.6.5	Análise da comunidade microbiana	151
5.6.6	Caracterização filogenética das condições de bio-aumentação da vinhaça de cana-de-açúcar por VCS1 e VCS6	152
5.7	Produção de hidrogênio a partir de ácido láctico por cultura VCS6.....	159
6	CONSIDERAÇÕES ÀS HIPÓTESES	162
7	CONCLUSÕES	164
8	RECOMENDAÇÕES	165
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	166

1 INTRODUÇÃO

A produção de biocombustíveis a partir de recursos renováveis e resíduos vêm se tornando uma alternativa a ser considerada para os problemas econômicos e ambientais. Em países em desenvolvimento, a cana-de-açúcar é uma fonte de energia renovável com boa relação custo-benefício obtida através da produção de etanol, entretanto, esse processo gera resíduos que estão sendo destinados ao solo e água dos rios, agravando ainda mais a disponibilidade desses outros recursos naturais (Fuess et al., 2017; Fito et al., 2019).

A vinhaça, termo utilizado para designar a água residuária do processo de destilação do álcool, é considerada um dos principais poluidores (Wilkie et al., 2000). No Brasil, a produção de etanol a partir da cana de açúcar gera cerca de 11,5 litros de vinhaça por litro de etanol produzido, com carga orgânica potencial de 288 gramas de DQO por litro de etanol. Este resíduo é aplicado como fertilizante nas lavouras de cana-de-açúcar devido as concentrações elevadas de nitrogênio, fósforo, potássio e micronutrientes. Entretanto, a aplicação sem critérios de dosagem de vinhaça ao solo pode causar desequilíbrio de nutrientes, que podem ser lixiviados, contaminando assim as águas subterrâneas (Elia Neto, 2016; Fuess et al., 2017).

Uma alternativa englobando o conceito de biorefinaria é utilizar os açúcares residuais presentes no bagaço de cana-de-açúcar, destacando a xilose. Etapas como pré-tratamento, hidrólise e fermentação são fundamentais para viabilizar o processo, portanto, otimizar o processo de fermentação a partir de xilose auxilia para maior eficiência de produção de biocombustíveis a partir desses resíduos (Rabelo et al., 2018; Ren et al., 2016; Soares et al., 2017).

A produção de biocombustíveis com enfoque em hidrogênio justifica-se ao seu elevado poder de combustão. O ponto de ebulição do hidrogênio é 22,28 K, gerando energia de combustão de 120 MJ/kg, valor este superior a combustíveis fósseis como a gasolina (43 MJ/kg) e o gás natural (47 MJ/kg). Além de ser considerada uma energia limpa por liberar água e quantidades insignificantes de óxidos de nitrogênio durante sua combustão (Sarma et al., 2015).

Ressalta-se a produção biológica de hidrogênio por fermentação biológica, uma vez que uma ampla variedade de microrganismos podem produzir hidrogênio utilizando como fonte de carbono diversos resíduos orgânicos (Kapdan e Kargi, 2006). No entanto, durante a produção de hidrogênio pelo processo de fermentação, apenas 30-40% do substrato é utilizado na produção de hidrogênio e os restantes 60-70% são convertidos em vários outros metabólitos (Dugmore et al., 2017).

Etanol, ácido butírico e 1,3-propanodiol são alguns metabólitos comercialmente atraentes produzidos durante a produção de hidrogênio. Ácido acético, ácido succínico, ácido láctico e ácido propiônico são alguns outros metabólitos acumulados durante a fermentação de hidrogênio (Sarma et al., 2015).

A fermentação de fontes de carbono residuais para obtenção de biocombustíveis por culturas puras é vantajosa em relação a fermentação por consórcios microbianos, uma vez que os açúcares são limitados, as condições de cultivo restritas, e busca-se a melhor eficiência no processo de conversão do resíduo em produtos de agregado valor econômico. Consequente, o emprego de consórcios microbianos pode não favorecer as relações simbióticas de protocooperação entre os organismos, sugerindo competição por nutrientes ao invés de conversão cooperativa de metabólitos (Packard et al., 2019).

Sendo assim, uma das abordagens mais eficazes para produção biológica de biocombustíveis é isolar bactérias capazes de converter matéria orgânica em hidrogênio e /ou etanol. Várias estirpes têm sido isoladas e estudadas para a produção de hidrogênio como *Clostridium butyricum* CGS5 (Chen et al., 2005), *Clostridium beijerinckii* PS-3 (Noparat et al., 2011) e *Clostridium butyricum* INET1 (Yin and Wang, 2017) e também para a produção de etanol como *Zymomonas mobilis* ZM4 (Díaz and Willis, 2019). Algumas delas, como por exemplo, *Clostridium* sp. URNW (Ramachandran et al., 2011) e *Ethanoligenens harbinense* (Zhao et al., 2017) em condições fermentativas podem produzir simultaneamente etanol e hidrogênio.

Bactérias semelhantes a *Thermoanaerobacterium*, pertencente à classe Clostridia, já foram relacionadas com produção de hidrogênio em reatores anaeróbios para o tratamento de vinhaça (Ferraz et al., 2016; Fuess et al., 2018a; Lazaro et al., 2014) e também em reatores de produção de hidrogênio a partir da biomassa lignocelulósica (Ratti et al., 2015b). *Thermoanaerobacterium* são bactérias termófilas com ótimo crescimento entre 55 e 70°C, anaeróbias e capazes de degradar diversas fontes de carbono e produzir ácidos orgânicos, etanol e hidrogênio (Onyenwoke and Wiegel, 2009). É capaz também de degradar o polissacarídeo xilana (Khamtib e Reungsang, 2012; Ren et al., 2008; Saripan e Reungsang, 2013), principal componente da hemicelulose presente na biomassa lignocelulósica, evidenciando assim, a possibilidade de sua aplicação na degradação da fração lignocelulósica desse resíduo.

Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum foi isolada a partir de sedimentos de fonte termal por Khamtib e Reungsang (2012). Os autores caracterizaram esta espécie fermentativa e concluíram que o substrato xilose (66,6 mmol/L) foi a fonte de carbono preferida

que resultou em produção de 6,74 mmol de hidrogênio. Saripan e Reungsang (2013) isolaram *T. thermosaccharolyticum* a partir de esterco de elefante, e obtiveram a partir de xilose (100 mmol/L) 80,7 mmol de hidrogênio. Silva et al. (2018) identificaram *T. thermosaccharolyticum* em reatores de produção de etanol (12,81 mmol/L) com consórcio bacteriano obtido de lodo de reator de tratamento de vinhaça como inóculo e xilose (8,06 mmol/L) como fonte de carbono.

Além da estirpe utilizada como inóculo para a obtenção de biocombustíveis, há fatores físico-químicos que podem influenciar a fermentação da xilose e outros substratos em hidrogênio e etanol. Maintinguer et al., (2011) estudaram a produção de hidrogênio a partir de diferentes concentrações de xilose (3,9, 8,6, 11,9 e 23,9 mmol/L) por co-cultura de *Clostridium* e *Klebsiella*. Os autores relataram que o rendimento de produção de hidrogênio aumentou de 0,2 para 0,8 mol H₂/mol de xilose e a produção de etanol de 2,0 para 3,12 mmol/L com o aumento da concentração de xilose de 3,9 para 23,9 mmol/L.

Lazaro et al., (2014) avaliaram a produção de hidrogênio por consórcio microbiano e diferentes concentrações de vinhaça de cana-de-açúcar como substrato (de 2 a 12g DQO/L) sob diferentes temperaturas (37 e 55 °C). Foi relatado que, à 37°C, o aumento na concentração de vinhaça resultou em aumento da produção de hidrogênio de 4,3 a 28,4 mmol; enquanto que à 55°C, a produção de hidrogênio aumentou somente de 5,0 para 6,7 mmol. Assim, pode-se observar os efeitos combinados dos fatores temperatura e concentração de substrato sobre a produção fermentativa de hidrogênio.

O efeito mútuo de muitos fatores pode ser otimizado por metodologias estatísticas que estabelecem relação entre respostas (como produção de metabólitos) e fatores físico-químicos (como concentração de substrato e pH), simultaneamente avaliados (Hallenbeck e Ghosh, 2009). Rabelo et al., (2018) avaliaram o efeito mútuo da concentração de substrato e pH sobre a bioconversão do bagaço de cana-de-açúcar por consórcio bacteriano misto. Os autores utilizaram metodologia de superfície de resposta para analisar e concluíram que as melhores condições para produção de hidrogênio (23,10 mmol/L) foram 7,0 g/L de substrato e pH 7,2.

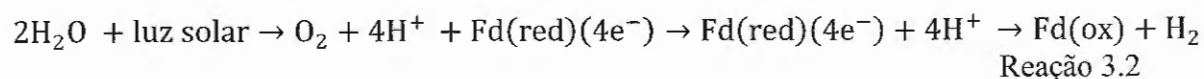
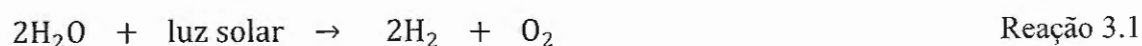
Dessa forma, o presente trabalho concentrou-se no isolamento de bactérias degradadoras de xilose a partir de um consórcio termofílico utilizado para o tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar e na avaliação de suas atividades fermentativas. Os fatores físico-químicos que afetam a fermentação da xilose pela cultura isolada foram estudados a partir de metodológicas estatísticas visando a produção otimizada de hidrogênio e/ou etanol. Por fim, aplicou-se as culturas isoladas na vinhaça de cana-de-açúcar e constatou a capacidade de produção de

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produção biológica de hidrogênio

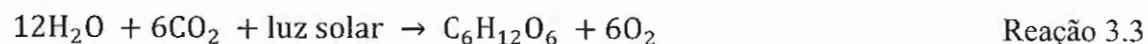
A produção de hidrogênio ocorre por três principais vias a saber: eletrólise da água, reforma termocatalítica de compostos orgânicos, e por processos biológicos. A obtenção de hidrogênio por via biológica pode ocorrer por meio de processos fotossintéticos e fermentativos.

A produção biológica de hidrogênio por via fotossintética direta ocorre devido ao mecanismo genético, enzimático e metabólico de algas verdes. A reação 3.1 simplifica esse processo, uma vez que na fotossíntese, as algas verdes oxidam H_2O e liberam O_2 , e ao captar a luz solar e converter em energia química, reduzem ferredoxinas ($Fd_{(red)}$) que liberam elétrons, e a partir da ativação de enzimas hidrogenases, combinam com prótons H^+ , formando e liberando moléculas de H_2 (Reação 3.2) (Azwar et al., 2014; Eroglu e Melis, 2016).



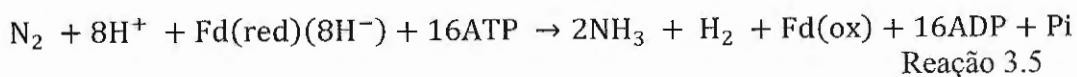
As principais espécies de algas verdes utilizadas para a produção de biohidrogênio são *Chlamydomonas reinthritti*, *Chlorella* sp. e *Scenedesmus obtiguus*, entretanto, o cultivo dessas algas é um dos principais fatores que restringem sua aplicação para produção de energia, porque o oxigênio produzido fotossinteticamente inibe fortemente a enzima hidrogenase (Batyrova e Hallenbeck, 2017; Zhan et al., 2017). Estudos relacionados a engenharia genética atuam em modificar espécies de *Chlamydomonas reinthritti*, de forma a diminuir a atividade fotossintética das células mutantes, com diminuição da produção de oxigênio, favorecendo assim, a atividade da enzima hidrogenase por um longo período de tempo, e acúmulo de H_2 em períodos de luminosidade. Batyrova e Hallenbeck, (2017) obtiveram um aumento de produção de H_2 de 4,5 vezes com a cepa *Chlamydomonas reinhardtii* cy6Nac2.49 em relação a cepa selvagem, sendo resultado de 0,9 mmol/L e 0,3 mmol/L, respectivamente, com intensidade luminosa de 10W.m².

Outro processo biológico de produção de H₂ refere-se a biofotólise indireta, no qual cianobactérias são capazes de produzir hidrogênio utilizando N₂, CO₂ e H₂O como doadores de elétrons. Algumas espécies de cianobactérias (*Synechococcus* sp., *Aphanocapsa* sp.) convertem energia luminosa em hidrogênio sem fixação de nitrogênio, por processo de produção de glicose a partir da fotossíntese (Reação 3.3), seguida de fermentação aeróbia (Reação 3.4) (Azwar et al., 2014; Krishnan et al., 2016; Levin et al., 2004).



Entretanto, o crescimento de cianobactérias está sujeito a variações contínuas na disponibilidade de carbono inorgânico dissolvido. Para acomodar as diferenças de estado estacionário e transiente na disponibilidade de carbono, as cianobactérias desenvolveram vários mecanismos adaptativos para regular a captação de CO₂ e / ou taxa de fixação de carbono, que são coletivamente denominados mecanismos de concentração de carbono (CCM). Krishnan et al., (2016) em seus estudos com *Synechococcus* sp. PCC 7002, observaram que com a eliminação do gene que regula a CCM, remodela-se o metabolismo fermentativo do carbono, utilizando a enzima hidrogenase a fim de manter a homeostase redox. Desta forma, obteve-se aumento de fluxo (30–50%) tanto na respiração aeróbia de O₂ quanto na evolução anaeróbica de H₂ a partir da cianobacteria geneticamente modificada, *Synechococcus* sp. PCC 7002. Entretanto, em termos de aplicabilidade, o rendimento de H₂ por *Synechococcus* sp. PCC 7002 é considerado reduzido, pois corresponde a apenas 8,9% em relação ao rendimento teórico, sendo de 0,87 mol H₂ por mol glicose.

Na biofotólise indireta, também destaca-se a produção de H₂ a partir da fixação de nitrogênio por alguns grupos de cianobactérias, tais como *Anabaena* sp. e *Plectonema boryanum*, no qual o nitrogênio tem uma função importante, uma vez que em condições anaeróbicas, enzimas nitrogenases fixam N₂, oxidam 8 mols de ferredoxina reduzida (Fd_(red)), hidrolisam 16 mols de adenina trifosfato (ATP) para adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico (Pi), produzindo 1 mol de H₂ e 2 mols de amônia para cada mol de N₂ reduzido (Reação 3.5). Portanto, as cianobactérias catalisam a produção de H₂ como um subproduto da redução de nitrogênio para amônia (Azwar et al., 2014; Huesemann et al., 2010; Levin et al., 2004; Yodsang et al., 2018).



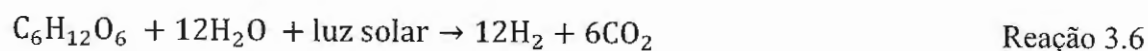
Yodsang et al., (2018) estudaram cinco espécies de cianobactérias filamentosas, nomeadamente *Calothrix elenkinii*, *Fischerella muscicola*, *Nostoc calcicola*, *Scytonema bohneri* e *Tolypothrix distorta*, com atividade enzimática de nitrogenase, e potencial em produção de hidrogênio. Os autores concluíram que a condição mais favorável para a produção máxima de hidrogênio foi alcançada quando as células de *T. Distorta* foram adaptadas por 24 h sob condições de fixação de nitrogênio com adição de 0,1% de glicose que resultou em produção de hidrogênio de 10,9 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ (Chl) h^{-1} (Tabela 3.1). Consequente, os autores ressaltam que através de técnicas de engenharia genética que direcionam o fluxo de elétrons para hidrogenase, pode-se potencializar a produção de hidrogênio dentre essas espécies de cianobactérias.

A produção de hidrogênio por via fotossintética direta ou indireta é considerada sustentável em termos de utilização de H_2O como recurso renovável e consumo de CO_2 , considerando este um poluente atmosférico. Entretanto, alguns entraves dificultam este processo, uma vez que, na fotossíntese libera-se oxigênio, e este pode inibir a atividade das enzimas nitrogenase e hidrogenase e ainda são necessárias melhorias adicionais à técnicas de engenharia genética para que as cianobactérias se tornem competitivas em relação a microrganismos heterotróficos para a bioprodução de compostos de valor agregado (Santos-Merino et al., 2019).

Desta forma, vê-se mais vantajosa a produção de hidrogênio por bactérias anaeróbias, uma vez que não requerem oxigênio e utilizam substratos orgânicos, abrangendo assim, a possibilidade de produzir hidrogênio a partir de resíduos. Destaca-se para esses casos, os processos de foto-fermentação e fermentação escura (Kapdan e Kargi, 2006).

A foto-fermentação consiste na conversão fermentativa de substratos orgânicos à hidrogênio e CO_2 , por bactérias fotossintéticas, que utilizam a energia obtida da luz solar (Reação 3.6). Bactérias púrpuras não-sulfurosas são as principais bactérias fotossintetizantes capazes de degradar ácidos orgânicos em hidrogênio. Estas bactérias utilizam a enzima nitrogenase para fixação de nitrogênio e redução à amônia, seguido da obtenção de energia através da captação da luz solar para gerar ATP e reduzir a ferredoxina, estes são direcionados aos prótons de hidrogênio via nitrogenase, produzindo assim, hidrogênio molecular. Estas bactérias são incapazes de obter elétrons da água, utilizando assim, compostos orgânicos.

Destacam-se 4 principais espécies, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodobacter capsulatus* e *Rhodospirillum rubrum* (Azwar et al., 2014).



Portanto, na foto-fermentação há a possibilidade de converter substratos orgânicos de águas residuárias em hidrogênio. Al-Mohammedawi et al., (2019) avaliaram os impactos do estágio de pré-tratamento das cascas de banana na produção de hidrogênio por fotofermentação a partir de *Rhodobacter sphaeroides* 158 DSM utilizando água residuária de cervejaria em biorreator em batelada. A temperatura dos experimentos foi mantida constante em torno de 30°C e a intensidade da luz foi de 126 W.m², que foi fornecida por uma lâmpada de halogênio de 150 W. Os autores obtiveram produção de 408,33 ml de H₂ por litro de efluente, e concluíram que o pré-tratamento da água residuária de cervejaria com casca de banana, possibilitou um aumento de 2,7 vezes a mais na produção de H₂ em relação ao efluente sem tratamento, além de diminuir a concentração de amônia e aumentar a relação C /N.

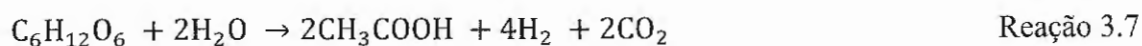
Entretanto, a natureza do uso de energia luminosa para produção de biohidrogênio possui severas restrições, sendo flutuações na intensidade, período e local da luz solar, baixa eficiência de conversão, despesas com construção e operação de reatores, encarecendo assim, os custos de produção por unidade de hidrogênio (Hallenbeck, 2013; Hallenbeck e Benemann, 2002). Desta forma, melhores resultados para conversão de substratos orgânicos por bactérias fotossintéticas são obtidos em processos de dois estágios, sendo foto-fermentação seguido de fermentação escura (Azwar et al., 2014).

Kim e Kim, (2013) propuseram três estágios de fermentação para resíduos orgânicos, a partir da cianobactéria *R. sphaeroides* KD131 e para produção de CH₄, utilizou-se consórcio microbiano de digestor anaeróbio de tratamento de efluentes. Os ensaios seguiram a sequência de autofermentação do substrato em ácido láctico, a partir de bactérias lácticas fermentativas autóctone, seguido do estágio de foto-fermentação do efluente láctico, com produção de H₂ por *R. sphaeroides* KD131 em intensidade luminosa se 110W.m², e por fim, aplicação de digestão anaeróbia para formação de CH₄. Os autores obtiveram rendimentos 8,35 mols H₂ / mol de hexose, o valor mais elevado já relatado a partir de resíduos orgânicos.

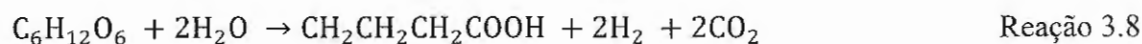
A fermentação escura, termo empregado em inglês *Dark-fermentation*, consiste na fermentação de substratos orgânicos por bactérias anaeróbias sem a necessidade da captação da

energia luminosa. Esta característica confere vantagens em relação aos demais processos biológicos para produção de hidrogênio, uma vez que, torna-se possível obter H₂ continuamente na ausência de luz, além de altas taxas de produção, baixa demanda de energia externa e utilização de resíduos orgânicos como substrato (Azwar et al., 2014).

A produção de hidrogênio via fermentação ocorre por duas vias principais, do ácido acético e ácido butírico, e em temperaturas mesófilas (25-40°C) (Kanchanasuta e Prommeenate, 2016; Li et al., 2018; Maintinguer et al., 2016), termófilas (65-80°C) e hipertermófilas (>80°C) (Boileau et al., 2016; Qiu et al., 2011). Quando o produto final da fermentação é o ácido acético, tem-se rendimento teórico de 4 mols de H₂ por mol de glicose (reação 3.7) (Shen et al., 2013; Vrije et al., 2007).



Quando o produto final da fermentação é o ácido butírico tem-se 2 mols de H₂ por mol de glicose (Reação 3.8).



Assim, a via metabólica do ácido acético apresenta os maiores rendimentos teóricos de hidrogênio, entretanto há poucos relatos de microrganismos que realizam apenas essa rota de produção de hidrogênio. Vrije et al., (2007) em seus estudos com *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, bactéria hipertermófila, que metaboliza glicose principalmente em acetato e hidrogênio pela via Embden–Meyerhof (EM), observaram rendimento de hidrogênio de 3,6 mol por mol de glicose (90% do rendimento máximo teórico). Estudos recentes avaliaram que bactérias do gênero *Caldicellulosiruptor* sp. metabolizam preferencialmente pentoses ao invés de glicose, e também podem produzir etanol, sendo assim, um gênero promissor para produção biológica de combustíveis a partir de resíduos orgânicos e lignocelulósicos (Björkmalm et al., 2018; Sander et al., 2019).

Rendimentos consideráveis de H₂ também são observados a partir da via acetato / butirato. Destaca-se bactérias fermentativas do gênero *Thermoanaerobacterium*, por serem bactérias que metabolizam uma ampla variedade de pentoses e hexoses com produção de H₂. Ren et al., (2008) observaram eficiência na fermentação escura de *T. thermosaccharolyticum* W16, na produção de hidrogênio a partir de glicose, xilose e na disponibilidade dos dois açúcares

em conjunto. Os rendimentos em hidrogênio foram de 2,4 mol/mol de glicose e 2,19 mol/mol de xilose.

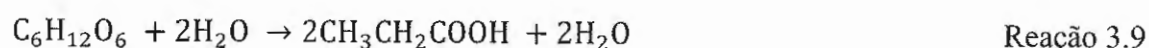
Zhang et al., (2019) avaliaram a produção de hidrogênio a partir de hidrolisado de palha de milho, nas condições de bioaugmentação de cultura de *T. thermosaccharolyticum* W16, em diferentes consórcios microbianos (lodo de palha de milho, esterco de vaca, e lodo de digestão anaeróbia). Os resultados indicaram que com a bioaugmentação por *T. thermoanaerobacterium* W16 (5% do total microbiano), resultou-se em aumento considerável na produção de hidrogênio em todas as condições, sendo de 8,78 para 9,90 mmol H₂/g-açúcar consumido para condições de cultivo com lodo de palha de milho, de 8,18 para 8,42 mmol H₂/g-açúcar consumido para esterco de vaca, e de 8,55 para 9,17 mmol H₂/g de açúcar consumido para lodo de digestão anaeróbia.

A tabela 3.1 sintetiza os mecanismos de produção biológica de hidrogênio, e ressalta a vantagem da fermentação.

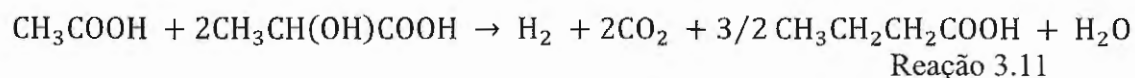
Tabela 3.1 Produção biológica de hidrogênio a partir de diferentes mecanismos de produção

Via	Microrganismo	Substrato	Produção de H ₂	Referencia
Biofotólise direta	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> cy6Nac2.49	Luz e CO ₂	0,3 mmol/L 0,9 mmol/L	Batyrova e Hallenbeck (2017)
Biofotólise indireta	<i>Synechococcus</i> sp. <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	Luz, CO ₂ e H ₂ O	0,18 mol/mol glicose 0,87 mol/mol glicose	Krishnan et al (2016)
Biofotólise indireta	<i>Tolypothrix distorta</i>	Luz e glicose	10,9 umol (mg Chl) ⁻¹ .h ⁻¹	Yodsang et al (2018)
Foto-fermentação	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 158 DSM	Luz e efluente de cervejaria	408.33 mL H ₂ L ⁻¹ efluente	Al-Mohammedawi et al (2019)
Fermentação láctica, foto-fermentação e digestão anaeróbia	<i>R. sphaeroides</i> KD131 e lodo de digestor de águas residuárias	Luz, resíduos orgânicos	8,35 mol H ₂ / mol de hexose	Kim e Kim (2013)
Fermentação via acetato	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	Glicose	3,6 mol / mol glicose	De Vrije et al (2007)
Fermentação via acetato/butirato	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> W16	Glicose e Xilose	2,42 mol H ₂ . mol ⁻¹ -glicose 2,19 mol H ₂ . mol ⁻¹ -xilose	Ren et al (2008)

Outras rotas fermentativas, tais como as que direcionam para formação de ácido propiônico, láctico e etanol, possibilitam o consumo ou reduzido rendimento na produção de hidrogênio. Na rota metabólica de produção de ácido propiônico tem-se o consumo de 1 mol de H₂ para cada 1 mol de ácido propiônico formado (reação 3.9). Para a produção de etanol, não há consumo nem produção de hidrogênio (Reação 3.10), entretanto, os produtos finais reduzidos, como etanol e butanol, contêm átomos de H adicionais que não estão presentes nos ácidos correspondentes, resultando assim, rendimentos menores de H₂ (Hawkes et al., 2002).



Matsumoto e Nishimura, (2007) constataram produção de hidrogênio a partir de mistura de ácido láctico (0,5 g/L) e ácido acético (2,0 g/L) utilizando *Clostridium diolis* a 40°C em pH inicial de 6,8 por 48 horas. Os autores observaram no final da fermentação, acúmulo de ácido butírico, hidrogênio e CO₂, sugerindo assim uma nova rota de produção de hidrogênio a partir do ácido láctico (reação 3.11).



Detman et al., (2019) também observaram essa rota metabólica tanto em consórcios microbianos como em cultura pura de *Clostridium butyricum* em fermentação em batelada, e associaram este processo a utilização de complexos de flavoproteína de transferência de elétrons específicos para oxidação de lactato e formação de butirato.

Especificidade de bactérias fermentativas e condições ambientais definem a rota metabólica e os produtos finais formados (Sinha e Pandey, 2011). Parâmetros como pH, tempo de detenção hidráulico, pressão parcial de hidrogênio, nutrientes e concentração de substrato, interferem nos rendimentos de hidrogênio (Tabela 3.2) (Cao et al., 2010; Djalma et al., 2014; Kumari e Das, 2016; Lazaro et al., 2014; Rabelo et al., 2018). Um dos parâmetros mais importantes é o pH, devido a sua influência significativa na ativação da enzima hidrogenase (Azwar et al., 2014). O ferro também é um componente importante da enzima hidrogenase, sendo que a sua limitação resulta em menor atividade enzimática. A pressão parcial de

hidrogênio na fase líquida também afeta a produção de H_2 , uma vez que, as bactérias oxidam as ferredoxinas reduzidas e as coenzimas transportadoras de hidrogênio, e essas reações são menos favoráveis à medida que a concentração de H_2 no líquido aumenta (Hawkes et al., 2002).

Cao et al., (2010) otimizaram as condições de cultivo visando potencializar a produção de hidrogênio a partir de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolytium* W16 a partir de ferramentas estatísticas de design experimental. Os resultados indicaram que concentração de xilose, tampão fosfato e extrato de levedura influenciaram significativamente a produção de hidrogênio, obtendo-se rendimento máximo de 2,39 mol H_2 por mol de xilose, nas condições de 12,24 g/L de xilose, tampão fosfato de 0,170M e 4,11 g/L de extrato de levedura.

A tabela 3.2 resume os trabalhos que avaliaram os parâmetros que influenciam a produção de hidrogênio, em fermentação a partir de diferentes inóculos e reatores.

Tabela 3.2 Parâmetros referentes as condições fermentativas para produção de hidrogênio

Inóculo	Reator	Parâmetros	Rendimento	Referencia
<i>T. thermosaccharolyticum</i> W16	Batelada à 60°C	Concentração de xilose (12,24 g/L) Tampão fosfato (0,170M) Concentração de extrato de levedura (4,11 g/L) Faixa de pH (5 - 6)	2,39 mol/mol xilose	Cao et al (2010)
<i>Thermoanaerobacterium</i> AK54	Batelada à 65°C	Concentração de glicose (20 mmol/L) Percentual de headspace (0,04) - pressão parcial de H ₂ Faixa de pH (6,5)	1,02 mol/mol glicose	Sigurbjornsdottir e Orlygsson (2012)
Cultura acidogênica	Batelada	Condição de Temperatura (37°C) Concentração de extrato de levedura (1,0 g/L) Relação C:N (26)	2,6 mol/mol glicose	Kumari e Dias (2016)
Consórcio microbiano	Batelada à 37°C	Concentração de bagaço (7,0 g/L) Faixa de pH (7,2)	23,0 mmol/L	Rabelo et al (2018)
Consórcio microbiano	APBR à 55°C	Carga orgânica volumétrica de vinhaça (84,2 Kg.DQO m ⁻³ d ⁻¹)	2,4 mol/mol carboidratos totais	Ferraz Junior et al (2014)

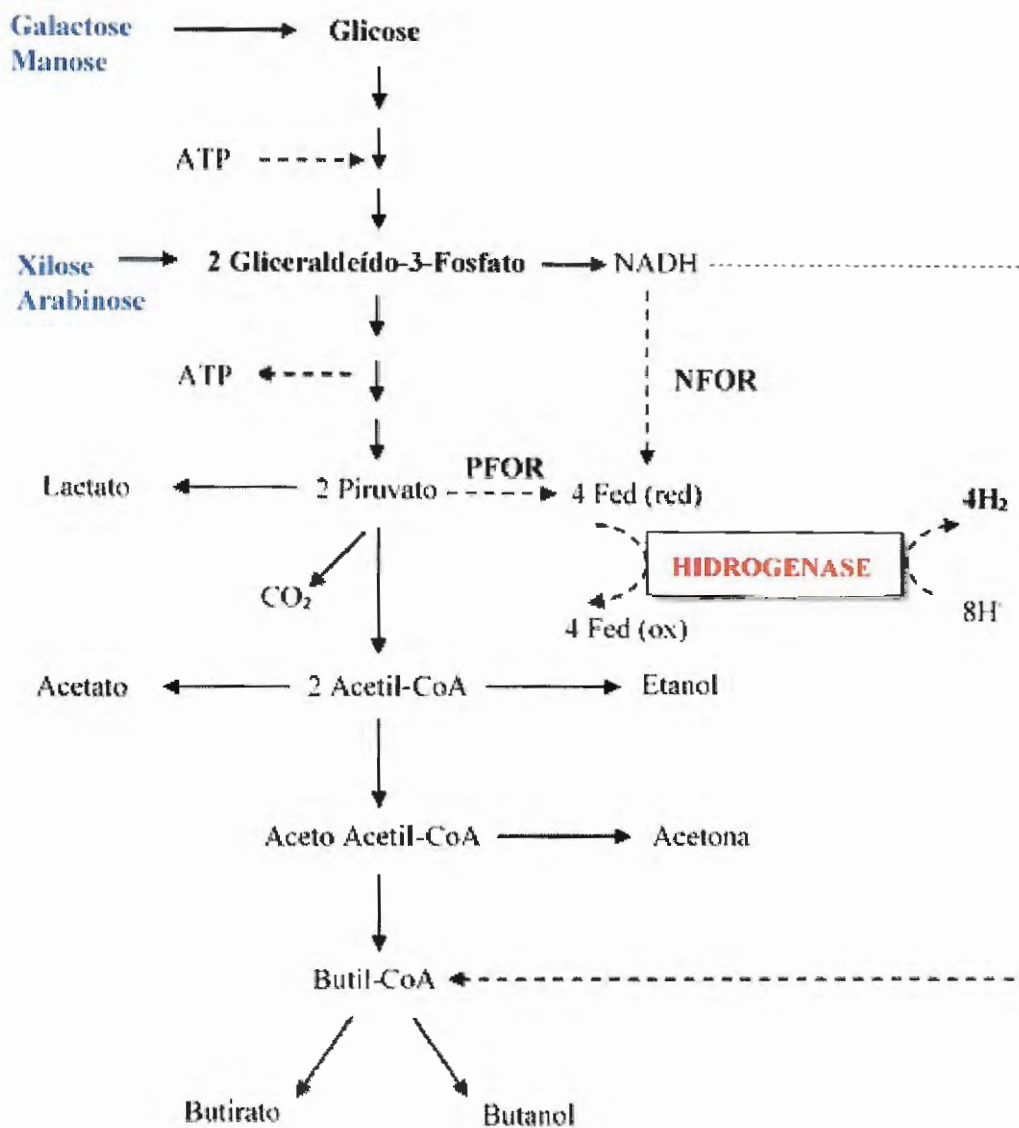
Dessa forma, o processo de fermentação amplia possibilidades de produção de hidrogênio e demais produtos de interesse econômico a partir de diversos substratos orgânicos, uma vez que, há vasta diversidade de bactérias fermentativas anaeróbias presentes em diversas condições ambientais. O emprego de cultura pura para esse fim tem a vantagem de se poder explorar a fisiologia e o potencial biotecnológico de um organismo específico com o objetivo de otimizar e estabelecer um bioprocessos direto de produção de H_2 (Ergal et al., 2018).

Chang e Shuo, 2011 estudaram o mecanismo metabólico das bactérias anaeróbias termófilas fermentativas na conversão de hexoses e pentoses. Os autores concluíram que a via Embden Meyerhof Parnas (EMP) é a utilizada para metabolizar hexoses, como glicose, galactose e manose. Para as pentoses, xilose e arabinose, foi observada a via pentose-fosfato (não-oxidativa) que converte este açúcar em Gliceraldeído 3-P (Figura 3.1). O piruvato é o produto final da glicólise e pode ser convertido em diferentes produtos, sendo que o fluxo de carbono depende do microrganismo envolvido e das condições ambientais. A produção de hidrogênio ocorre quando o ácido pirúvico é convertido em Acetil-Coenzima A e CO_2 através da piruvato-ferredoxina oxidoreductase (PFOR), na qual transfere seus elétrons para os prótons por meio da enzima hidrogenase, formando 2 mols de H_2 . A oxidação do NADH produzido da glicólise, por NADH-ferredoxina oxidoreductase (NFOR), pode gerar mais 2 mols de H_2 (Sinha e Pandey, 2011).

A principal via de produção de H_2 é a partir de PFOR, devido ao impedimento termodinâmico da reoxidação do NADH. O potencial redox $Fd(re)/Fe(ox)$ depende dos microrganismos e temperatura envolvida. Baixa pressão parcial de H_2 favorece a completa oxidação do piruvato em ácido acético e CO_2 . Em altas temperaturas, a influência da pressão parcial de H_2 é menor nas enzimas responsáveis pela produção de H_2 , portanto, esta é a principal razão para que as bactérias hipertermofílicas sejam reportadas por produzir 4 mols de H_2 junto com 2 mols de ácido acético em culturas puras. Em baixas temperaturas, microrganismos direcionam seu metabolismo para formação de produtos reduzidos, como ácido láctico e etanol (Sveinsdottir et al., 2011).

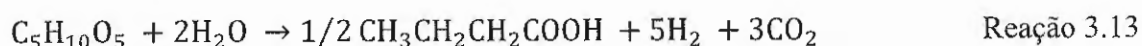
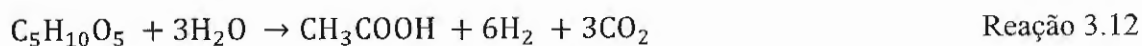
Figura 3.1 Via metabólica de produção de hidrogênio por bactérias anaeróbias termófilas - Via EMP (Embden Meyerhof Parnas)

PFOR - piruvato-ferredoxina oxidorreductase; NFOR - NADH-ferredoxina oxidorreductase



Fonte: Adaptado por Chang e Yao, (2011); Sinha e Pandey, (2011)

Este mesmo mecanismo ocorre frente a outros açúcares, uma vez que todos são reduzidos via glicólise a ácido pirúvico. A produção de hidrogênio a partir de xilose também ocorre pela via do ácido acético (Reação 3.12) e pela via do ácido butírico (Reação 3.13), entretanto com rendimento teórico maior que o obtido a partir da molécula de glicose, sendo, 6 mols de H₂ pela via do ácido acético e 5 mols de H₂ pela via do ácido butírico (Maintinguer et al., 2011).



Bactérias pertencentes a classe Clostridia são as mais pesquisadas para a produção de hidrogênio e subprodutos, devido a suas características anaeróbias, termófilas, capazes de metabolizar pentoses e hexoses em hidrogênio, ácido acético, ácido butírico, ácido láctico, ácido propiônico e etanol. Dentre essas bactérias pode-se citar *Caloramator*, *Clostridium*, *Thermoanaerobacterium* e *Thermoanaerobacter* (Braga et al., 2017; Ciranna et al., 2014; Shaw et al., 2010; Sveinsdottir et al., 2011).

Diversos estudos relatam a presença de bactérias fermentativas anaeróbias e termófilas da classe Clostridia, como precursoras da produção de hidrogênio em consórcios microbianos (Ferraz Júnior et al., 2015; Hniman et al., 2011; Ratti et al., 2015a; Silva et al., 2018) (Tabela 3.3).

Hniman et al., (2011) selecionaram consórcio microbiano anaeróbio, termófilo e produtor de hidrogênio, em pH 5,5 e 60°C, com predomínio de bactérias semelhantes a *Thermoanaerobacterium* sp., *Thermoanaerobacter* sp. e *Caloramator* sp. Os autores observaram produção de hidrogênio, ácido acético, ácido butírico, ácido láctico e butanol.

Ferraz Júnior et al., (2015) observaram a presença dos gêneros *Caloramator*, *Clostridium*, *Megasphaera*, *Oxobacter*, *Thermoanaerobacterium* e *Thermohydrogenium* na comunidade microbiana do reator acidogênico utilizado para produção de hidrogênio a partir de vinhaça de cana-de-açúcar.

Ratti et al., (2015a) avaliaram a composição e a diversidade da comunidade microbiana termófila obtida a partir de lodo de reator UASB para tratamento de vinhaça aplicado a produção de hidrogênio, e constataram a partir da análise de pirosequenciamento, que 40,55% das sequências eram similares ao gênero *Thermoanaerobacterium*.

Tabela 3.3 Presença de bactérias fermentativas anaeróbias e termófilas da classe Clostridia, como precursoras da produção de hidrogênio

Microrganismo	Reator	Substrato	Temp.	pH	Produção de H ₂	Demais metabólitos	Referencia
Consórcio microbiano com predomínio de <i>Thermoanaerobacterium</i> sp., <i>Thermoanaerobacter</i> sp. e <i>Caloramator</i> sp	Batelada	Glicose e xilose (10,0 g/L cada)	60°C	5,5	375 ml/g-açúcar consumido	Ácido butírico, ácido acético, ácido lático e butanol	Hniman et al (2011)
Comunidade autóctone da vinhaça com predomínio de <i>Caloramator</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>Oxobacter</i> , <i>Thermoanaerobacterium</i> e <i>Thermohydrogenium</i>	Anaeróbio de leito fixo de fluxo ascendente	Vinhaça de cana-de-açúcar (84,2 Kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)	55°C	6,5	3,7 mol/mol-carboidratos totais	Ácido butírico, ácido acético, etanol, ácido propiônico	Ferraz Junior et al (2015)
Consórcio microbiano termófilo com predomínio de <i>Thermoanaerobacterium</i> sp.	Batelada	Glicose (2,0 g/L)	55°C	7,0	1,6 mol/mol glicose	Ácido acético, ácido butírico, iso-butírico, ácido lático e ácido propiônico	Ratti et al (2015)
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	Batelada	Celobiose (2,0 g/L) Bagaço pré-tratado (2,0 g/L)	37°C	7,0	11,5 mmol/g-celobiose 3,9 mmol/g-carboidrato	Ácido lático e ácido acético	Braga et al (2019)

Sigurbjornsdottir e Orlygsson, (2012), isolaram *Thermoanaerobacterium AK54*, a partir de águas termais da Islândia, e verificaram produção de hidrogênio e etanol a partir da degradação de diversos substratos. Os seguintes substratos foram avaliados: xilose, glicose, galactose, frutose, manose, lactose e sacarose, e a partir do hidrolisado de celulose, caule, folha, grama, papel de jornal e palha de cevada submetidos a pré-tratamentos químicos.

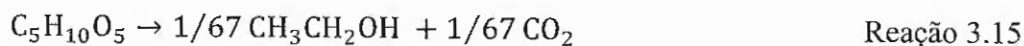
As bactérias termófilas semelhantes a *Thermoanaerobacterium* sp. e *Thermoanaerobacter* sp. são estritamente anaeróbias, e degradam o polissacarídeo xilana (componente da hemicelulose) e amido. Não crescem em celulose e metabolizam a maioria de dissacarídeos e mono sacarídeos, como glicose e xilose. As condições ótimas de crescimento estão entre 60°C e pH de 6,0. Os produtos da fermentação resultam principalmente em ácido acético, etanol, ácido láctico, gás carbônico e hidrogênio (Shaw et al., 2010).

A bactéria *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* é amplamente estudada por seus rendimentos em hidrogênio a partir de resíduos lignocelulósicos, devido a sua capacidade de degradar xilose e outras pentoses (Boonsayompoo e Reungsang, 2013; Cao et al., 2009; Khamtib e Reungsang, 2012; Ren et al., 2008; Roy et al., 2013). Li et al., (2014) avaliaram a atividade enzimática de xilanase no metabolismo de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* e obtiveram melhores resultados à pH 6,5 e 65°C.

Sendo assim, a produção de hidrogênio a partir da fermentação por bactérias anaeróbias e termófilas, destacando o gênero *Thermoanaerobacterium* spp., torna-se um processo interessante devido as características metabólicas e enzimáticas desses microrganismos, podendo degradar desde substratos simples, como glicose, frutose, sacarose e xilose, até polímeros complexos como xilana, com produção de hidrogênio e outros metabólitos de agregado valor econômico.

3.2 Produção biológica de etanol

A produção biológica de etanol ocorre principalmente a partir da fermentação de açúcares por levedura ou bactérias fermentativas. O máximo rendimento teórico a partir da conversão de hexoses, é de 2 mols de etanol, e para pentoses, o rendimento em etanol é próximo a 1,67 mols por mol de pentose metabolizada (Reação 3.14 e 3.15). Entretanto, dependendo do metabolismo do microrganismo utilizado, outros metabólitos podem ser produzidos além do etanol, diminuindo assim seu rendimento



A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o principal microrganismo utilizado para a produção de etanol em escala industrial, devido à sua capacidade de crescimento em condições facultativas, por metabolizar sacarose, glicose e frutose em temperatura de 26° a 32°C, e sintetizar principalmente etanol, CO₂ e glicerol (Bai et al., 2008).

Essa levedura possui uma enzima específica, piruvato descarboxilase (PDC) por meio da qual ocorre a conversão direta do piruvato à acetaldeído, este catalisado pela enzima álcool-desidrogenase (Adh) formando etanol (Figura 3.2) (Tomás, 2013).

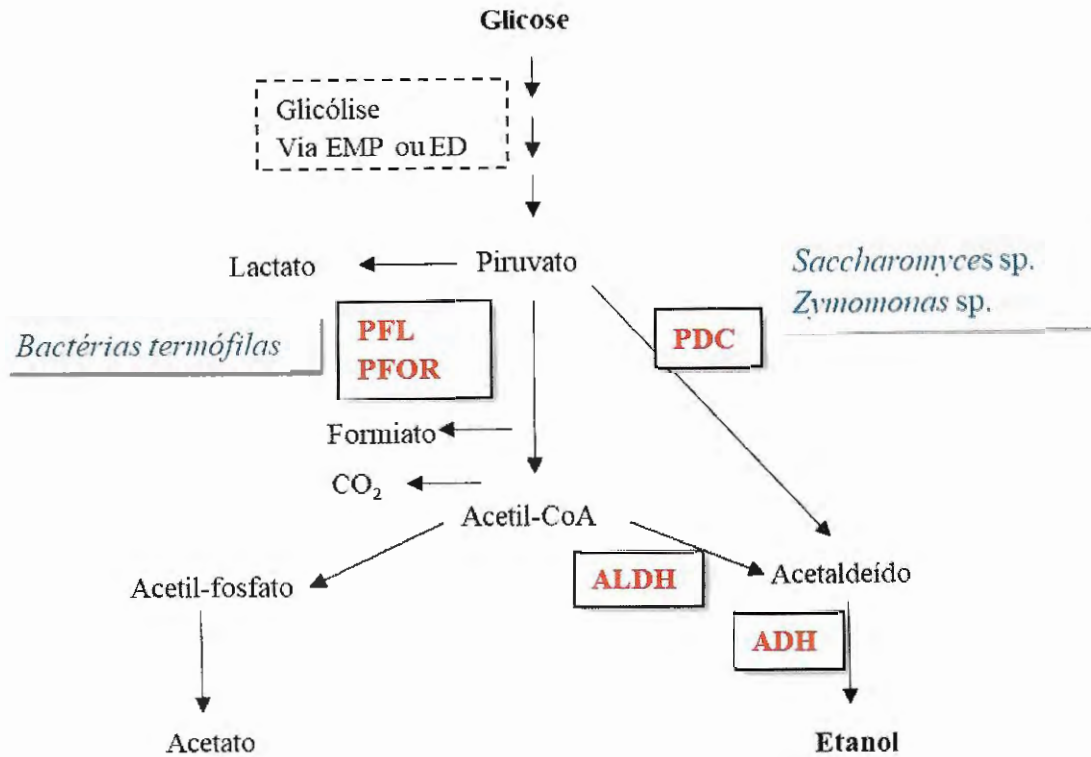
Esta via de produção de etanol é fortemente associada ao crescimento celular das leveduras. Durante a glicólise, são produzidas 2 moléculas de ATP, que são utilizadas na biossíntese das células, sem esse consumo contínuo, o metabolismo glicolítico será interrompido devido ao acúmulo intracelular de ATP, que inibe a ativação da enzima fosfofrutoquinase (PFK), uma das enzimas reguladoras da glicose. Este princípio contradiz a fermentação de etanol por células de levedura imobilizadas em material suporte, na qual restringem significativamente seu crescimento (Bai et al., 2008).

Dessa forma, na ausência de crescimento celular, o rendimento teórico máximo obtido em etanol por *Saccharomyces cerevisiae* é de 0,51 (massa de etanol/massa de carboidrato), correspondendo a 51% do carboidrato convertido em etanol, seguido de 0,489 de CO₂ e 0,036 de glicerol. Entretanto, considerando que 5 a 12% é convertido em células, o rendimento em etanol não ultrapassa 47% do total de carboidrato convertido (Bai et al., 2008).

Ressalta-se que *Saccharomyces cerevisiae* possui importante limitação no consumo de outras fontes de carbono como pentoses, pois não contém transportadores específicos que possibilitam o transporte de açúcares como a xilose para dentro da célula, carecem de enzimas que possibilitam a isomerização desse açúcar no metabólito intermediário xilulose, e não obtém um mecanismo que direcione o metabolismo da xilulose para a fermentação, ao invés da respiração (Avanthi et al., 2017; Mittelman e Barkai, 2017).

Figura 3.2 Via metabólica de produção de etanol

PDC – piruvato-descarboxilase; PFL- piruvato formiato-liase; PFOR – piruvato ferredoxina oxidoreductase; Aldh – acetaldeído desidrogenase; Adh - álcool-desidrogenase



Fonte: Adaptado de Tomás (2013) e Chang e Yao (2011)

Zymomonas mobilis é uma bactéria anaeróbia que também fermenta etanol a partir da conversão de piruvato em acetaldeído pela enzima PDC. Sua vantagem em relação a levedura, é que esta bactéria utiliza a via Entner-Doudoroff (ED), gerando apenas 1 molécula de ATP na glicólise, conseqüentemente, empregando menos energia para o crescimento celular. Desta forma, a bactéria é capaz de converter 98% do total de glicose em etanol, CO₂, lactato e outros produtos, obtendo rendimentos em etanol de 3 a 5 vezes maiores que a *Saccharomyces cerevisiae*. Em contrapartida, apenas glicose e frutose são metabolizados eficientemente em etanol, uma vez que na glicólise da sacarose ocorre formação de levana e sorbitol, diminuindo significativamente a produção de etanol, além de que açúcares como xilose, celobiose e arabinose não são metabolizados por *Z. mobilis* (Avanthi et al., 2017; Sprenger, 1996).

Devido à grande biodiversidade microbiana, a fermentação de etanol a partir de pentoses é possível, uma vez que certos grupos de microrganismos podem fermentar xilose, arabinose, e outros açúcares. Entretanto, as principais limitações técnicas identificadas em microrganismos, como bactérias e fungos, são a baixa tolerância ao etanol, a menor taxa de consumo de açúcar, a necessidade de remover os inibidores e o controle cuidadoso da oxigenação durante a produção de etanol. Além disso, a probabilidade de contaminação é alta quando se considera que espécies bacterianas requerem pH elevado do meio (quase neutro)

quando comparado com o processo de fermentação de levedura que pode ocorrer em pH ácido. Além dessas desvantagens, o desempenho dessas cepas depende da influencia de outros parâmetros, como temperatura, pH, fatores nutricionais, concentração do substrato, concentração do produto e concentração do inibidor, etc (Avanthi et al., 2017).

As bactérias anaeróbias termófilas destacam-se porque metabolizam ampla variedade de substratos orgânicos, com rotas metabólicas que possibilitam a produção de etanol, sem a necessidade de oxigênio. Estas bactérias englobam o principal grupo de microrganismos isolados a partir de condições restritas de nutrientes e compostos tóxicos, tais como sedimentos de águas termais, lodo de biodigestores de tratamento de efluentes, esterco de vaca, trato digestivo de ruminantes, entre outros (Ren et al., 2008; Saripan e Reungsang, 2013; Shang et al., 2013)

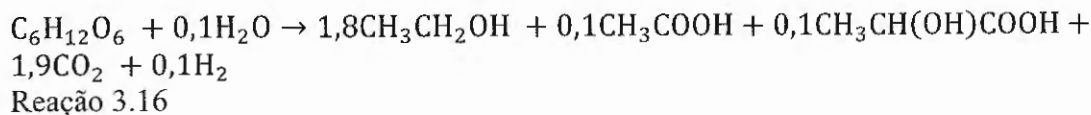
Ressalta-se também, que microrganismos termófilos compreendem os maiores produtores de enzimas, tais como amilases, fosfatases (incluindo fitases), celulases, hemicelulases, proteases, lipases, lacases e várias outras enzimas, que são úteis em diferentes setores como alimentos, têxteis, detergentes, laticínios, farmacêuticos, biocombustíveis, entre outros. Considerando também que produzem enzimas termoestáveis e com maior resistência a agentes desnaturantes e toleram alta pressão, em comparação com enzimas mesofílicas (Bala e Singh, 2019).

Bactérias anaeróbias e termofílicas, principalmente da classe Clostridia, não produzem etanol a partir da enzima PDC, mas em condições fermentativas, direcionam o piruvato para acetil-CoA a partir de duas enzimas principais, piruvato formiato-liase (PFL) e piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFOR). Parte do acetil-CoA é convertido a etanol através das enzimas fosfato-acetiltransferase (Aldh) e álcool-desidrogenase (Adh) (Figura 3.2) (Chang e Yao, 2011) (Tabela 3.4).

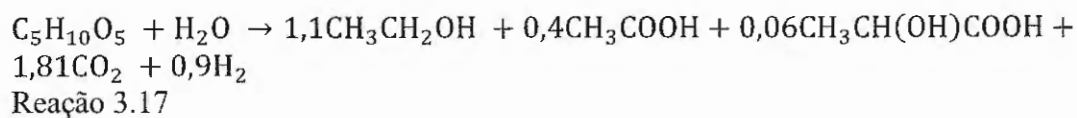
O rendimento em etanol a partir do processo de fermentação por bactérias anaeróbias termófilas não é inferior ao obtido por *Saccharomyces cerevisiae*. Beato et al., (2016) estudaram diversas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* encontradas na Mata Atlântica, cerrado, e nas indústrias sucroalcooleiras no Brasil, e o maior rendimento em produção de etanol observado foi de 1,67 mol por mol de hexose para a espécie UFMG-CM-Y267.

Wiegel e Ljungdahl, (1981), isolaram a bactéria anaeróbia *Thermoanaerobacter ethanolicus* a partir de amostras de águas e sedimentos em condições alcalinas e termófilas nos EUA. Os autores constataram crescimento em glicose, frutose, manose, galactose, ribose, xilose, sacarose, maltose, celobiose, amido e piruvato com produção significativa de etanol e

CO₂, 1,8 e 1,9 mol por mol de glicose, respectivamente, seguindo de menores valores em ácido acético, ácido láctico e hidrogênio. Os autores propuseram a seguinte reação (3.16) para exemplificar a conversão da glicose:



Já em estudos visando a degradação da xilose, Larsen et al., (1997) isolaram a bactéria anaeróbia e hipertermófila *Thermoanaerobacter mathranii* a partir de águas termais na Islândia. Os autores observaram metabolismo similar ao estudado por Wiegel e Ljungdahl, (1981), sendo 1,1 mol de etanol por mol de xilose, este referido na reação 3.17.



Caloramator spp. são bactérias estritamente anaeróbias, termófilas, e formadora de endósporo que também podem produzir etanol. Bactérias da espécie *Caloramator boliviensis* são capazes de metabolizar xilose, celobiose, glicose, arabinose, sacarose, lactose, maltose, frutose, galactose, manose, glicerol, xilana, carboximetilcelulose e extrato de levedura, e produzir principalmente etanol, além de ácido acético, ácido láctico, ácido propiônico, CO₂ e H₂, porém em proporções menores (Crespo et al., 2012a)

Tabela 3.4 Presença de bactérias fermentativas anaeróbias e termófilas da classe Clostridia, como precursoras da produção de etanol

Microrganismo	Substrato	Temp.	pH	Produção de etanol	Demais metabólitos	Referencia
<i>Caloramator boliviensis</i>	Xilose e Celobiose	60°C	6,5	0,70 e 0,45 por grama de açúcar consumido	Ácido acético, ácido láctico, ácido propiônico, H ₂ e CO ₂	Crespo et al (2012a)
<i>Thermoanaerobacter pentosaceus</i> DTU01	Xilose	70°C	7,0	1,39 mol/mol xilose	Ácido acético e ácido láctico	Tomas et al (2012)
<i>Ethanoligenens harbinense</i>	Glicose	35°C	4,5 - 5,0	1.13 mol/mol	Ácido acético, H ₂ e CO ₂	Xing et al (2006)
<i>Thermoanaerobacterium calidifontis</i> Rx1	Xilose	50-55°C	7,0	1,35 mmol/mol xilose	Ácido acético, ácido láctico, H ₂ e CO ₂	Shang (2013)
<i>Thermoanaerobacterium</i> AK54	Glicose e Xilose	65°C	5,0 - 6,0	1,03 mol/mol glicose 0,73 mol/mol xilose	Ácido acético, ácido láctico, H ₂ e CO ₂	Sigurbjornsdottir e Orlygsson (2012)
Consórcio microbiano com predomínio de <i>Thermoanaerobacterium</i> sp., <i>Caloramator</i> sp. e <i>Ethanoligenens</i> sp.	Glicose e Xilose	55°C	7,0	1,73 mol/mol glicose 1,33 mol/mol xilose	Ácido acético, ácido láctico, ácido propiônico, ácido butírico, H ₂ e CO ₂	Silva et al (2018)

Caloramator celer converte açúcares C6 em H₂, CO₂, ácido acético, etanol e ácido fórmico destacando-se a produção de hidrogênio. Entretanto, a produção de etanol pode ser favorecida através de condições de crescimento, e está sendo estudada como possível precursor para a produção de bioenergia. A partir da análise genômica deste microrganismo, verificou-se que a produção de etanol ocorre através da expressão da enzima álcool desidrogenase (Adh), que favorece a regeneração de NAD⁺, com consequente conversão do acetil-CoA em etanol (Ciranna et al., 2014).

Thermoanaerobacter pentosaceus DTU01, bactéria termófila (70°C), foi isolada por Tomás et al., (2013) a partir de lodo de reator contínuo alimentado com xilose e resíduos orgânicos. Os autores caracterizaram-na como produtora de etanol, uma vez que produziu um percentual em etanol de 83,2%, em relação ao rendimento teórico a partir de xilose, obtendo-se rendimento de 1,39 mol / mol de xilose.

Outro espécie relatada como produtora de etanol é *Ethanoligenens* sp.. Sendo esta bactéria caracterizada como anaeróbia obrigatória, mesófila (20 a 40°C), e com crescimento em ampla faixa de pH de 3,5 a 9,0, com pH ótimo em 4,5 a 5. Mono, di e oligossacarídeos são fermentados com produção de etanol, ácido acético, hidrogênio e CO₂, a partir de glicose (Xing et al., 2006). Entretanto, a presença de *Ethanoligenens* sp. foi relatada em consórcios microbianos anaeróbios e termófilos (Silva et al., 2018).

Silva et al., (2018) em seus estudos, obtiveram consórcio microbiano produtor de etanol a partir de celulose e xilose, em condições anaeróbias e termófilas, e identificaram *Thermoanaerobacterium*, *Caloramator* e *Ethanoligenes* relacionando-os a produção de etanol.

Desta forma, bactérias anaeróbias e termófilas possibilitam produção de biocombustíveis, tanto hidrogênio quanto etanol, a partir de diversos açúcares, podendo contribuir para sua aplicação em processos de biorrefinaria, nos quais requerem eficiente produção de energia a partir de resíduos agroindustriais.

3.3 Vinhaça

É o termo utilizado para designar a água residuária do processo de destilação do vinho resultante da fermentação de carboidratos para produção de etanol. Apesar de sua consistência líquida, no Brasil, é classificada como resíduo sólido segundo a NBR 10004 da ABNT, 2004, pois não há tratamento eficiente que permita seu lançamento em corpos d'água.

A produção e característica da vinhaça varia em relação a matéria prima e ao processo de produção de etanol. O processo de produção de etanol a partir do milho gera cerca de 6,29 L de vinhaça por Kg de matéria prima, o processo a partir de caldo de cana 1,33 L e do melaço 2,52 L /Kg. O uso de madeira maciça pode gerar valores de 20,4 L de vinhaça por Kg. Entretanto, esses valores podem alterar caso o processo inclua a vinhaça, águas de resfriamento e águas de lavagem. Concentrações de matéria orgânica variam de 0,03 a 0,34 Kg por Kg de matéria-prima (Wilkie et al., 2000).

A composição da vinhaça é constituída por concentrações altas de potássio, fósforo, nitrogênio e sulfato (Fuess et al., 2017). Ácido láctico, glicerol, etanol e ácido acético são os principais compostos orgânicos, seguido de residual de carboidratos (Down, 1994). Silva et al., (2017) detectaram concentrações de aminoácidos na vinhaça de cana-de-açúcar, sendo alanina, glicina, leucina, ácido aspártico e ácido glutâmico.

Ramos e Silva, (2017) caracterizaram a vinhaça obtida na produção de etanol a partir de cana-de-açúcar, da Usina São Martinho, Pradópolis, SP, Brasil, e observaram pH de 4,41, 6,2 g/L de carboidratos totais, 28,6 g/L de DQO, 2,2 g/L de sulfato, 0,7 g/L de nitrogênio total, 9,9 g/L ácido acético, 7,5 g/L de ácido láctico, 7,4 g/L de ácido cítrico e 6,1 g/L de ácido málico, 3,7 g/L de ácido isobutírico, 3,5 g/L de ácido propiônico, 2,8 g/L de ácido succínico, 2,4 g/L de ácido fórmico e 0,8 g/L de ácido capróico.

A coloração da vinhaça, um agravante para seu tratamento e disposição em corpos d'água, é devido a fenólicos, como ácido tânico e ácido húmico, além de melanoidina e compostos de melaço oriundos do superaquecimento de açúcares, estes, muitas vezes, responsáveis pela inibição de atividade microbiana (Wilkie et al., 2000).

Devido a sua composição rica em nutrientes e matéria orgânica, a vinhaça vem sendo destinada a fertirrigação das lavouras desde meados de 1980, entretanto, essa prática possui alguns entraves, principalmente referente aos custos com seu transporte, limitando sua aplicação a uma área limitada próxima a indústria, e aos impactos negativos ocasionados ao solo e na água, como a salinização, solidificação, sobrecarga orgânica, superfertilização, acidificação, contaminação por metais, aumento da eutrofização em rios e morte de corpos d' água (Fuess et al., 2017; Reis e Hu, 2017).

Desse modo, a remoção de matéria orgânica e compostos da vinhaça por digestão anaeróbia é opção considerável, uma vez que, sua composição orgânica é matéria-prima para microrganismos anaeróbios produzirem energia (metano e hidrogênio).



Lazaro et al., (2014), constataram que a vinhaça de cana-de-açúcar pode ser usada como substrato para produção de hidrogênio em condições mesófilas e termófilas, e que tanto a temperatura quanto a concentração de vinhaça podem interferir na produção de hidrogênio e no consumo de carboidratos. Em condições termófilas (55°C), os autores observaram rendimentos favoráveis de hidrogênio apenas em concentrações baixas de DQO (2,31 mmol-H₂ / g DQO). Neste estudo, a temperatura e a concentração de substrato foram parâmetros importantes para selecionar grupos de microrganismos distintos, uma vez que em concentrações altas de DQO, tem-se maior concentração de ácidos orgânicos e fenóis na vinhaça, podendo inibir a atividade microbiana. Em condição mesófila, a maior abundância encontrada foi de *Clostridium acetobutylicum* e *Clostridium aciditolerans*, e na condição termófila de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*.

Os autores obtiveram principalmente produção de hidrogênio e ácido butírico, além de ácido acético, ácido propiônico e etanol, indicando assim, que a partir da degradação da vinhaça foi possível produzir compostos de agregado valor econômico.

Ramos e Silva (2017) também avaliaram o efeito da temperatura na produção de hidrogênio a partir da vinhaça nas condições termófilas (55°C) e hipertermófilas (75°C) em reator de leito fluidificado (RLF). O melhor resultado obtido para produção de hidrogênio foi na condição de 55°C e TDH de 4 horas, com produção de ácido butírico e acético. Os autores verificaram com o aumento da temperatura (75°C) diminuição significativa da produção de hidrogênio e aumento da concentração de ácido láctico e ácido propiônico.

Ferraz Júnior et al., (2015), avaliaram a produção de metano utilizando a vinhaça de cana-de-açúcar como substrato (35,2 g/L de DQO, 4,1 g/L de carboidratos, ajustado pH a 6,5 em condição termófila de 55°C). A princípio, os autores aplicaram a vinhaça em reator metanogênico (UASB I) em processo de 1 estágio, e obtiveram valores de 234,2 Nml/g DQO-consumida. Os autores avaliaram também o processo de 2 estágios, sendo um reator acidogênico (APBR) seguido de um reator metanogênico (UABS II), tendo-se valores de produção de metano 25,7 % maior em relação ao processo de 1 estágio (306 Nml/g DQO consumida). Portanto, os autores concluíram a importância da fase acidogênica para maior remoção de matéria orgânica e produção de metano a partir de vinhaça.

Volpini et al., (2018) também avaliaram a produção de metano em reator anSBBR (reator anaeróbico operado em batelada e alimentado em sequenciamento com biomassa imobilizada) utilizando efluente acidificado de reator alimentado com vinhaça para produção de hidrogênio. Os autores constataram que, o sistema em dois estágios produziu 13,6 KJ por

grama de DQO aplicada, que corresponde ao rendimento energético 38,8% maior que o sistema tradicional de um estágio. A partir dessas considerações, inferiram sobre os benefícios da separação da hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese em diferentes reatores.

Resultados similares foram observados no estudo de avaliação de cenários feita por Fuess et al., (2018), no qual concluíram que a biodigestão da vinhaça em dois estágios possibilita o aumento na produção de energia em 20 a 30% sem prejudicar a rentabilidade da biorefinaria.

A partir de dados da literatura é possível elucidar que a vinhaça é uma água residuária com características que podem ser aproveitadas para geração de compostos de interesse econômico, como hidrogênio, metano e ácidos orgânicos, tendo assim, um destino diferente à simplesmente fertirrigação. Desta forma, vê-se vantajosa o uso da vinhaça para potencializar a produção de energia, além de contribuir com o volume gerado de vinhaça, e em custos com transporte e fertirrigação.

A condição termófila para biodigestores aplicados a vinhaça, é favorável uma vez que a vinhaça já sai das colunas de destilação com temperatura por volta de 55°C, associando assim à eliminação de sistemas de resfriamento antes dos biodigestores. Dessa forma, vê-se apenas necessário otimizar a conversão da matéria orgânica residual da vinhaça, selecionando microrganismos que sejam adaptáveis as características da vinhaça e produzam compostos de interesse econômico.

Fuess et al., (2018), avaliaram o metabolismo de diferentes grupos microbianos para produção de hidrogênio a partir da vinhaça em reator acidogênico APBR, com carga orgânica de 84,2 Kg DQO m³.d⁻¹ e TDH 7,5 horas à 55°C. Os autores observaram que a maior produção de hidrogênio foi associada com a produção de ácido acético e butírico, e que o pH 5,1 favoreceu a atividade de bactérias produtoras de hidrogênio, tendo nesta fase, estabilidade na população de bactérias semelhante *Thermoanaerobacterium*. Entretanto, a população microbiana diferenciou-se conforme os descartes de biomassa do reator, juntamente com a variação na produção de hidrogênio. Os gêneros *Lactobacillus* sp e *Clostridium* sp foram abundantes em todas as fases do reator, sendo indiferente ao descarte de biomassa, já o gênero *Thermoanaerobacterium* esteve menos presente após o descarte de biomassa, sugerindo assim que esse gênero não cresce eficientemente em material suporte.

Outro dado importante observado pelos autores referiu-se a bactérias produtoras de ácido láctico, que foram predominantes em todas as fases do reator alimentado com vinhaça. Isto provavelmente se deu à resistência dessas bactérias em pH ácido (2 a 2,5), uma vez que no

processo de fermentação, ácido sulfúrico é adicionado, para diminuir a contaminação por bactérias que competem com as leveduras para produção de etanol.

Os autores observaram relação entre as concentrações de ácido láctico, ácido acético e propiônico, indicando que o ácido láctico pode ter sido fermentado para ácido propiônico e acético por bactérias do gênero *Clostridium*, como alternativa de obter energia em baixas concentrações de carboidratos. Entretanto, é preciso ressaltar que o maior rendimento na produção de hidrogênio foi observado na fase em que apresentou maior abundância relativa dos gêneros *Thermoanaerobacterium* e *Caloramator*. Desta forma, os autores concluíram que a recuperação de energia a partir da vinhaça através da produção de hidrogênio por digestão anaeróbia, está associada a manutenção da abundância relativa elevada do gênero *Thermoanaerobacterium* nos sistemas.

Este gênero também foi citado por Ferraz et al., (2014), como responsável pela produção de hidrogênio em reator acidogênico alimentado com vinhaça. Os autores obtiveram rendimento de 2,4 mol H₂/mol carboidratos totais, em reator APBR à 55°C, com conversão de 76,1% de carboidratos. A via acetato/butirato para produção de hidrogênio também foi observada neste estudo. Os autores submeteram a biomassa microbiana do reator, a técnica de diluição seriada para isolar o microrganismo produtor de hidrogênio, e a espécie identificada foi *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*.

3.4 Considerações do autor

É uma realidade a urgência do tratamento e destino adequado de resíduos industriais tanto quanto o aumento na demanda de energia renovável, uma vez que estas são algumas das principais razões para os problemas ambientais e econômicos enfrentados ultimamente no cenário mundial.

A remoção de açúcares residuais em águas residuárias contribui significativamente para a qualidade e disponibilidade da água e do solo. A produção de hidrogênio e etanol como fonte de energia renovável, é uma alternativa ao uso desponderado de águas superficiais por hidrelétricas e ao uso de combustíveis fósseis.

A implantação do conceito de biorefinaria em indústrias sucroalcooleiras possibilita agregar valor econômico aos resíduos produzidos, e aumentar a produtividade de energia.

O presente trabalho propôs selecionar bactérias anaeróbias e termófilas para a produção de hidrogênio e etanol, a partir de pentoses, a fim de contribuir com conhecimento e

possibilidades para produção de energia renovável a partir de águas residuárias ricas em carboidratos.

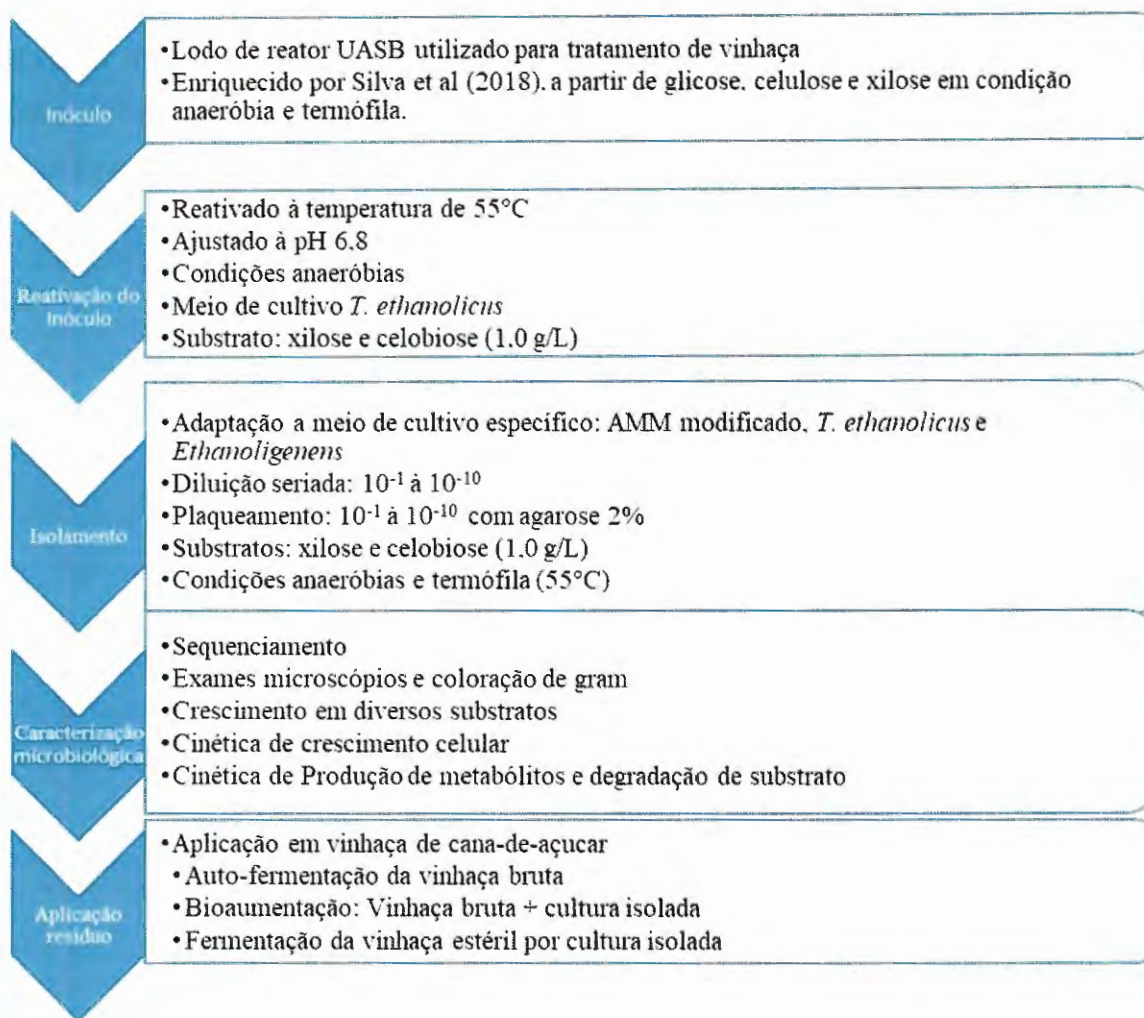
Vale ressaltar, que em um processo termófilo é preciso dispor de energia para manter a temperatura requerida, podendo ser vista a primeiro modo como desvantagem para a aplicação no processo industrial. Entretanto, a produção de etanol em usinas ocorre concomitante a produção de açúcar, na qual já requer temperaturas altas em todo o processo de sacarificação do caldo de cana-de-açúcar. Outro fator, é que o rendimento de etanol no processo industrial oscila devido a contaminação microbiana nas cubas de fermentação, principalmente por manter condições mesófilas e aeróbias.

Desta forma, com esta pesquisa, amplia-se o conhecimento em relação as bactérias anaeróbias e termófilas e as possibilidades de aplicação, visando contribuir para maior eficiência, a partir de degradação de compostos, a obtenção de produtos de valor agregado na digestão anaeróbia da vinhaça, e na produtividade de etanol.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A realização do presente trabalho com a finalidade de obter bactérias anaeróbias e termófilas produtoras de hidrogênio e etanol foram realizadas nas seguintes etapas descritas no fluxograma da Figura 4.1.

Figura 4.1 Fluxograma experimental



Fonte: Elaboração própria

4.1 Inóculo

Para este trabalho, utilizou-se consórcio microbiano anteriormente enriquecido por Silva et al., (2018). Este consórcio foi proveniente de lodo de reator UASB utilizado no tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar da Usina São Martinho (Pradópolis – SP), e submetido pelos autores a processos que favoreceram o predomínio de bactérias celulolíticas e bactérias produtoras de etanol, a partir dos substratos glicose, celulose e xilose em condição anaeróbia e termófila. Os principais gêneros identificados foram *Caloramator* sp, *Coprothermoanaerobacter* sp, *Ethanoligenens* sp e *Thermoanaerobacterium* sp. (Silva et al., 2018).

4.2 Meios de cultivo

Os três meios de cultivo empregados na etapa de isolamento corresponderam a meios específicos para o isolamento de certas bactérias. O meio *Thermoanaerobacter ethanolicus* foi utilizado por Wiegel e Ljungdahl, (1981) para isolar a bactéria produtora de etanol *Thermoanaerobacter ethanolicus*, e por Silva et al., (2018) para obter o consórcio microbiano utilizado como inóculo neste trabalho (Tabela 4.1). O meio AMM modificado foi usado por C. Crespo et al., (2012) para isolar bactéria *Caloramator boliviensis*, também caracterizada como produtora de etanol (Tabela 4.4) e por fim, o meio *Ethanoligenens*, de acordo com a descrição de Xing et al., (2006) (Tabela 4.9).

Para o preparo das soluções de minerais e soluções de vitaminas utilizou-se água ultra-purificada, material para filtração à vácuo, membrana filtrante de nitrato de celulose com tamanho de poro de 0,22 µm e frascos de armazenamento de 1000 ml. Todo o material foi anteriormente autoclavado à 121°C por 20 minutos, e o preparo das soluções mantiveram-se em condições assépticas, utilizando bico de Bunsen. Os reagentes sintéticos foram pesados em balança analítica nas concentrações descritas nas Tabelas 4.2, 4.3, 4.5, 4.6, 4.7 e 4.8, referentes aos respectivos meios de cultivo. Posteriormente, foram solubilizados em 1.000 ml de água ultra-purificada, submetidos ao processo de filtração, e armazenados em frascos adequados e sob refrigeração à 4°C. Para o armazenamento das soluções de vitaminas, os frascos foram envoltos por papel alumínio, a fim de diminuir a incidência de luz.

O preparo do meio de cultivo foi realizado antecipadamente às etapas de fermentação de operação dos reatores em batelada.

As concentrações dos reagentes de cada meio de cultivo estão descritas nas Tabelas 4.1, 4.4 e 4.9. Para a adição das soluções de minerais e vitaminas, e preparo do meio de cultivo, respeitou-se as condições assépticas, sempre higienizando o local com álcool 70% e mantendo o diâmetro de esterilidade próximo ao bico de Bunsen.

Tabela 4.1 Composição do meio para *Thermoanaerobacter ethanolicus*

Composição	Quantidades – q.s.p. 1000 ml de água ultra-purificada
Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O	1,66 g
Extrato de levedura	1,0 g
Triptona	1,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
NH ₄ Cl	0,5 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,18 g
Solução de minerais modificada por Wolfe	5,0 ml
Solução de vitaminas	0,5 ml
pH 6,8	

Fonte: Atlas, (2005)

Tabela 4.2 Composição da Solução de Vitaminas

Composição	Quantidades – q.s.p. 1000 ml de água ultra-purificada
Pyridoxina HCL	0,2 g
Ácido <i>p</i> -Aminobenzóico	0,1 g
Pantotenato de Cálcio	0,1 g
Ácido Nicotínico	0,1 g
Ácido Tióctino	0,1 g
Biotina	0,04 g
Ácido fólico	0,04 g
Riboflavina	0,01 g
Tiamina HCL	0,01 g
Vitamina B12	0,002 g

Fonte: Atlas (2005)

Tabela 4.3 Composição da Solução de minerais modificada por Wolfe

Composição	Quantidades – q.s.p. 1000 ml de água ultra-purificada
MgSO ₄ 7H ₂ O	3,0 g
Ácido Nitrilotriacético	1,5 g
NaCl	1,0 g
MnSO ₄ H ₂ O	1,0 g
CaCl ₂ (anidro)	0,1 g
Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	0,1 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,1 g
AlK(SO ₄) ₂ (anidro)	0,01 g
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,01 g
H ₃ BO ₃	0,01 g
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,01 g
Na ₂ SeO ₃ (anidro)	0,001 g

Fonte: Atlas (2005)

Tabela 4.4 Composição do meio AMM Modificado

Composição	Quantidades – q.s.p. 1000 ml de água ultra-purificada
Meio A	10,0 ml
Meio B	2,0 ml
Meio D	1,0 ml
Meio E	1,0 ml
Extrato de levedura	1,0 g
Ajustar a pH 7 com H ₂ SO ₄ (0,5 M)	

Fonte: Angelidaki et al (1990) modificado por Crespo et al (2012a)

Tabela 4.5 Composição do Meio A

Composição	Quantidades – q.s.p. 1000 ml de água ultra-purificada
Ureia	1,0 g
NaCl	10,0 g
MgCl ₂ . 6H ₂ O	10,0 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	5,0 g

Fonte: Angelidaki et al (1990) modificado por Crespo et al (2012)

Tabela 4.6 Composição do Meio B

Composição	Quantidades – q.s.p. 1000 ml de água ultra-purificada
K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	200,0 g

Fonte: Angelidaki et al (1990) modificado por Crespo et al (2012a)

Tabela 4.7 Composição do Meio D - Solução de Minerais traços modificado

Composição	Quantidades – q.s.p. 1000 ml de água ultra-purificada
FeCl ₂ .4H ₂ O	1,5 g
H ₃ BO ₃	0,06 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,12 g
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,10 g
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,02 g
NiCl ₂ . 6H ₂ O	0,02 g
ZnCl ₂	0,07 g
CuCl ₂ . 2H ₂ O	0,01 g
Na ₂ SeO ₃	0,003 g
NaOH	0,5 g
HCl 25%	6,5 ml

Fonte: Angelidaki et al (1990) modificado por Crespo et al (2012a)

Tabela 4.8 Composição do Meio E - Solução de Vitaminas DSMZ 141

Composição	Quantidades – q.s.p. 1000 ml de água ultra-purificada
Biotina	2,0 mg
Ácido fólico	2,0 mg
Pyridoxina HCl	10,0 mg
Thiamina HCl.H ₂ O	5,0 mg
Riboflavina	5,0 mg
Ácido Nicotínico	5,0 mg
D-Ca pantotenate	5,0 mg
Vitamina B12	0,1 mg
Ácido Aminobenzóico	5,0 mg
Ácido lipóico	5,0 mg

Fonte: Angelidaki et al (1990) modificado por Crespo et al (2012)

Tabela 4.9 Composição do Meio *Ethanoligenens* DSMZ 1057

Composição	Quantidades – q.s.p. 1000 ml de água ultra-purificada
Triptona	4,0 g
Extrato de carne	2,0 g
Extrato de levedura	1,0 g
NaCl	4,0 g
K ₂ HPO ₄	1,5 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,1 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,2 g
L-Cisteína	0,5 g
Solução de minerais modificada por Wolfe	1,0 ml
Solução de Vitaminas	10,0 ml
Ajustar a pH 6,0 com H ₂ SO ₄	

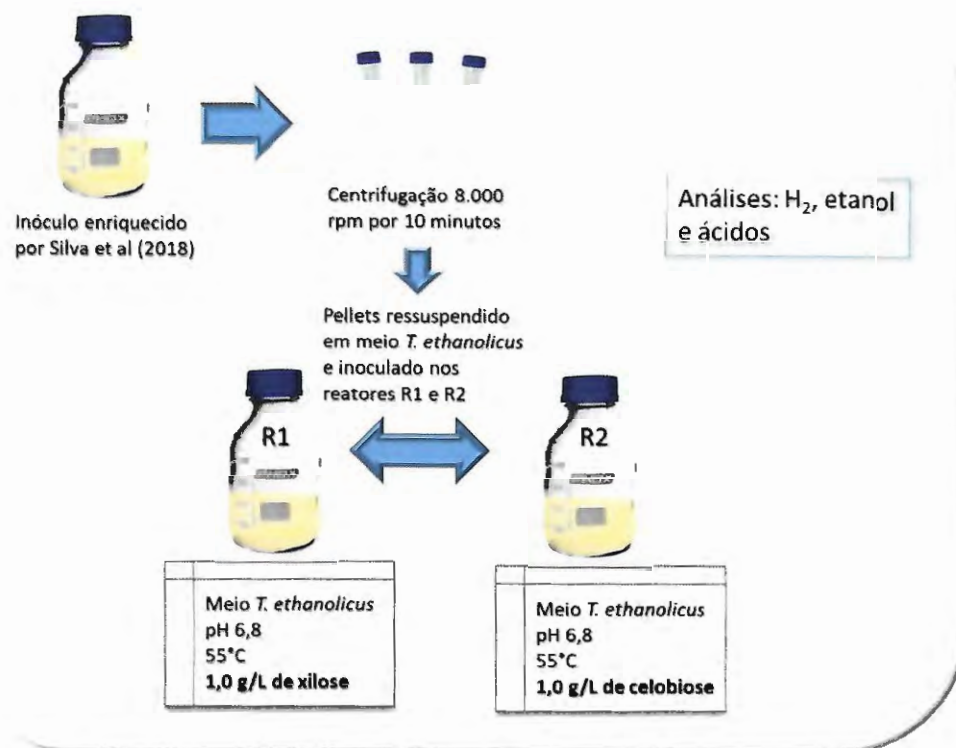
Fonte: DSMZ (2015)

4.3 Reativação do Inóculo

A reativação do consórcio microbiano foi realizada em 2 condições distintas, sendo um reator em batelada com 1,0 g/L (6,66 mmol/L) de xilose (R1), e o outro reator em batelada com 1,0 g/L de celobiose (2,92 mmol/L) (R2) (Figura 4.2). Nessa etapa foi usado meio de cultivo *T. ethanolicus* (Atlas, 2005) (Tabela 4.1). Como inóculo utilizou-se o consórcio microbiano enriquecido por Silva et al (2018), sendo este centrifugado a 8.000 rpm por 10 minutos (Figura 4.2). O pellet correspondente a biomassa celular após a centrifugação, foi ressuscitado em meio de cultivo *T. ethanolicus* (Tabela 4.1), e inoculado nos reatores R1 e R2. Os reatores foram inoculados com quantidade de biomassa padronizada, sendo 0,2 a 0,25 absorbância 600nm obtida por densidade óptica. Desta forma, a quantidade de inóculo centrifugado foi equivalente a manter densidade óptica de 0,25 absorbância após a inoculação em meio líquido.

Os reatores em batelada R1 e R2 foram preparados em frascos de 500 ml, fechados com tampa de butila, mantendo o volume de 50% de meio reacional e 50% de *headspace*. O *headspace* foi preenchido com N₂ (100%). Os reatores foram incubados em estufa a 55°C por período de 5 dias. O volume reacional dos reatores foi aumentado gradativamente até obtenção de 1.000 ml, sendo que a cada aumento, a cultura microbiana era centrifugada e inoculada nas mesmas condições descritas anteriormente. Este enriquecimento teve como objetivo o crescimento celular em substrato xilose e celobiose e identificar os produtos formados.

Figura 4.2 Fluxograma etapa de reativação do inóculo



Fonte: Elaboração própria

4.4 Isolamento de bactérias fermentativas

As técnicas utilizadas para isolar culturas de bactérias anaeróbias e termófilas foram adaptação ao meio de cultivo específico, diluição seriada em condição anaeróbia e plaqueamento por semeadura e detalhadas a seguir.

4.4.1 Adaptação ao meio de cultura

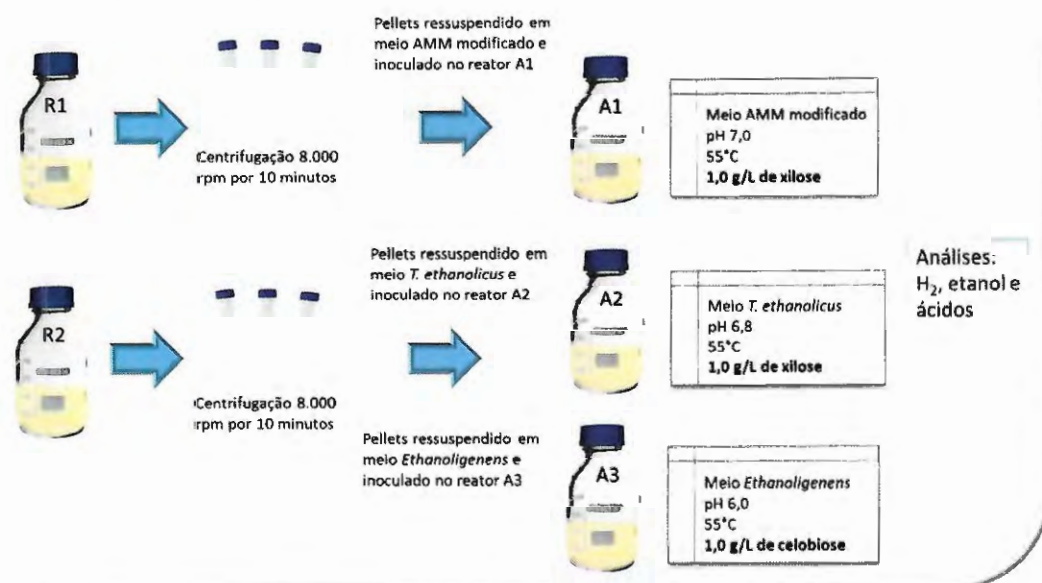
A figura 4.3 ilustra as etapas da fase de adaptação dos inóculos aos meios de cultivo.

Os consórcios microbianos anteriormente reativados, R1 e R2, foram submetidos a centrifugação a 8.000 rpm por 5 minutos, e seguidos assim para a montagem dos ensaios de adaptação. Os consórcios R1 e R2, foram adaptados aos meios de cultura relatados nas Tabelas 4.1, 4.4 e 4.9, sendo que R1 foi adaptado ao meio AMM modificado (Adaptação A1) com 1,0 g/L de xilose (6,6 mmol/L) e pH 7 e R2 ao meio *T. ethanolicus* suplementado com 1,0 g/L (6,6 mmol/L) de xilose e pH 6,8 (Adaptação A2) e ao meio *Ethanoligenens* utilizando 1,0 g/L de celobiose (2,92 mmol/L) e pH 6,0 (Adaptação A3).



Os ensaios de adaptação ao meio foram preparados em frascos de 2.000 ml, com volume reacional de 1.000 ml, submetidos a borbulhamento e preenchimento de *headspace* com N₂ (100%) e fechados com tampa de butila, em condições de anaerobiose. A temperatura de incubação foi de 55°C para todos os reatores. Foram mantidas condições estéreis nesta etapa do trabalho, sendo todo o material autoclavado anteriormente à 121°C por 20 minutos, e filtração dos meios de cultivo em membrana de 0,22 µm de diâmetro de poro. O período de adaptação ao meio foi de aproximadamente 10 dias, realizando ciclos de fermentação a cada 48 horas.

Figura 4.3 Fluxograma da etapa de adaptação em meios de cultivos



Fonte: Elaboração própria

4.4.2 Diluição seriada

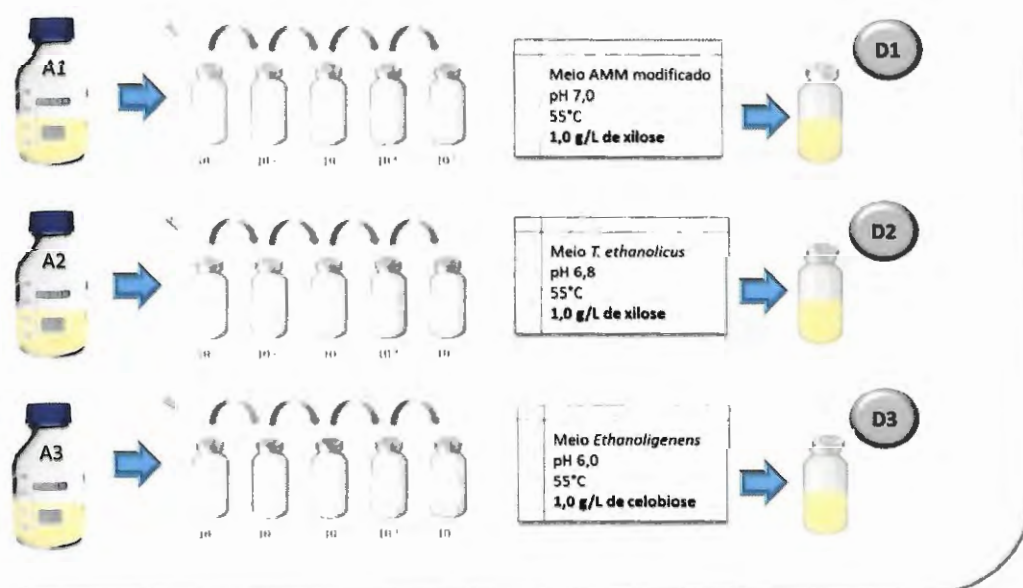
Na etapa de diluição seriada, para a diluição D1 foram preparados 10 frascos com meio de cultivo AMM modificado (Tabela 4.4) correspondendo a diluição na escala de 10⁻¹ a 10⁻¹⁰, alimentados com 1,0 g/L (6,6 mmol/L) de xilose e inoculados com a cultura adaptada A1. Para a diluição D2 e D3, foram preparados 10 frascos com o meio de cultivo *T. ethanolicus* (Tabela 4.1) e 10 frascos com o meio *Ethanaligenens* (Tabela 4.9), alimentados com 1,0 g/L (6,6 mmol/L) de xilose e 1,0 g/L (2,92 mmol/L) de celobiose, e inoculados com as culturas A2 e A3, respectivamente.

Os frascos continham 40 ml de volume total, e manteve-se a relação de 50% de volume reacional e 50% de volume de *headspace*. As condições foram mantidas estéreis, com todos os

materiais autoclavados à 121°C por 20 minutos. Os meios de cultivo foram filtrados em membrana 0,22 µm. Os reatores foram submetidos a atmosfera de N₂ (100%), e fechados com tampa de butila.

Os reatores referentes a diluição 10⁻¹ foram inoculados com 2 ml das culturas adaptadas A1, A2 e A3, referente a 10% de volume reacional, respeitando os respectivos ensaios de diluição D1, D2 e D3. Sequencialmente, os reatores seguiram a ordem de diluição e o volume de 2 ml da cultura para 18 ml de meio de cultivo (Figura 4.4). Os reatores foram incubados à 55°C por 7 dias.

Figura 4.4 Fluxograma da etapa de diluição seriada



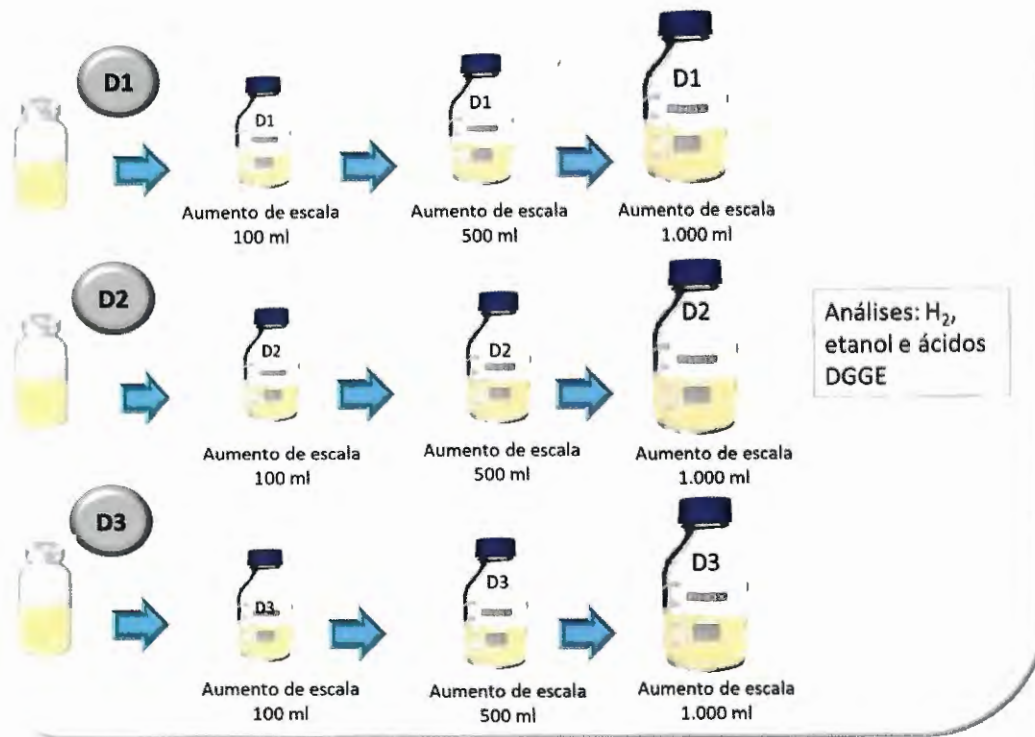
Fonte: Elaboração própria

Para a última diluição, na qual foi observada turvação do meio de cultura foi utilizada para obtenção de colônias isoladas via plaqueamento. Desta forma, foram selecionados para o plaqueamento: - um frasco referente a última diluição da etapa de diluição D1, um frasco referente a última diluição D2 e um frasco referente a última diluição da etapa de diluição D3.

Ao todo, foram 3 diluições selecionadas e submetidas ao aumento de massa celular, por meio do aumento gradativo do volume do reator para 100 ml, 500 ml e 1.000 ml. Para isso, foram preparados reatores em batelada mantendo-se sempre os meios específicos de cada diluição e seus respectivos substratos (xilose ou celobiose), em condições estéreis, anaeróbias e termófilas (55°C). Antes de cada aumento, o inóculo era centrifugado a 8.000 rpm por 5 minutos, e ressuspensionado em meio de cultura e inoculados nos reatores em escala aumentada.

Por fim, foram analisados os produtos formados nas fases gasosa e líquida, além de análises de biologia molecular, conforme descritas a seguir.

Figura 4.5 Fluxograma de aumento de escala de diluições seriadas



Fonte: Elaboração própria

4.4.3 Plaqueamento

Nesta etapa, utilizou-se D1, D2, e D3 selecionados na etapa anterior. Foram preparadas 10 placas de Petri com meio de cultivo AMM modificado (Tabela 4.4) e 1,0 g/L (6,6 mmol/L) de xilose, 10 placas de Petri com o meio *T. ethanolicus* (Tabela 4.1) (Atlas, 2005)(Atlas, 2005)(Atlas, 2005)(Atlas, 2005)(Atlas, 2005)(Atlas, 2005) e 1,0 g/L (6,6 mmol/L) de xilose e mais 10 placas de Petri com o meio *Ethanoligenens* (Tabela 4.9) e 1,0 g/L (2,92 mmol/L) de celobiose. Em todos os meios foram acrescentados agarose (2%). Todo o procedimento foi preparado em condições estéreis, com placa de Petri estéril e descartável. As condições de esterilização do meio de cultivo foram as mesmas descritas anteriormente.

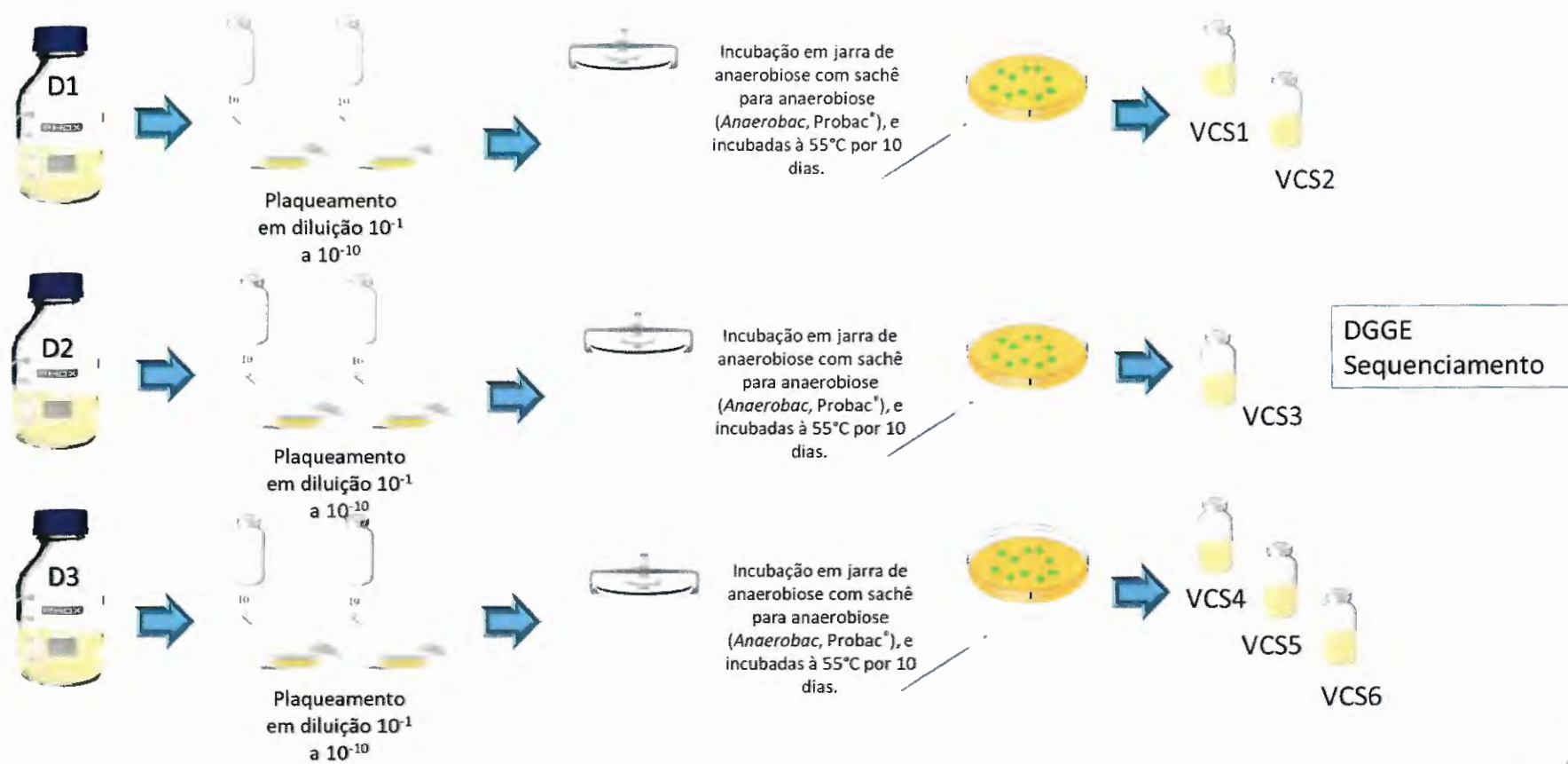
Em seguida, preparou-se o mesmo procedimento de diluições seriadas descritos anteriormente, sendo 10 frascos para cada meio de cultivo e substrato, referindo-se as diluições

10^{-1} a 10^{-10} . As culturas D1, D2 e D3 foram diluídas novamente nesta etapa, e cada diluição foi plaqueada por semeadura nas placas de Petri (Figura 4.6). As placas de Petri foram armazenadas em jarra de anaerobiose com sachê para anaerobiose (*Anaerobac*, Probac®), e incubadas à 55°C por 10 dias.

Após período de incubação, as colônias formadas na última diluição da placa de Petri foram coletadas com o auxílio de alça de platina e inoculadas em frascos de 30 ml, com 10 ml de meio reacional, por 7 dias, com seus respectivos meios de cultivo e substrato (1,0 g/L ou 6,6 mmol/L de xilose e 1,0 g/L ou 2,92 mmol/L de celobiose), em condições estéreis, anaeróbias e termófilas. As colônias foram submetidas a extração de DNA para análise de DGGE e sequenciamento. As colônias isoladas foram nomeadas em VCS1, VCS2, VCS3, VCS4, VCS5 e VCS6 (Figura 4.6).

Após crescimento celular, as colônias isoladas foram armazenadas em eppendorf de 1 ml, na proporção de 50% de biomassa celular e 50% de glicerol. Manteve-se condições estéreis no preparo do armazenamento das colônias, utilizando eppendorfs descartáveis e autoclavados, e todo processo realizado próximo ao bico de Bunsen. As colônias foram identificadas e armazenadas sob refrigeração -80°C.

Figura 4.6 Fluxograma da etapa de plaqueamento



Fonte: Elaboração própria

4.5 Identificação filogenética

4.5.1 Extração de DNA

Para as amostras referentes as colônias VCS1, VCS2, VCS3, VCS4, VCS5 e VCS6, e para as condições de bioaugmentação da vinhaça bruta, o DNA genômico foi extraído baseado na metodologia descrita por Griffiths et al. (2000) modificada, utilizando fenol tamponado com Tris e clorofórmio. Para cada biomassa úmida coletada foi adicionado de 0,1 – 0,3 g de *glass beads*, 1 ml de PBS, 1 ml de fenol tamponado e 1 ml de clorofórmio. Em seguida, as amostras foram homogenizadas em vortex por 10 a 15 segundos e centrifugada por 10 minutos a 6.000 rpm à 4°C. Transferiu 1ml do sobrenadante para um novo tubo e adicionou 1 ml de fenol tamponado, seguido de breve agitação no vortex e centrifugação nas condições descritas anteriormente. Posteriormente, transferiu 800 µl do sobrenadante da etapa anterior para um novo tubo, acrescentou-se 800 µl de clorofórmio, e submeteu-se a agitação e centrifugação nas mesmas condições. Por fim, 300 µl do sobrenadante foi transferido para-novo tubo de plástico e adicionou 1000 µl de etanol 95% (gelado) e centrifugou-se por 10 minutos a 10.000 rpm à 4°C para precipitação do DNA. Após descartou-se o sobrenadante com cuidado e adicionou-se 500 µl de etanol 70% (gelado), centrifugou na mesma condição anterior. Depois descartou-se o sobrenadante e deixou o “pellet” de DNA secando a temperatura ambiente por 12 horas; O DNA foi eluído com tampão Tris e armazenadas a -20°C.

4.5.2 PCR e DGGE

Para o DGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante) do domínio *Bacteria* foi utilizado iniciadores 968FGC – 1401R (Nübel et al., 1996). A amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR) foi realizada nas configurações de pré-desnaturação a 95°C por 7 minutos, com 35 ciclos de desnaturação 94°C por 45 segundos, anelamento a 56°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto, extensão final a 72°C por 10 minutos, e resfriamento a 4°C (termociclador Eppendorf AG – 22331 Hamburg).

Para separação do fragmento alvo pela desnaturação parcial da dupla hélice, foi utilizada a técnica de DGGE (Muyzer et al., 1993). Os produtos da PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida com gradiente linear de desnaturante variando de 45 a 65%. A eletroforese foi realizada em voltagem constante de 75 V e temperatura de 60°C por 16 horas. A imagem do gel foi capturada por equipamento transiluminador L-PIX com iluminação UV. O perfil de

DGGE foi analisado no software Bionumerics 7.3. O coeficiente de similaridade e dendograma foram determinados usando o coeficiente de Correlação de Pearson e algoritmo de UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic averages*), respectivamente.

4.5.3 Sequenciamento

Para as colônias isoladas VCS1, VCS2, VCS3, VCS4, VCS5 e VCS6, após a purificação do produto da PCR (amplificado com o conjunto de iniciadores de 27F – 1492R (Lane, 1991), submeteu-se ao sequenciamento parcial do gene RNAr 16S pelo método Sanger, em parceria com o Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia da ESALQ, Universidade de São Paulo. O consenso das seqüências obtidas foram realizados por meio do programa SeqMan do software DNASTAR (Lasergene sequence analysis). As seqüências foram comparadas no Banco de Dados NCBI-database (National Center for Biotechnology Information) para aproximação da identidade filogenética com seqüências do RNAr 16S representado na base de dados Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequencias foram depositadas com os números de acessos de MK090539 – MK090544.

Para as amostras referentes a bioaumentação da vinhaça bruta por VCS1 e VCS6, o produto da PCR foi submetido a análise metagenômica em HiSeq PE250, na região 16S, utilizando como primers 341F e 806R, em parceria com laboratório Genone Biotechnologies, situado no município do Rio de Janeiro – RJ.

4.6 Caracterização morfológica e fisiológica

Após identificação filogenética, duas culturas isoladas foram selecionadas, VCS1 e VCS6, e submetidas a caracterização morfológica, a partir de visualização de imagem em microscopia de contraste de fase (microscópio Olympus BX60), equipado com câmera digital (Olympus DP74) e aplicou-se coloração de Gram seguindo o método DSM, 1991.

4.6.1 Cinética de Crescimento Celular

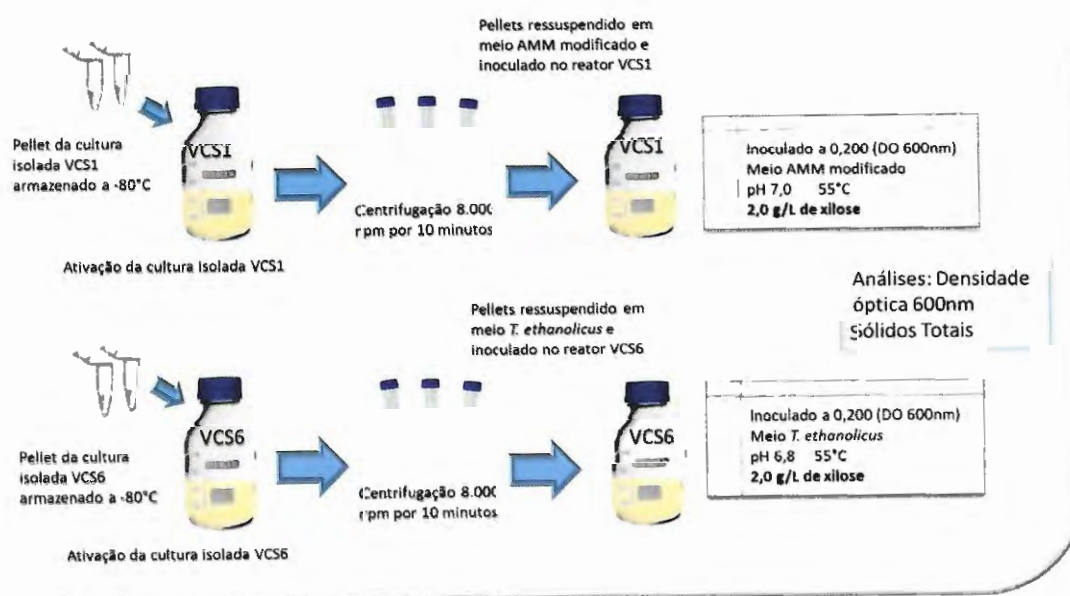
Para a inoculação dos reatores com a cultura isolada, utilizou-se eppendorfs referentes as culturas VCS1 e VCS6 armazenadas a -80°C. Estes foram centrifugados e suspendidos em PBS, com o intuito de lavar a biomassa e retirar todo glicerol utilizado nesta etapa. A cultura

foi adaptada nas condições de meio de cultivo, pH e temperatura, respectivos a suas condições de isolamento (Figura 4.7).

Os ensaios foram preparados em frascos de 1.000 ml, mantendo a relação 50% volume reacional e 50% volume de *headspace*. Para a cultura isolada VCS1, o meio de cultivo utilizado foi AMM modificado (Tabela 4.4), alimentado com 2,0 g/L (13,3 mmol/L) de xilose e ajustados a pH 7. Para a cultura isolada VCS6, o meio de cultivo foi *T. ethanolicus* (Tabela 4.1), pH 6,8, alimentado com 2,0 g/L (13,3 mmol/L) de xilose. Todos os reatores foram submetidos a atmosfera de N₂ (100%). Todos os ensaios foram preparados em condições estéreis como descritos anteriormente.

Os reatores foram preparados em batelada em triplicata, e inoculados com densidade celular inicial de 0,200 (absorbância 600 nm). Foi feita uma relação densidade celular / massa celular (mg/L) a partir da análise de sólidos totais. Os reatores foram incubados à 55°C e mantidos até estabilização de crescimento.

Figura 4.7 Cinética de crescimento celular das culturas isoladas VCS1 e VCS6



As amostras foram coletadas a cada 2 horas da fase líquida dos reatores, com seringa e agulha estéreis, e submetidas a leitura de absorbância a 600 nm em cubeta de quartzo.

Consequente, o tempo de geração e velocidade específica de crescimento foram calculados aplicando-se as equações 4.1 e 4.2 de acordo com Schmidellm et al., (2001), foram apresentados no anexo A e B deste trabalho:

$$\ln \frac{X}{X_i} = \mu m \cdot (t - t_i) \quad \text{Equação 4.1}$$

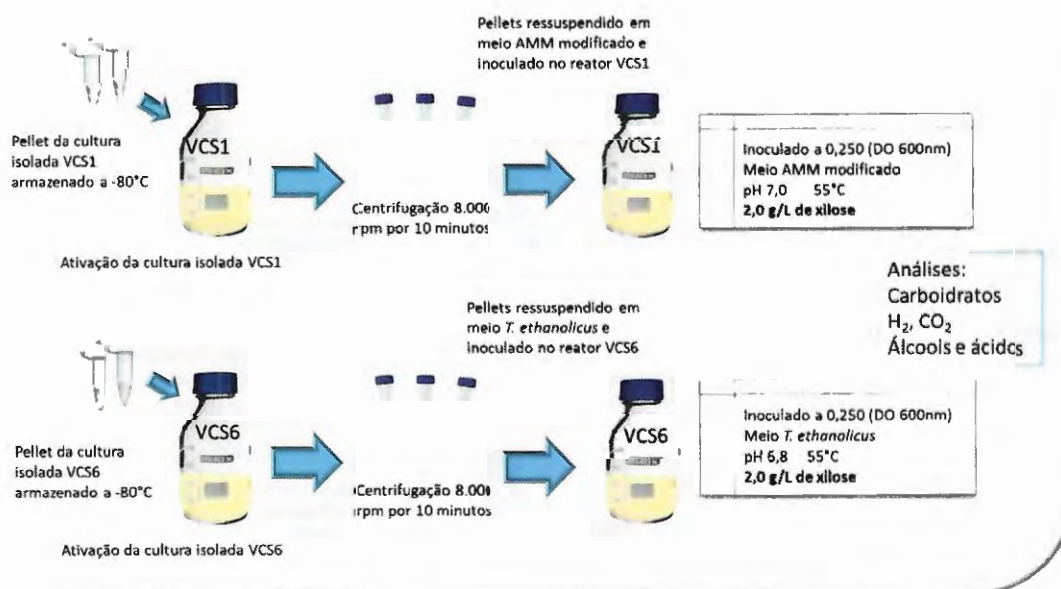
$$\mu m = \frac{\ln 2}{tg} \quad \text{Equação 4.2}$$

Sendo, X = concentração celular, X_i = concentração celular inicial, μm = velocidade específica de crescimento, t = tempo, t_i = tempo inicial, tg = tempo de geração.

4.6.2 Consumo de xilose e cinética de produção de metabólito

Um segundo ensaio similar ao descrito anteriormente foi preparado para analisar o consumo de xilose e a cinética de produtos a partir das culturas isoladas VCS1 e VCS6.

Figura 4.8 Características fisiológicas da culturas isoladas



Fonte: Elaboração própria

Para a inoculação dos reatores com a cultura isolada, utilizou-se eppendorfs referentes as culturas armazenadas a -80°C , como descrito anteriormente.

Preparou-se reatores em batelada, em frascos de 1.000 ml, sendo 50% correspondente ao volume reacional e 50% ao *headspace*. Manteve-se os meios de cultivos da etapa de isolamento, sendo AMM modificado (Tabela 4.4) para a cultura isolada VCS1 e meio *T. ethanolicus* (Tabela 4.1) para a cultura isolada VCS6. Ambos os ensaios foram preparados

utilizando 2,0 g/L (13,3 mmol/L) de xilose. Todos os reatores foram submetidos a atmosfera de N₂ (100%) e incubados à 55°C. Foram preparados reatores em batelada em triplicata para amostragem da fase líquida e reatores em triplicata para amostragem da fase gasosa. (Lazaro et al, 2014; Shaw et al, 2008). Os reatores foram inoculados com as culturas isoladas mantendo-se densidade celular inicial de 0,25 absorbância. Todos os materiais foram preparados em condições estéreis como descritos anteriormente.

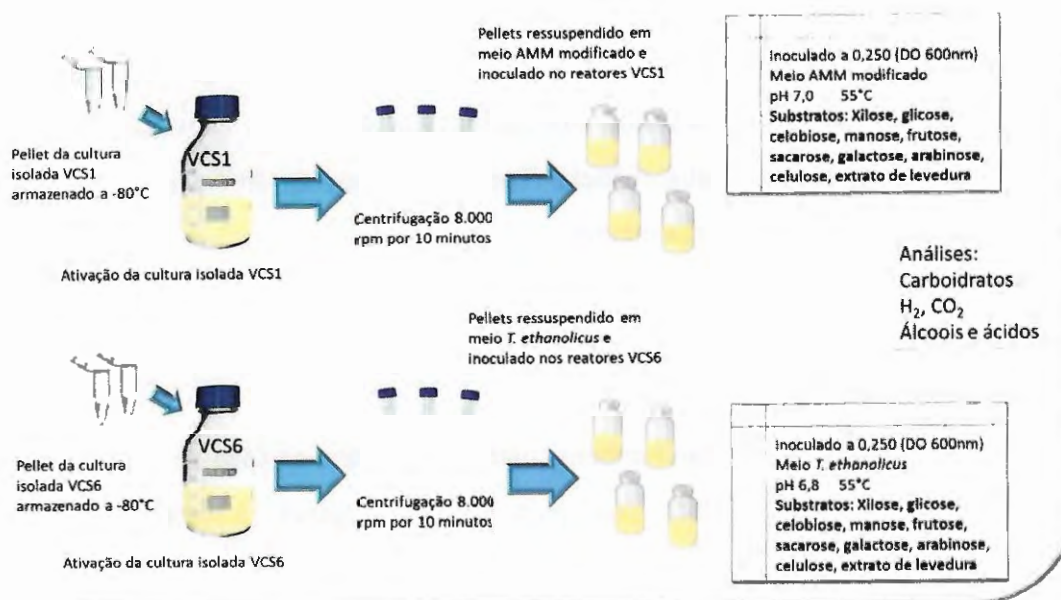
As amostras da fase líquida foram coletadas em condições estéreis, próximo ao bico de Bunsem, com o uso de seringas e agulhas estéreis, e as amostras foram armazenadas sob refrigeração -20°C para posterior análise.

As amostras da fase gasosa foram também coletadas próximo ao bico de Bunsem, com seringa adaptada com válvula de duas vias para coleta de gases, e foram analisadas imediatamente após coleta.

4.6.3 Degradação de substratos

As culturas isoladas VCS1 e VCS6 foram submetidas a caracterização fisiológica, na presença de diferentes substratos, tais como, xilose (6,6 mmol/L), glicose (5,55 mmol/L), celobiose (2,92 mmol/L), manose (5,55 mmol/L), arabinose (6,6 mmol/L), galactose (5,55 mmol/L), frutose (5,55 mmol/L), sacarose (2,92 mmol/L), celulose, considerando 1,0 g/L de cada um em ensaios separados, a fim de avaliar crescimento celular e degradação dos substratos. Celulose e extrato de levedura na concentração de 1,0 g/L (Figura 4.9).

Figura 4.9 Fluxograma consumo de substratos



Fonte: Elaboração própria

Os ensaios foram preparados em batelada, em frascos de 100 ml, com 50 ml de volume reacional, inoculados com a cultura isolada e mantidos em condições anaeróbias e termófilas (55°C). Todos os materiais utilizados foram autoclavados anteriormente à 121°C por 20 minutos.

Os meios de cultivo foram os mesmos utilizados na fase de isolamento e cinética de crescimento, sendo Meio AMM modificado para a cultura isolada VCS1 (Tabela 4.4) e meio *T. ethanolicus* para a cultura isolada VCS6 (Tabela 4.1). Os meios foram filtrados em membrana 0,22 µm, mantendo-se as condições estéreis.

No período de 12, 24, 36 e 48 horas foram coletadas amostras para análises dos compostos da fase gasosa (hidrogênio e dióxido de carbono), dos compostos da fase líquida (ácidos e álcoois) e amostra para análise de densidade celular, com leitura em absorvância a 600nm. As amostras foram obtidas respeitando-se as condições estéreis, com seringa e agulhas estéreis, próximo ao bico de Bunsen.

4.6.4 Planejamento Experimental

Para analisar a influência do pH inicial e concentração de substrato na formação de produtos, a cultura isolada VCS1 foi submetida à ensaios utilizando o modelo estatístico

referente à planejamento experimental em cinco níveis (+1; -1; 0; +1,42, -1,42), com duas repetições do ponto central, em ensaios em triplicatas.

Para a metodologia da superfície de resposta (delineamento de composto central rotacional), foram levados em consideração 2 fatores: concentração do xilose e pH, denotados como X_1 e X_2 , respectivamente. As concentrações de xilose foram 13,3 mmol/L, 36,6 mmol/L e 60,0 mmol/L, e as faixas de pH foram 6,2, 7 e 7,8 (Tabela 4.11). Os reatores em bateladas foram montados em condições estéreis, com todos os materiais autoclavados à 121°C por 20 minutos. Os frascos eram de 500 ml, com 50% de volume reacional, e 50% de headspace, submetido a atmosfera de N_2 (100%). O meio de cultivo utilizado foi AMM modificado (Tabela 4.4), ajustado ao pH indicado no delineamento, e filtrado em membrana 0,22 μ m. Os reatores foram incubados à 55°C por 48 horas, e as amostras foram coletadas a cada 2 horas aproximadamente, em condições estéreis.

A superfície de resposta e análise dos parâmetros (Teste F e ANOVA) foram feitos com auxílio do programa *Statistica*10 (StatSoftInc, 2014, USA). Os parâmetros foram considerados significativos para nível de significância (p) menor que 0,05. Análise de variância (ANOVA) foi realizada para testar a significância dos fatores (concentração de xilose e pH) no ajuste da reação polinomial de segunda ordem.

Tabela 4.10 Planejamento experimental do efeito da concentração de xilose e pH na formação de produtos finais para cultura isolada VCS1

Condições	Normalização	Concentração de xilose (mmol/L)	Normalização	pH inicial
C1	-1	13,3	-1	6,2
C2	-1	13,3	+1	7,8
C3	+1	60,0	-1	6,2
C4	+1	60,0	+1	7,8
C5	-1,42	3,66	0	7,0
C6	+1,42	69,5	0	7,0
C7	0	36,6	-1,42	5,9
C8	0	36,6	+1,42	8,1
C9	0	36,6	0	7,0
C10	0	36,6	0	7,0

4.6.5 Aplicação na vinhaça

A vinhaça de cana-de-açúcar foi adquirida junto a Usina São Martinho, Pradópolis, São Paulo.

A vinhaça bruta foi submetida a processo de esterilização, a fim de inibir a atividade microbiana da própria vinhaça, sendo está submetida a autoclave à 121°C por 20 minutos. Resultando em duas condições de vinhaça: vinhaça bruta e vinhaça estéril.

A caracterização da vinhaça seguiu metodologia referente a determinação de DQO, carboidratos totais, glicerol, fenol, e metabólitos voláteis como ácidos e álcoois.

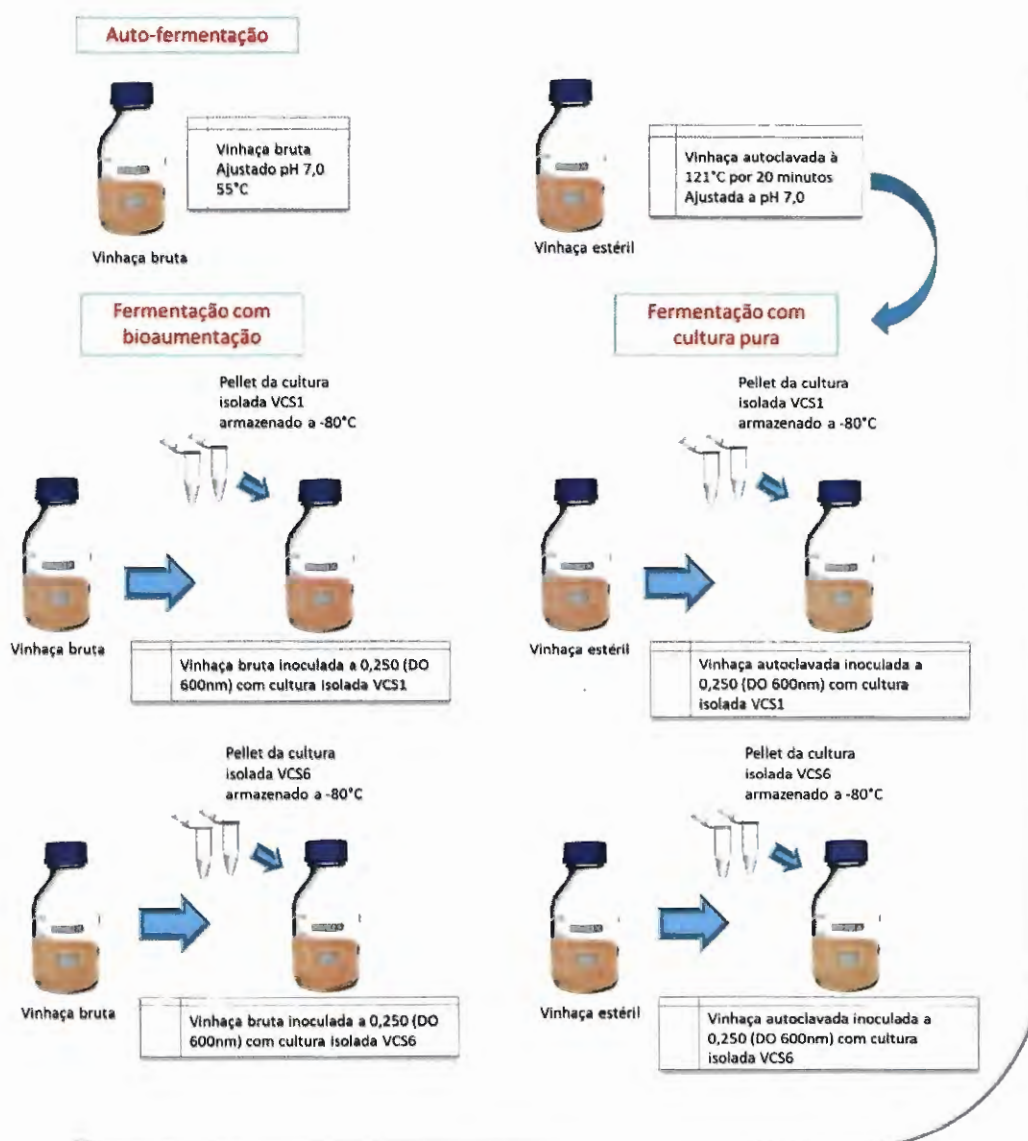
Para os ensaios foram preparados reatores em batelada, com frascos de 500 ml, sendo 50% volume reacional e 50% em *headspace* preenchido com N₂ (100%). Ambos em triplicata e anteriormente esterilizados.

A variação das condições dos reatores foram:

- Auto-fermentação: preparados com 250 ml de vinhaça bruta em condições anaeróbias
- Bioaumentação 1: preparados com 250 ml de vinhaça bruta e inoculados com a cultura isolada VCS1, com 213 mg/L de massa celular (0,250 abs).
- Bioaumentação 2: preparados com 250 ml de vinhaça bruta e inoculados com a cultura isolada VCS6, com 213 mg/L de massa celular (0,250 abs).
- Cultura pura 1: preparados com 250 ml de vinhaça estéril e inoculados com a cultura isolada VCS1, com 213 mg/L de massa celular (0,250 abs).
- Cultura pura 2: preparados com 250 ml de vinhaça estéril e inoculados com a cultura isolada VCS6, com 213 mg/L de massa celular (0,250 abs).

As condições de fermentação foram melhores detalhadas na figura 4.10.

Figura 4.10 Fluxograma da etapa de aplicação das culturas isoladas VCS1 e VCS6 em vinhaça de cana-de-açúcar, nas condições de bioaumentação em vinhaça bruta e cultura pura em vinhaça estéril



Fonte: Elaboração própria

Todos os reatores foram incubados a 55°C por 96 horas. Para fase gasosa, foram realizadas coletas a cada 4 horas com seringa estéril adaptada com válvula de duas vias para coleta de gases, e foram analisadas imediatamente após coleta.

Para as amostras da fase líquida, foram mantidas condições estéreis, com seringas e agulhas estéreis, coletadas próximo ao bico de Bunsen, no período de 24, 48, 72 e 96 horas.

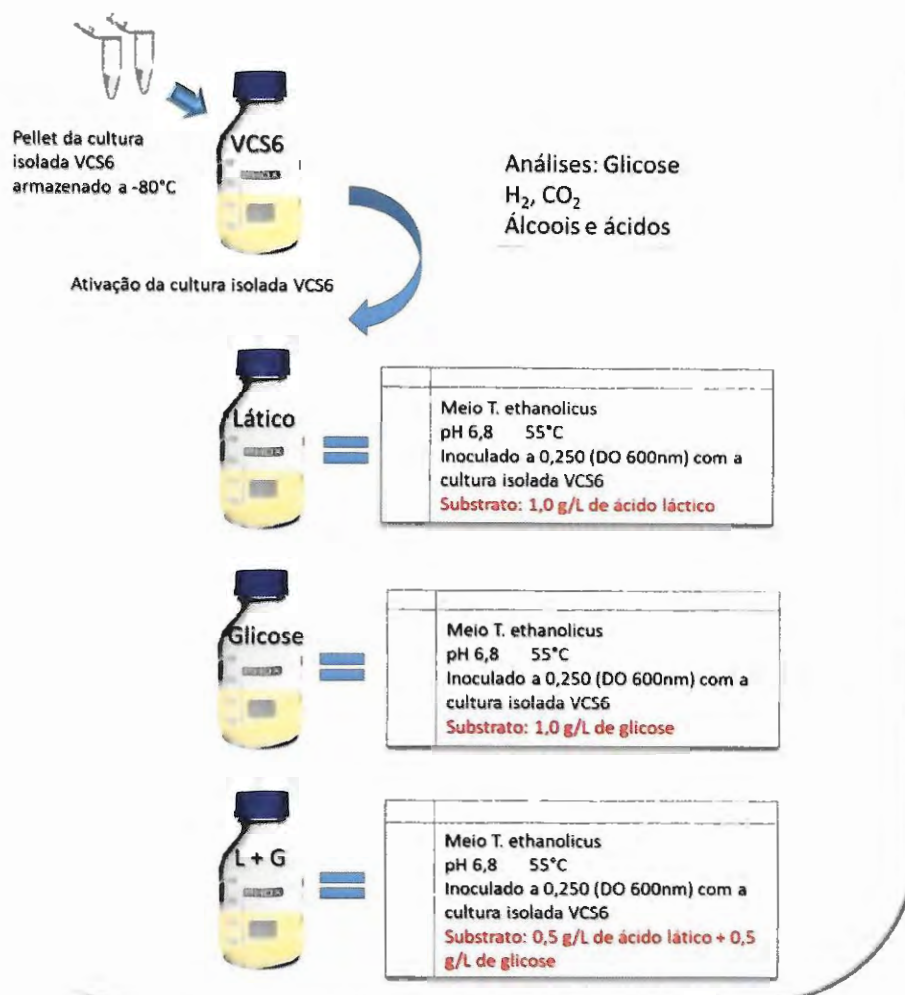
Foram analisados os seguintes parâmetros: hidrogênio, gás carbônico, metano, álcoois e ácidos, DQO, carboidratos, glicerol, fenol e pH. Por fim, as amostras referentes a bioaumentação foram submetidas a análise de sequenciamento RNAr 16S.

4.6.6 Consumo de ácido láctico

Foram preparadas 3 condições de reatores em batelada sendo um alimentado com ácido láctico (1,0 g/L ou 11,10 mmol/L), outro alimentado com glicose (1,0 g/L ou 5,5 mmol/L) e por fim, ácido láctico mais glicose (0,5 g/L cada substrato ou 5,5 mmol/L de ácido láctico e 2,77 mmol/L de glicose) (Figura 4.11).

Foram utilizados frascos de 1.000 ml, sendo 50% de volume reacional e 50% de *headspace*. Os reatores foram preparados a fim de manter anaerobiose, com borbulhamento e preenchimento de *headspace* com N₂ (100%). Utilizou-se meio de cultivo *T. ethanolicus*, a pH 6,8 e temperatura de 55°C. Manteve-se condições de esterilidade, com todos os materiais autoclavados anteriormente ao preparo e meio de cultivo filtrado em membrana de 0,22 µm. Foram inoculados com a cultura isolada VCS6, na proporção de 213 mg/L de massa celular (0,250 abs). Foram coletadas amostras do meio líquido e gasoso em um período de 72 horas. As amostras líquidas foram coletadas com seringas e agulhas estéreis, e as amostras foram armazenadas em refrigeração -20°C, para posterior análise. As amostras gasosas foram coletas com seringa equipada com válvula on/off para coleta de gás, e analisadas imediatamente.

Figura 4.11 Fluxograma da etapa de consumo de ácido láctico por cultura isolada VCS6



Fonte: Elaboração própria

4.7 Análises cromatográficas

4.7.1 Determinação de ácidos orgânicos voláteis e álcoois

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

A determinação de glicose, ácido butírico, ácido acético e ácido láctico, na etapa de consumo de ácido láctico, foi realizada em HPLC (Shimadzu®) equipado com coluna Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm, BioRad) e software Class-VP (Shimadzu). Os ácidos orgânicos foram aferidos em detector SDP-M10 AVP e os álcoois em detector RID-10A. Foi utilizado ácido sulfúrico 0,005M como fase móvel e as condições operacionais da coluna foram fluxo de 0,5 mL/min e 43°C.

4.7.2 Determinação do biogás

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

4.8 Análises físico-químicas

As análises de pH, DQO, fenóis, glicerol e sólidos totais (ST) foram feitas de acordo com Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater (2005). Para quantificar os substratos utilizados nos ensaios, empregou-se a determinação de carboidrato por espectrofotometria (Dubois et al, 1956).

4.9 Ajuste ao modelo de Gompertz e avaliação dos métodos estatísticos

Os dados de produção de hidrogênio, etanol e ácidos foram estatisticamente avaliados pelo teste One-way ANOVA, com coeficiente de similaridade de 95%. Os dados também foram aplicados ao Modelo Matemático de Gompertz, modificado por Zwietering et al (1990), aplicado a produção de etanol por Olaoye e Kolawole (2013), de acordo com a equação 4.3, a fim de obter valores de Potencial Máximo de Produção (P), Taxa Máxima de Produção (Rm) e fase de adaptação ao substrato (λ), sendo y = concentração e e = constante (2,71828182).

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

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Reativação do inóculo

A partir da reativação do consórcio microbiano nas condições com 6,66 mmol/L de xilose (R1) e 2,92 mmol/L de celobiose (R2), obteve-se produção de hidrogênio, etanol, ácido acético e CO₂. As concentrações de ácido butírico e ácido propiônico ficaram abaixo da faixa de detecção do equipamento (Anexo IV). Para as condições do reator R1 observou-se 12,36 mmol de H₂ acumulado, 4,93 mmol/L de etanol e 7,53 mmol/L de ácido acético. Para o reator R2 com celobiose observou-se 8,28 mmol de H₂ acumulado, 9,37 mmol/L de etanol e 7,55 mmol/L de ácido acético. Observou-se diferença nos metabólitos formados em relação ao obtido por Silva et al (2018), uma vez que a produção de hidrogênio após a reativação a partir de xilose foi significativa, não obteve formação de metano, e a concentração em etanol foi menor do que a relatada pelos autores (4,93 mmol/L contra 12,38 mmol/L) (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 Comparação de produção de metabólitos entre consórcio microbiano enriquecido por Silva et al (2018) e reativação do consórcio

	Etanol (mmol/L)	Ácido acético (mmol/L)	Ácido propiônico (mmol/L)	Ácido butírico (mmol/L)	H ₂ (mmol)	CH ₄ (mmol)	Ref.
Consórcio enriquecido a partir de lodo							
Glicose (5,5 mmol/L)	10,86	7,8	3,62	1,4	2,81	L/D	Silva et al (2018)
Xilose (8,0 mmol/L)	12,38	14,96	2,13	0,76	0	5,55	Silva et al (2018)
Celulose (1,0 g/L)	2,27	16,14	5,87	1,66	L/D	14,78	Silva et al (2018)
Reativação do inóculo							
Xilose (6,6 mmol/L)	4,93	7,53	L/D	L/D	12,36	L/D	Neste estudo
Celobiose	9,37	7,55	L/D	L/D	8,28	L/D	Neste estudo

A produção de hidrogênio também foi observada na reativação a partir de celobiose (8,28 mmol), seguida de etanol (9,37 mmol/L) e ácido acético (7,55 mmol/L). O consórcio microbiano enriquecido por Silva et al (2018) foi caracterizado como um consórcio produtor de etanol, devido aos eficientes rendimentos deste metabólito, entretanto, ao ser reativado nas

condições impostas neste trabalho, o rendimento em etanol foi menor, com predomínio da produção de hidrogênio (Tabela 5.1).

Esta diferença na produção de metabólitos provavelmente ocorreu devido ao armazenamento do consórcio microbiano enriquecido por Silva et al (2018), no qual utilizou a condição de refrigeração em 4°C para manutenção e conservação de microrganismos. Esta técnica é comum em ensaios de microbiologia e armazenamento de culturas por período de até 210 dias, entretanto, não garante a estabilidade da cultura microbiana, requerendo assim, estudos que determinem mutações genéticas, perda de características bioquímicas e viabilidade celular (Bassani et al., 2019).

5.2 Isolamento

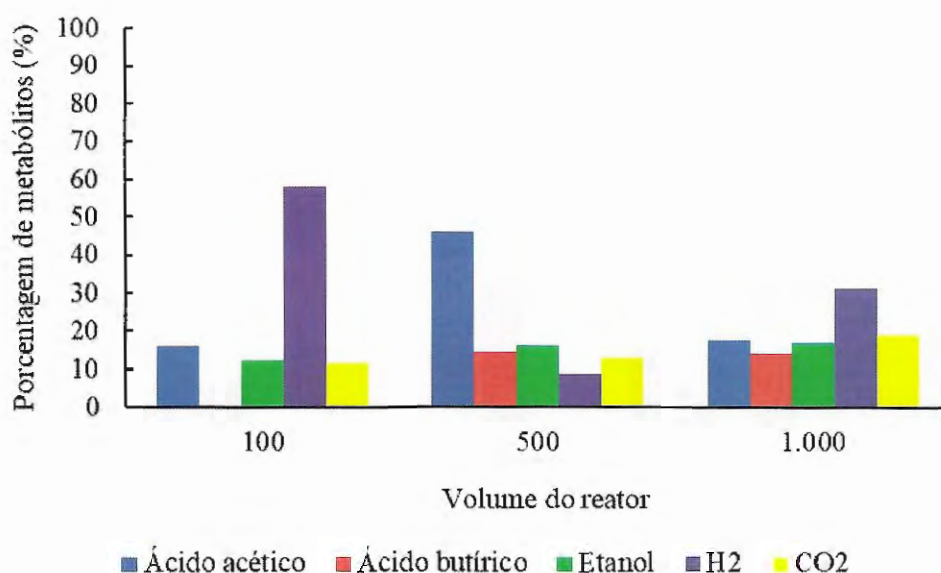
5.2.1 Adaptação ao meio de cultivo e diluição seriada

Após etapa de reativação, os consórcios R1 e R2 foram submetidos a adaptação a específicos meios de cultura (A1, A2 e A3) seguida da etapa de diluições seriadas (D1, D2 e D3) (Figura 4.3 e 4.4).

O ensaio D1, referente a cultura adaptada A1 em meio de cultivo AMM modificado (Tabela 4.4), alimentado com 1,0 g/L de xilose (6,6 mmol/L), ajustado a pH 7 e incubado a 55°C, obteve após 7 dias turvação do meio nas diluições de 10^{-1} a 10^{-6} , indicando assim crescimento celular, e a partir da diluição 10^{-7} , não observou turvação.

A cultura microbiana referente a diluição 10^{-6} cultivada na condição D1, foi submetida a aumento de escala a fim de favorecer o crescimento e a estabilização da cultura. No decorrer dessa etapa, observou-se variação no percentual de produtos metabolizados a partir da xilose, e produção significativa de ácido butírico (14%) a partir da escala de 500 ml (Figura 5.1).

Figura 5.1 Porcentagem de metabólitos em função do aumento de volume do reator a partir da diluição 10^{-6} referente a cultura D1 em meio AMM modificado com 6,6 mmol/L de xilose

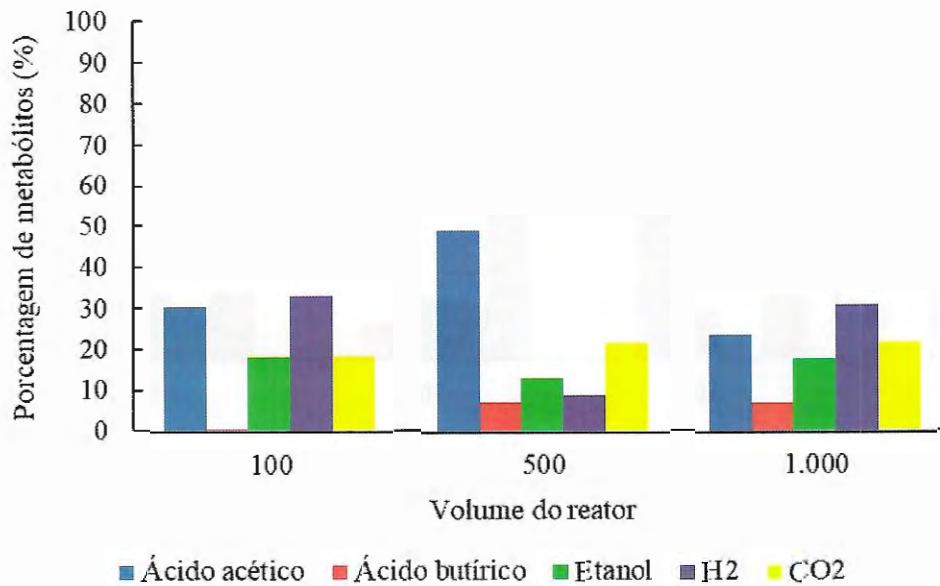


Fonte: Elaboração própria

Em relação a cultura D2, adaptada e diluída em meio *T. ethanolicus* (Tabela 4.1), alimentado com 6,6 mmol/L de xilose em pH 6,8 e incubado à 55°C, obteve-se turvação do meio nas diluições 10^{-1} a 10^{-8} . Não observou-se crescimento celular nas diluições 10^{-9} e 10^{-10} .

A cultura referente a diluição 10^{-8} foi submetida ao aumento de escala e sob tais condições não foi observada interferência do aumento do volume reacional na proporção de etanol e hidrogênio, porém, foi observado aumento na proporção de ácido butírico, de 0,89 % para 7,43 e 6,91% em 500 e 1.000 ml. (Figura 5.2).

Figura 5.2 Porcentagem de metabólitos em função do aumento de volume reacional a partir da diluição 10^{-8} referente a cultura D2 em meio *T. ethanolicus* alimentado com 6,6 mmol/L de xilose

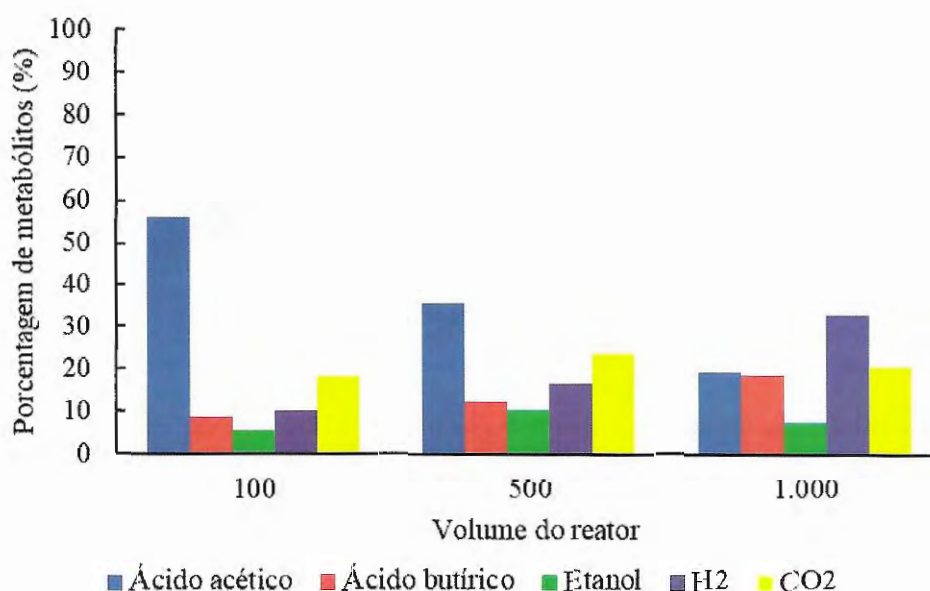


Fonte: Elaboração própria

Para a cultura D3, em meio *Ethanoligenens* (Tabela 4.9) e 2,92 mmol/L de celobiose, em pH 6 à 55°C, observou-se crescimento celular de 10^{-1} a 10^{-6} . No aumento de escala da diluição 10^{-6} , constatou aumento da proporção de ácido butírico, com aumento considerável na proporção de hidrogênio, de 10,2% para 33,2% em 1.000 ml, e uma menor proporção de ácido acético, que variou de 56,6% para 19,4% na escala maior (Figura 5.3).

Desta forma, observou-se que as culturas submetidas a adaptação ao meio de cultivo e diluições seriadas produziram principalmente etanol e hidrogênio, e mesmo estas submetidas a diferentes meios de cultivo e substrato, não obteve-se variação na proporção de produção de metabólitos, mantendo o predomínio de hidrogênio (maior que 30%). Resultado este similar ao apresentado na etapa de reativação do consórcio.

Figura 5.3 Porcentagem de metabólitos em função do aumento de volume partir da diluição 10^{-6} em D3 em meio *Ethanoligenens* com 2,92 mmol/L de celobiose



Fonte: Elaboração própria

A partir da análise da similaridade pela técnica de DGGE, foi possível observar como as condições do meio de cultivo e substrato, impostas aos consórcios R1 e R2, interferiram no índice de riqueza (Chao-1) e na similaridade entre as populações.

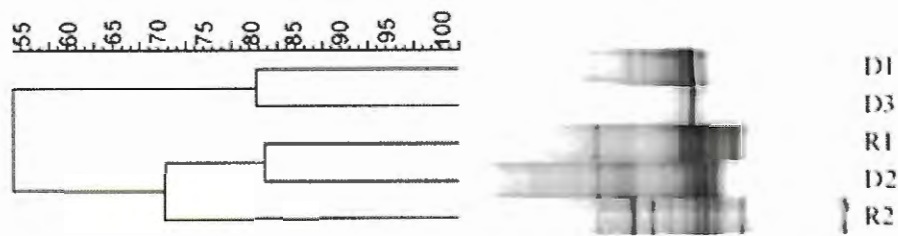
Inicialmente, para R1 e R2, observou-se índice de riqueza (Chao-1) de 15 e 20, respectivamente, e similaridade de 73%. Ressalta-se que ambos os consórcios reativados partiram de um mesmo consórcio enriquecido anteriormente por Silva et al (2018), e na etapa de reativação manteve-se o meio de cultivo *T. ethanolicus* e diferenciou apenas o substrato em xilose e celobiose (Figura 5.4).

Os índices de riqueza diminuíram à medida que os consórcios foram submetidos a etapa de adaptação ao meio de cultivo e diluição seriada. Para o ensaio D1, o índice de riqueza observado foi 10, e similaridade de 51% em relação ao consórcio R1 (Figura 5.4 e 5.5). Neste ensaio o substrato xilose foi igual para as duas condições, entretanto, variou o meio de cultivo, sendo *T. ethanolicus* (Tabela 4.1) para R1 e AMM modificado (Tabela 4.4) para D1.

Figura 5.4 Dendrograma representando a similaridade genética (Correlação de Pearson) para o Dominio Bacteria a partir do perfis de bandas do DGGE.

R1: amostra de consórcio inicial enriquecido com xilose. R2: amostra de consórcio inicial enriquecido com celobiose. D1: amostra da etapa de diluição seriada referente a cultura R1, meio AMM

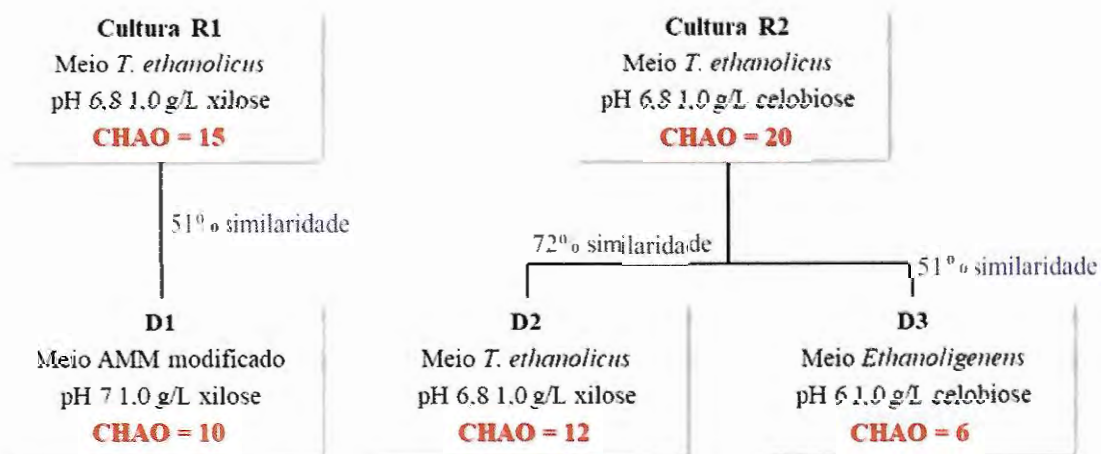
modificado e xilose. D2: amostra da etapa de diluição seriada referente a cultura R2, meio *T. ethanolicus* e xilose. D3: amostra da etapa de diluição seriada referente a cultura R2, meio *Ethanoligenens* e celobiose.



Fonte: Elaboração própria

Para a cultura do ensaio D2, observou-se índice de riqueza de 12 e similaridade com a cultura R2 de 72%. Nesta etapa, o meio de cultivo foi *T. ethanolicus* (Tabela 4.1) para as duas culturas, e modificou-se a fonte de carbono de celobiose para xilose.

Figura 5.5 Índices de Riqueza em relação a cada etapa de isolamento



Fonte: Elaboração própria

Por fim, na cultura referente a diluição D3, o índice de riqueza foi o menor observado, Chao-1 = 6, com uma diminuição significativa em relação ao consórcio inicial (Chao-1 = 20). Nesta etapa, manteve-se como substrato a celobiose, entretanto, o meio de cultivo para D3 foi o meio *Ethanoligenens*, ajustado a pH 6,0, este suplementado com concentrações altas de nitrogênio orgânico, sendo 4,0 g de triptona, 2,0 g de extrato de carne e 1,0 g de extrato de levedura.

Concluiu-se que as condições impostas às culturas D1, D2 e D3, referentes a meio de cultivo e substrato, interferiram na diversidade de microrganismos, de forma que favoreceu a produção de ácido butírico e diminuiu o índice de riqueza das culturas, entretanto, não indicaram uma cultura isolada.

Schoenborn et al., (2004) avaliaram técnicas de isolamento para bactérias provenientes de solo, e concluíram que a técnica de diluição seriada favorece o isolamento de estirpes que crescem mais rapidamente que outras, tornando assim, difícil o isolamento por nível de espécie. Esta seleção com base na taxa de crescimento não é significativa na técnica de plaqueamento, uma vez que as culturas se desenvolvem separadas espacialmente de forma independente.

Desta forma, optou-se por mais uma etapa de isolamento, uma vez que a técnica de diluição seriada não foi suficiente para assegurar o isolamento de cultura.

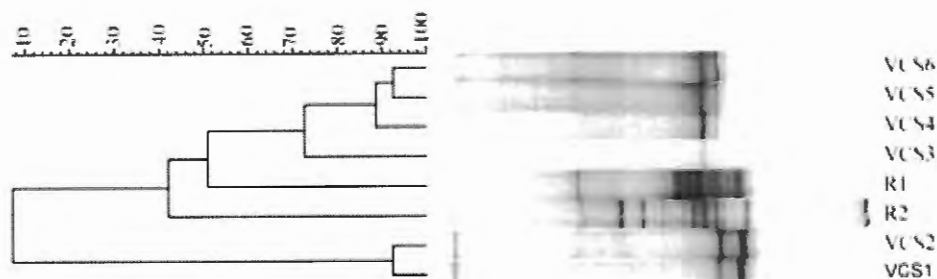
5.2.2 Plaqueamento por semeadura

Nesta etapa, as culturas obtidas a partir da adaptação ao meio e diluição seriada, foram submetidas a nova diluição, seguida de plaqueamento por semeadura. Após 10 dias de incubação em condições anaeróbias e termófilas (55°) obteve-se distintas colônias, com a seguinte descrição: VCS1 e VCS2 para colônias obtidas a partir da cultura adaptada ao meio AMM modificado, pH 7 e 6,6 mmol/L de xilose (D1), VCS3, colônia referente a cultura em meio *T. ethanolicus*, pH 6,8 e 6,6 mmol/L de xilose (D2), e VCS4, VCS5, VCS6, para meio *Ethanoligenens*, pH 6 e 2,92 mmol/L de celobiose (D3).

Observou-se similaridade de 92% entre as populações de VCS1 e VCS2, e apenas 7% de similaridade em relação ao inóculo inicial reativado com xilose (R1). Para as populações VCS5 e VCS6 obteve-se 93% de similaridade, as quais foram 89% similares a população VCS4. Apenas para população VCS3 observou-se a similaridade de 73% em relação as demais populações, das quais foram isoladas a partir do mesmo inóculo inicial (R2) (Figura 5.6).

Figura 5.6 Dendrograma representando a similaridade genética (Correlação de Pearson) para o Domínio Bacteria a partir do perfis de bandas do DGGE.

R1: amostra de consórcio inicial enriquecido com xilose. R2: amostra de consórcio inicial enriquecido com celobiose. VCS1, VCS2, VCS3, VCS4, VCS5, VCS6: colônias isoladas na etapa de plaqueamento.



Fonte: Elaboração própria

A partir do índice de riqueza, Chao-1, observou-se a menor diversidade entre as colônias obtidas nas etapas de isolamento, sendo menor índice para a colônia VCS4 (Chao-1 = 2), seguida de VCS3, VCS5 e VCS6 (Chao-1 = 3), e por fim as colônias VCS1 e VCS2 (Chao-1 = 4).

Sendo assim, concluiu-se que todas as etapas de isolamento influenciaram na diversidade das culturas, minimizando os valores dos índices de riqueza (Chao-1), e aproximando as similaridades entre as colônias isoladas a partir do mesmo inóculo. Portanto, optou-se em sequenciar as colônias a partir do gene 16S rRNA, afim de obter a identificação filogenética das colônias isoladas.

5.2.3 Sequenciamento

As colônias foram submetidas a análise de sequenciamento parcial do gene 16S RNAr 16S e comparação com o Banco de Dados NCBI-database. Obteve-se 99% de similaridade (100% das sequências submetidas ao programa foram alinhadas) das culturas VCS1 e VCS2 a *Thermanaerobacterium calidifontis*. Para bactérias das colônias VCS4, VCS5, VCS6 obteve-se 100% de similaridade a *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (query cover 100%). Para as bactérias da colônia VCS3, a semelhança foi a mesma obtidas para VCS4, VCS5 e VCS6, todavia com similaridade de 99% a *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (Figura 5.7).

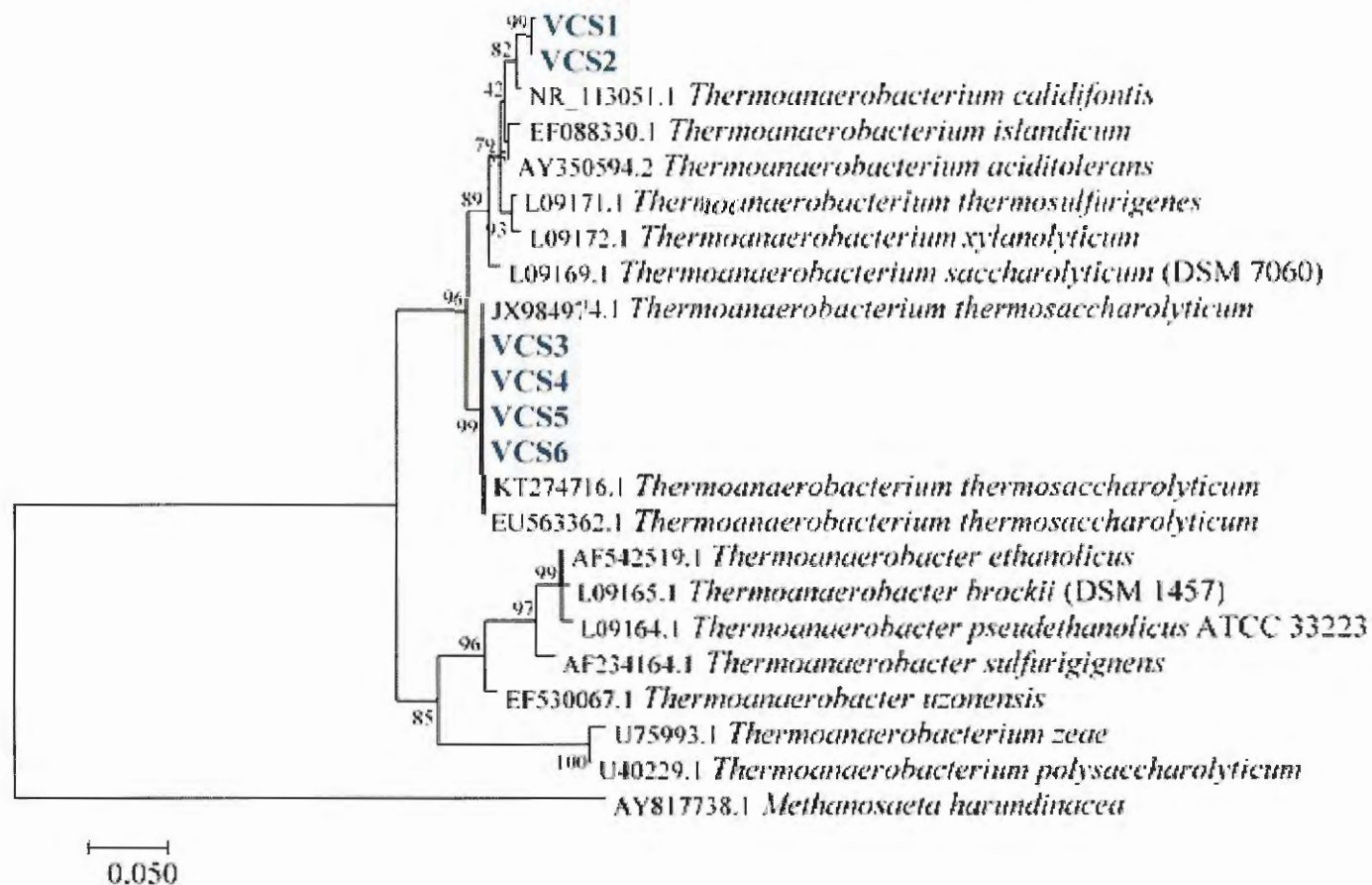
Para o gênero *Thermoanaerobacterium* tem-se apenas 9 espécies catalogadas a saber: *T. aciditolerans*, *T. aotearoense*, *T. saccharolyticum*, *T. thermosaccharolyticum*, *T. thermosulfurigenes*, *T. xylanolyticum*, *T. thermostercoris*, *T. islandicum* e *T. polysaccharolyticum* no banco de dados do centro de pesquisa mundial DSMZ (German Collection of Micro-organism and Cell Cultures) (DSMZ, 2018).

T. calidifontis foi primeiramente relatada por Shang et al., em 2013 e foi isolada a partir de sedimentos e águas termais na China. Os autores classificaram-a como bactéria produtora de etanol.

T. thermosaccharolyticum foi primeiramente isolada a partir de amostras de solo e classificada como *Clostridium thermosaccharolyticum* por McClung (1935), e reclassificada como *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* por Collins et al. (1994). Diversos autores isolaram esta bactéria a partir de ambientes termófilos e em condições anaeróbias, destacando-se *T. thermosaccharolyticum* W16 (Ren et al. 2008), e *T. thermosaccharolyticum* KKU19 (Khamtib e Reungsang, 2012), ambas isoladas a partir de sedimento de fontes termais e *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 isolada a partir de lodo de biorreator utilizado no tratamento de efluente da extração do óleo da palma (O-thong et al., 2008). Ferraz Júnior et al., (2014) e Lazaro et al., (2014) identificaram *T. thermosaccharolyticum* na remoção de compostos orgânicos da vinhaça de cana-de-açúcar e associaram-na a produção de hidrogênio.

Portanto, a partir desse relato, as culturas isoladas neste trabalho são bactérias anaeróbias, termófilas, com potencial de produção de etanol e hidrogênio, características estas observadas desde a reativação do inóculo inicial. Para a continuidade deste trabalho, optou-se por caracterizar as culturas VCS1 e VCS6.

Figura 5.7 – Dendograma filogenético das culturas isoladas VCS1, VCS2, VCS3, VCS4, VCS5 e VCS6



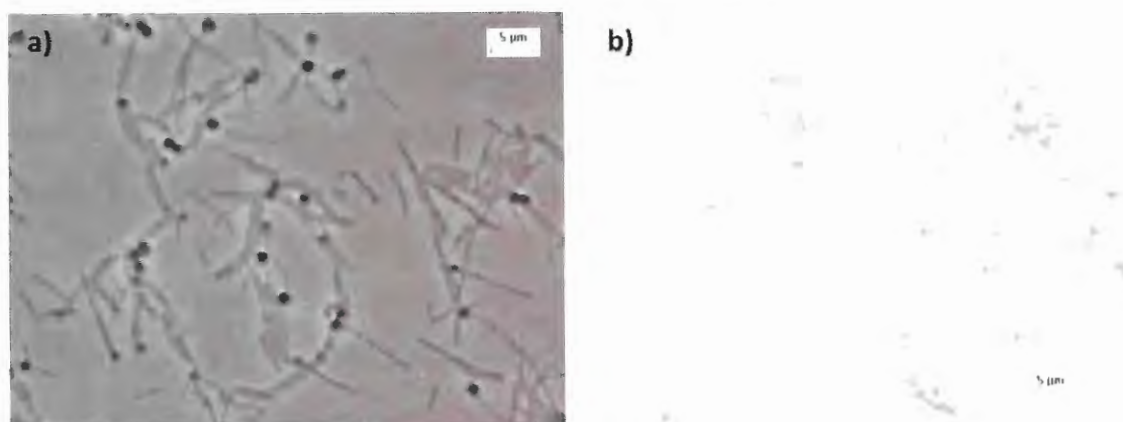
Fonte: Elaboração própria

5.3 Características Morfológicas e fisiológicas: Cultura isolada VCS1 – *Thermoanaerobacterium calidifontis*

5.3.1 Morfologia

Cultura anaeróbia e termófila, sendo bacilos alongados e estreitos com protuberância em uma das extremidades e coloração gram-positiva (Figura 5.8), com formação de colônias circulares, planas, rugosas, incolores, opacas com diâmetro entre 3 a 5 mm. Características morfológicas similares foram observadas por Shang et al (2013), ao isolarem *Thermoanaerobacterium calidifontis*, por técnica de roll-tube a partir de sedimento e águas termais na China. Os autores observaram que as cepas isoladas tinham forma de bacilos, gram-positivas, com formação de endósporos terminais durante a fase exponencial tardia e início da fase estacionária (Figura 5.9).

Figura 5.8 Microscopia de contraste de fase (a) e microscopia de luz comum (b) de bactérias gram-positivas da cultura VCS1



Fonte: Elaboração própria

Figura 5.9 Microscopia de contraste de fase de bacilos de *Thermoanaerobacterium calidifontis*

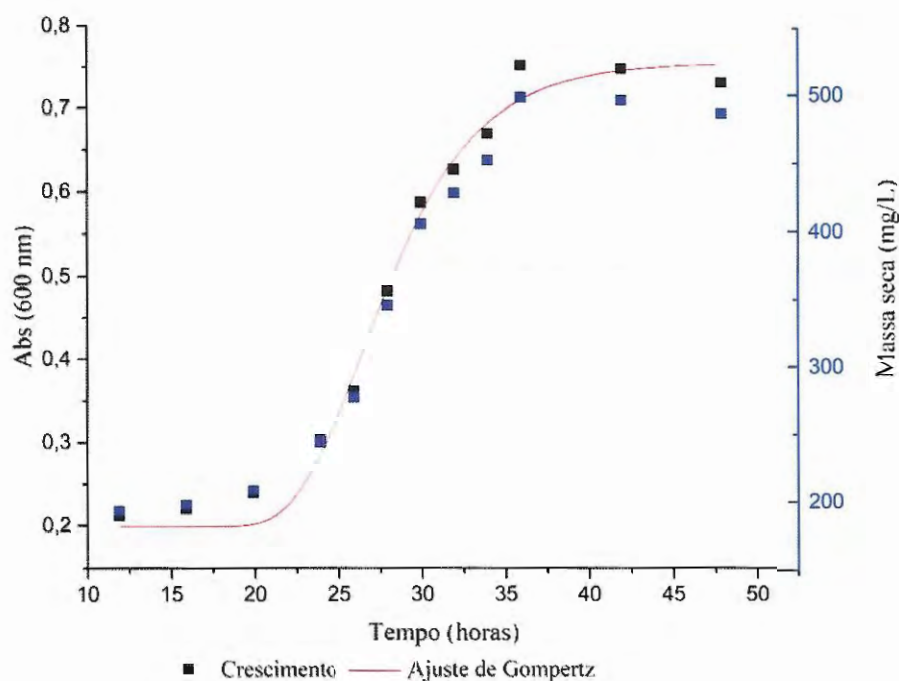


Fonte: Shang et al (2013)

5.3.2 Cinética de crescimento

A fase *lag* da cultura isolada VCS1 foi de 22,50 horas, seguindo por período de fase exponencial de aproximadamente 16 horas de duração, com crescimento máximo de 386,8 mg/L (0,55 abs) (Ajuste ao modelo de Gompertz, $R^2 = 0,9873$) (Figura 5.10). O período de fase *lag* foi superior aos obtidos por Shang et al (2013), porém, os autores observaram também período de 16 horas para a fase exponencial para a cultura isolada *T. calidifontis* Rx1. Os autores realizaram seus ensaios com o meio DSMZ 640, na qual possui cloreto de amônio e triptona, componentes não incluídos as condições nutricionais do meio AMM modificado e 5,0 g/L de xilose (33,3 mmol/L). No ensaio com *Thermoanaerobacterium calidifontis* da presente pesquisa foi usado concentração inferior de xilose (2,0 g/L ou 13,3 mmol/L) e as mesmas condições de pH 7 e 55°C de Shang et al (2013).

Figura 5.10 Crescimento *Thermoanaerobacterium calidifontis* VCS1, nas condições de 2,0 g/L (13,3 mmol/L) de xilose, meio AMM modificado, pH 7 e 55°C.



Fonte: Elaboração própria

Considerando apenas a fase logarítmica ou exponencial da cultura isolada VCS1, e tendo que nesta fase a velocidade específica de crescimento ($\mu_x = \mu_{\text{máx}}$) é constante e máxima, observou-se tempo de geração de 9,12 horas e velocidade específica de $0,076 \text{ h}^{-1}$.

O tempo de geração para bactérias anaeróbias semelhantes a *Caloramator* e *Thermoanaerobacterium* é de 30 a 60 minutos, em condições termófilas a partir de glicose (Zeikus et al., 1979; Tarlera et al., 1997; Plugge et al., 2000; Sigurbjornsdottir e Orlygsson, 2012). Shang et al., (2013) relataram tempo de geração de 55 minutos para *T. calidifontis* Rx1, em condições ótimas de cultivo de 5,0 g/L (33,3 mmol/L) de xilose, 55°C, pH 7, e baixa salinidade (NaCl 0 – 3%). O tempo de geração da cultura isolada VCS1, em comparação com diversos estudos, foi considerado elevado, provavelmente relacionado com as condições nutricionais restritivas em termos de substratos orgânicos, uma vez que foi isolada a partir de lodo de tratamento de vinhaça, com ampla diversidade e quantidade de fatores nutricionais. Nas condições do meio AMM modificado com 13,3 mmol/L de xilose ocorreu a restrição nutricional propiciando maior tempo de geração.

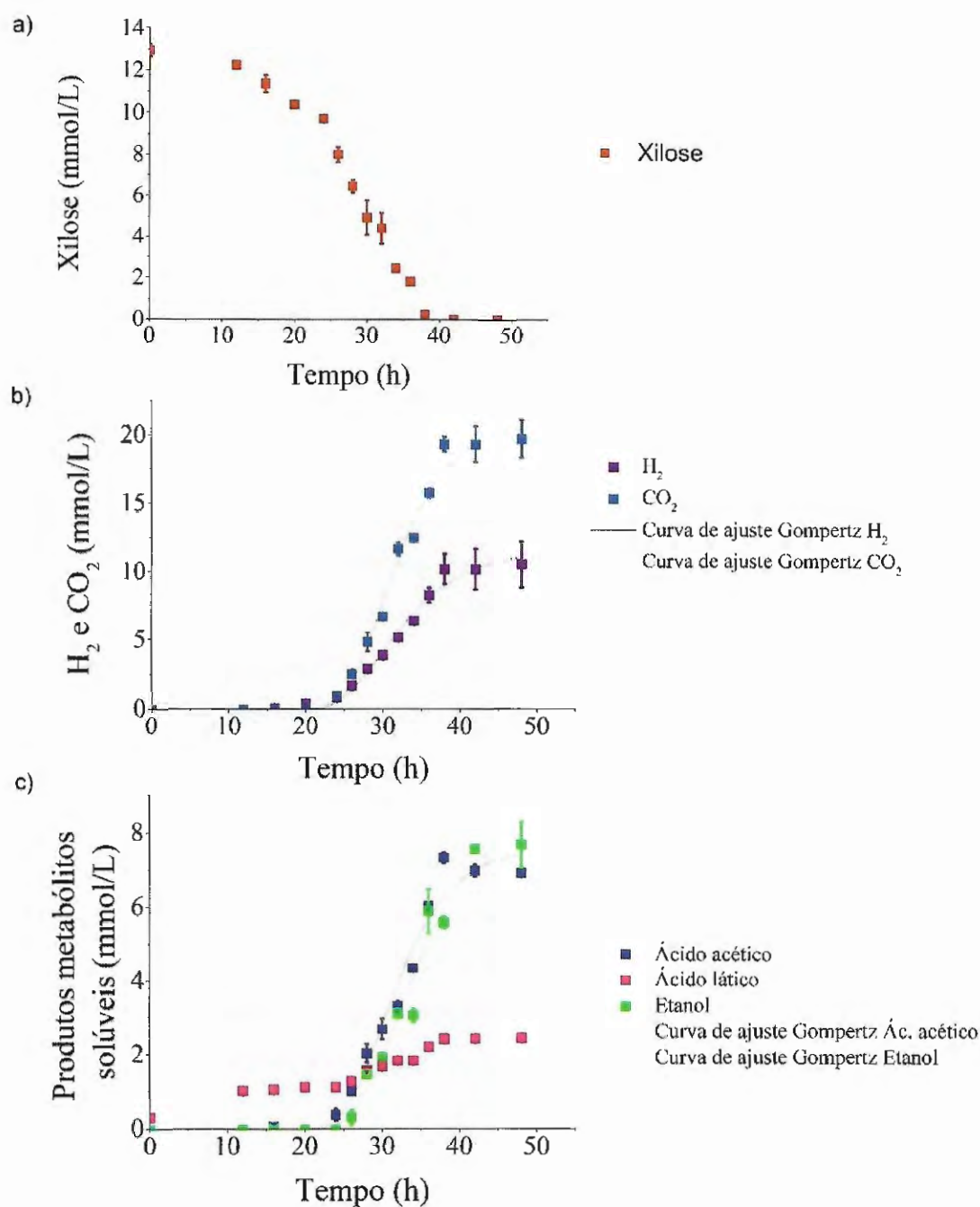
5.3.3 Produção de metabólitos

O consumo de xilose (2,0 g/L ou 13,3 mmol/L) iniciou-se após aproximadamente 12 horas de operação, e decorreu por 48 horas, com 99,9% de eficiência de remoção (residual de 35 mg/L ou 0,23 mmol/L). Os produtos finais a partir da conversão da xilose foram etanol (7,72 mmol/L \pm 0,61), ácido acético (6,95 mmol/L \pm 0,07), ácido láctico (2,47 mmol/L \pm 0,004), gás carbônico (19,46 mmol/L \pm 2,28) e hidrogênio (10,26 mmol/L \pm 1,50) (Figura 5.11). Não se observou formação de ácido propiônico, ácido butírico, ácido isobutírico, ácido valérico, ácido isovalérico, ácido caprótico, acetona, metanol, n-butanol e glicerol.

Shang et al., (2013) constataram a formação dos mesmos compostos a partir do consumo de 5,0 g/L (33,3 mmol/L) de xilose à 55°C em 48 horas por *Thermoanaerobacterium calidifontis* Rx1, sendo etanol (29,3 mmol/L), ácido acético (13,1 mmol/L), ácido láctico (16,2 mmol/L), H₂ (38,1 mmol/L) e CO₂ (8,6 mmol/L). Os autores observaram que os principais produtos formados foram etanol e hidrogênio, resultado esse similar ao obtido neste trabalho, uma vez que observou-se a produção dos mesmos metabólitos para a cultura VCS1, sendo 41,55% de CO₂, 21,90% de H₂ e 16,48% de etanol em relação a todos os produtos formados.

Sabe-se que outras bactérias do gênero *Thermoanaerobacterium* também estão relacionadas com a produção de etanol, ácido acético, ácido láctico, H₂ e CO₂ a partir de pentoses e hexoses (Shaw et al., 2008; Sigurbjornsdottir e Orlygsson, 2012; Wiegel e Ljungdahl, 1981; Zeikus et al., 1979). Wiegel e Ljungdahl, (1981) em seus estudos com *Thermoanaerobacterium ethanolicus*, bactéria produtora de etanol, utilizando glicose como substrato, observaram os mesmos produtos observados para a cultura VCS1, entretanto, com proporção de etanol significativamente maior, sendo 49,33% de CO₂ e 43,36% de etanol, e rendimento de 1,8 mol etanol/mol de glicose.

Figura 5.11 Variação temporal de xilose (a), hidrogênio e dióxido de carbono (b) e ácido acético, ácido láctico e etanol (c) por *T. calidifontis* VCS1 em meio de cultivo AMM modificado, pH 7 e 55°C



Fonte: Elaboração própria

Entretanto, a produção concomitante de etanol e hidrogênio é comum em bactérias anaeróbias termófilas do gênero *Thermoanaerobacterium*. Shaw et al., (2008) observaram formação de etanol (65-80%), H₂ (40-60%), ácido acético (20-30%) e ácido láctico (2-5%) por

Thermoanaerobacterium saccharolyticum JW/SL-Y5485 a partir de 4,0 g/L (26,6 mmol/L) de xilose à 55°C. Os autores avaliaram as atividades enzimáticas durante o crescimento em xilose, e constataram que os produtos finais foram influenciados por um composto de carbono reduzido, o etanol, em vez da produção de ácidos orgânicos mais oxidados e hidrogênio.

Sigurbjornsdottir e Orlygsson, (2012) isolaram *Thermoanaerobacterium* AK54, com 99% de similaridade a *Thermoanaerobacterium aciditolerans*, e constataram ótimas condições de crescimento em pH entre 5 e 6, a 65°C, com produção de etanol e hidrogênio de 1,03 e 1,02 mol/mol de glicose (20 mmol/L), respectivamente, seguido de ácido acético, ácido láctico e CO₂.

Outra bactéria capaz de produzir hidrogênio e etanol é *Thermoanaerobacter mathranii* sp. Larsen et al., (1997) elucidaram a via metabólica de degradação de 13,3 mmol/L de xilose, e definiram que para 1 mol de xilose, são produzidos 1,1 mol de etanol, 0,4 mol de ácido acético, 0,06 mol de ácido láctico, 1,81 mol de CO₂, e 0,9 mol de H₂.

Entretanto, para a cultura isolada VCS1 não foi observado rendimentos em etanol similares aqueles obtidos por Shaw et al., (2008) e Sigurbjornsdottir e Orlygsson, (2012), uma vez que a proporção de hidrogênio foi relativamente maior que etanol, caso esse que não ocorreu no trabalho dos outros autores, nos quais foi evidenciado produção preferencial de etanol por bactérias semelhantes a *Thermoanaerobacterium*. Vale ressaltar, que a produção de CO₂, foi significativa em todos os trabalhos citados, sendo assim, um subproduto da via fermentativa.

Ao aplicar os resultados obtidos ao modelo matemático de Gompertz, observou-se maior taxa máxima de produção (R_m), 1,65 mmol/L.h, para formação de CO₂, seguido de 0,75 mmol/L.h de H₂, 0,57 mmol/L.h de ácido acético, 0,54 mmol/L.h de etanol, e por fim, 0,05 mmol/L.h de ácido láctico. A partir desses valores pode-se inferir sobre a hipótese de produção preferencial de CO₂ e H₂ pela cultura isolada VCS1, seguido da produção simultânea de ácido acético e etanol. O potencial máximo de produção (P) foi de 21,03 mmol/L de CO₂, 11,64 mmol/L de H₂, 8,53 mmol/L de etanol, 7,65 mmol/L de ácido acético, e 3,76 mmol/L de ácido láctico. Para todos os parâmetros ajustados, a fase de adaptação ao substrato (λ), na qual antecede o início de produção de metabólitos, foi de aproximadamente 25 horas, exceto na produção de ácido láctico, tendo período breve de 0,38 horas (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 Parâmetros ajustados via Gompertz para os produtos formados a partir de xilose (2,0 g/L) em meio AMM modificado, pH 7, 55°C por *T. calidifontis* VCS1

Produtos	<i>P</i> (mmol/L)	<i>Rm</i> (mmol/L.h)	λ (h)	R ²
CO ₂	21,03	1,65	25,27	0,989
H ₂	11,64	0,75	24,41	0,9857
Ácido Acético	7,65	0,57	25,05	0,9744
Etanol	8,53	0,54	26,47	0,9754
Ácido Lático	3,76	0,05	0,38	0,9207

Portanto, inferiu-se que para cultura isolada VCS1, o mesmo metabolismo observado por Shaw et al., (2008) para a maioria das bactérias termófilas, na qual a xilose é incorporada a glicólise por via não-oxidativa pentose-fosfato, reduzida a gliceraldeído 3-P, sendo este convertido a ácido lático, ácido acético, etanol e hidrogênio por via piruvato (EMP - Embden Meyerhof Parnas). Algumas enzimas são essenciais para esse processo, o piruvato é convertido à ácido lático pela atividade da lactato-desidrogenase (LDH), e também é reduzido a acetil-CoA pelas enzimas piruvato-formiato liase (PFL) e piruvato-ferredoxina oxidorreductase (PFOR), com liberação de CO₂ e formação de H₂ por hidrogenases (H₂-ase), e por fim, o acetil-CoA é convertido a etanol pelas enzimas acetaldeído desidrogenase (Aldh) e álcool desidrogenase (Adh) (Chang e Yao, 2011).

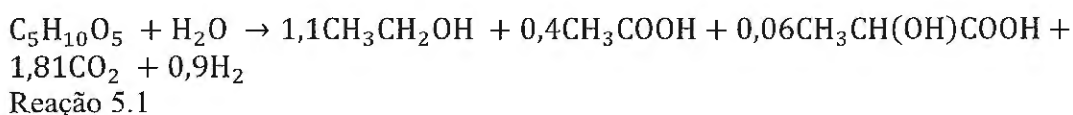
A partir dos resultados obtidos em função das condições impostas neste trabalho, tais como, meio AMM modificado, pH 7 a 55°C e 2,0 g/L ou 13,3 mmol/L de xilose, para a cultura isolada VCS1, favoreceram o fluxo de carbono de forma a obter hidrogênio e etanol, com rendimentos de 0,79 mol H₂ /mol e 0,59 mol EtOH / mol por xilose.

A partir do balanço final foi possível inferir que 36,53% da matéria orgânica inicial foi convertida em etanol e ácidos orgânicos, e provavelmente o restante foi convertido em CO₂, H₂ e crescimento celular (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 Balanço final de *T. calidifontis* VCS1 em meio AMM modificado, pH 7 à 55°C

Substrato:	mmol/L
Xilose	13,3
Produtos:	mmol/L
Etanol	7,72
Ácido Acético	6,95
Ácido Láctico	2,43
CO ₂	19,46
H ₂	10,26
DQO	g/L
Inicial	2,07
Final	1,55
Residual	0,53
Rendimento	mol/mol
Etanol	0,59
Hidrogênio	0,79

Esses dados corroboram com a reação estequiométrica definida por Larsen et al., (1997), sendo:



Portanto, obteve-se para cultura isolava VCS1, a partir de 1 mol de xilose metabolizada, 0,6 mol de etanol, 0,5 mol de ácido acético, 0,2 mol de ácido láctico, 0,8 mol de H₂ e 1,5 mol de CO₂, correspondendo a eficiência de 87,7% e 53,98% para hidrogênio e etanol, em relação ao rendimento teórico.

Ressalta-se, que mesmo em culturas puras, a distribuição do fluxo de carbono pode variar de acordo com as condições estabelecidas de cultivo, como pH inicial, pressão parcial de hidrogênio, concentração de substrato, extrato de levedura, entre outros. Esses parâmetros podem ter interferido no fluxo de carbono da cultura isolada VCS1, na qual produziu preferencialmente hidrogênio ao invés de etanol, resultado similar ao obtido por Shang et al (2013) para a cultura *T. calidifontis* Rx1 e diferente do observado pelos demais trabalhos

supracitados com culturas do gênero *Thermoanaerobacterium* sp. (Larsen et al., 1997; Shaw et al., 2008b; Sigurbjornsdottir e Orlygsson, 2012).

Sendo assim, vê-se necessário avaliar diferentes condições e determinar aquelas que interferem na formação de produtos. Alguns parâmetros importantes para culturas de bactérias anaeróbias e termófilas foram estudadas por Sigurbjornsdottir e Orlygsson, 2012 e Ciranna et al., 2014. Sigurbjornsdottir e Orlygsson, (2012) observaram que concentrações elevadas de glicose, inibem o metabolismo de *Thermoanaerobacterium* AK54, diminuindo a conversão de carboidratos e acidificando o meio.

Ciranna et al., (2014) verificaram que dois fatores referentes as condições de cultivo interferem no fluxo de carbono, sendo pH e pressão parcial de H₂ por *Caloramator celer*. No geral, em pH alcalino à neutro, a taxa de síntese de biomassa foi maximizada, enquanto em pH ácido há menor taxa de crescimento e menor eficiência de formação de biomassa, sendo estas acompanhadas com recuperação de energia mais eficiente a partir do substrato. Maiores rendimentos de H₂ foram associados à fermentação em pH ácido como consequência da menor síntese de outros subprodutos reduzidos como formato e etanol. Desta forma, vê-se necessário avaliar alguns parâmetros de condições de cultivo para a cultura isolada VCS1, de forma a maximizar o rendimento de produção de energia a partir de pentoses, e elucidar melhores condições para cultivo e manutenção da cultura.

5.3.4 Consumo de hexoses e pentoses

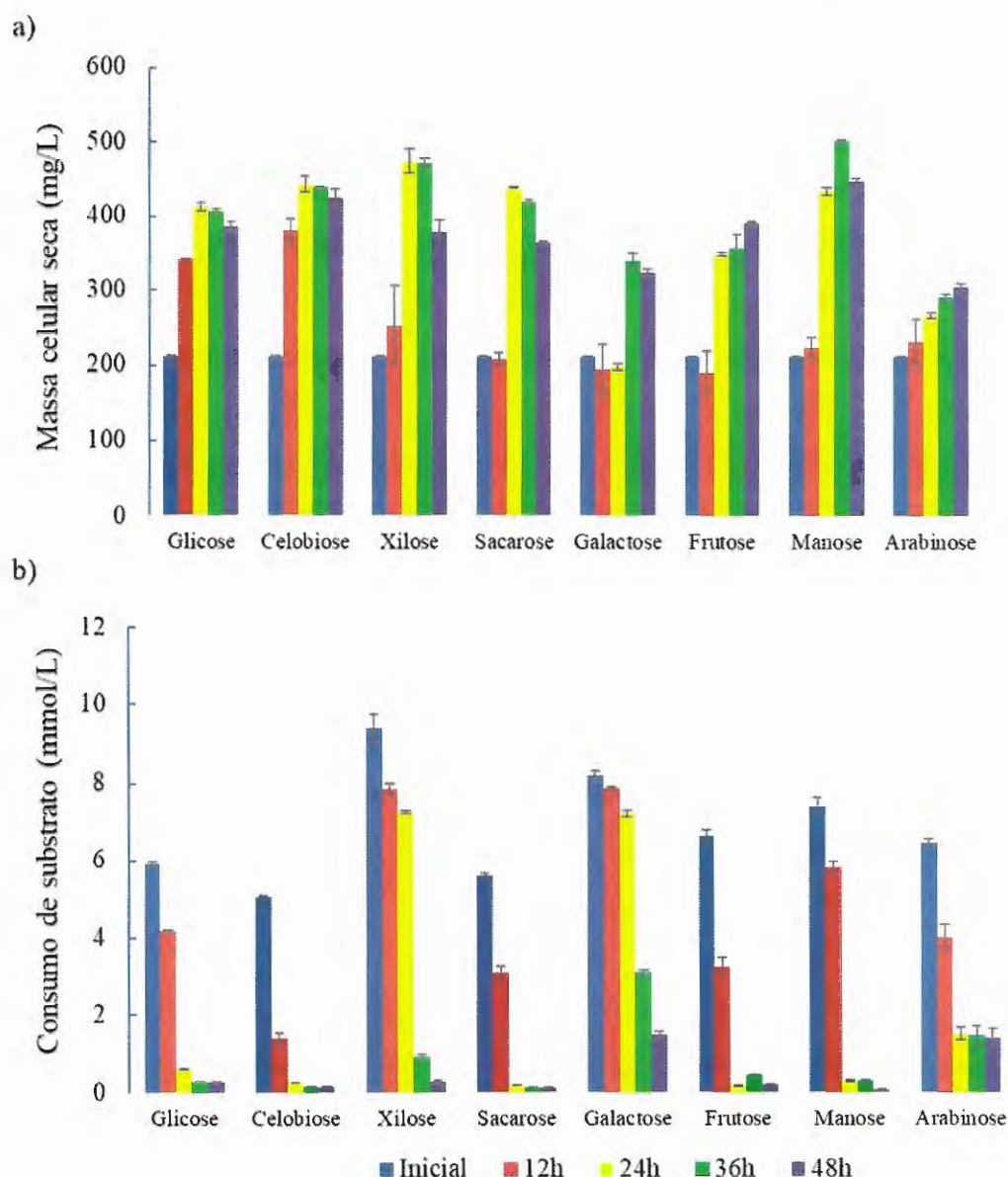
Os açúcares utilizados corresponderam as pentoses (5 carbonos): xilose, arabinose e hexoses (6 carbonos): glicose, frutose, manose e galactose. Sacarose e celobiose são dissacarídeos formados por moléculas de glicose. Obteve-se para cultura isolada VCS1 com densidade celular inicial de 0,250 (213,2 mg/L) crescimento máximo em 24 horas em glicose (0,603 abs ou 412,8 mg/L), celobiose (0,658 ou 443,8 mg/L), xilose (0,713 ou 474,9 mg/L) e sacarose (0,650 ou 439,3 mg/L). Para os demais açúcares, o crescimento máximo só ocorreu após 36 horas de incubação, sendo manose (0,764 ou 503,7 mg/L), frutose (0,507 ou 358,5 mg/L) e galactose (0,477 ou 341,6 mg/L). Nas condições com arabinose observou-se o menor valor de 0,415 ou 303,7 mg/L em 48 horas (Figura 5.12a).

O consumo dos açúcares pela cultura isolada VCS1 está representado na Figura 5b. Observou-se que a cultura isolada VCS1 assimilou mais facilmente os açúcares de 6 carbonos (hexoses). Por exemplo, 97,4% de frutose, 95,8% de manose, e 89,6 % de glicose foram removidos em 24 horas a partir da concentração inicial de 5,5 mmol/L de cada substrato, com

exceção de galactose, 81,7% de remoção após 48 horas de fermentação. Para sacarose e celobiose (2,92 mmol/L), observou-se remoção de 96,5% e 94,7%, respectivamente, em 24 horas de fermentação. A partir de xilose (6,6 mmol/L) obteve-se o mesmo padrão de redução anteriormente avaliado, 96,8% de remoção em 48 horas de fermentação, uma vez que a cultura foi isolada a partir desse substrato. Em arabinose observou-se remoção de apenas 78,1% em relação a concentração inicial 6,66 mmol/L.

O consumo de pentoses e hexoses também foi observado por Shang et al. (2013) ao caracterizarem a cultura isolada Rx1 (*Thermoanaerobacterium calidifontis*) em meio DSMZ 640, pH 7 a 60°C, entretanto, os autores não discutiram os valores dos parâmetros de crescimento e consumo de substratos.

Figura 5.12 (a) Crescimento celular em diferentes carboidratos e (b) Redução de carboidratos para *Thermoanaerobacterium calidifontis* VCS1 em pH 7 e 55°C



Fonte: Elaboração própria

Mohapatra et al., (2018) constataram em seus estudos que o crescimento celular em microrganismos é muito dependente das fontes de carbono disponíveis, uma vez que a célula regula o fluxo do substrato através da via metabólica. Os autores ressaltaram que o açúcar pode ser fermentado em um produto ou utilizado na respiração dependendo da fonte de carbono, do tipo de célula e das condições de crescimento. Os autores citaram como exemplo os estudos de Velagapudi et al. (2007), no qual avaliaram o fluxo metabólico de duas hexoses estruturalmente semelhantes, glicose e galactose, como as únicas fontes de carbono utilizadas por

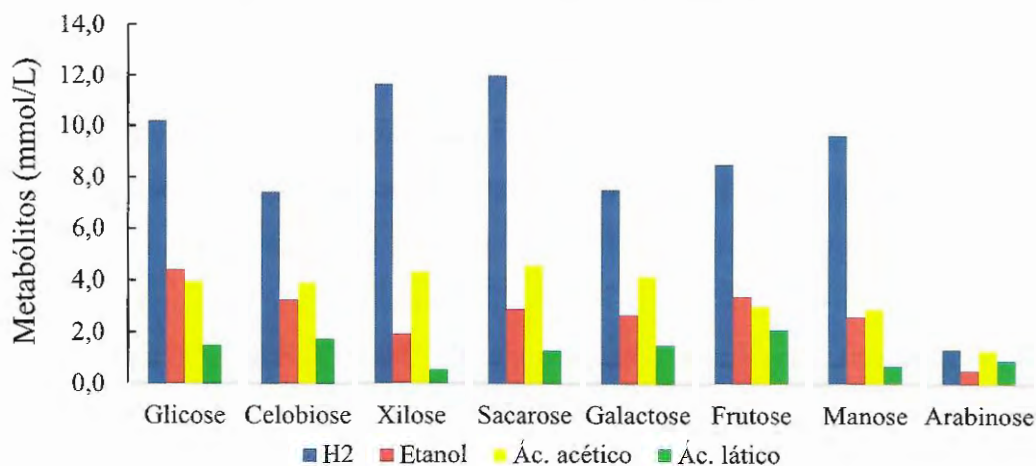
Saccharomyces cerevisiae. Velagapudi et al., (2007) observaram que a glicose foi eficientemente fermentada em etanol com requerimento mínimo de oxigênio, já a galactose foi usada pelo organismo em parte para respiração e em parte para fermentação.

A assimilação de diferentes açúcares pode ser discutida a partir da *Carbon Catabolite Repression* (CCR) que consiste na expressão de quais funções enzimáticas são necessárias para utilizar fontes de carbono diferentes à glicose. Em bactérias gram-positivas do Filo Firmicutes, a proteína citoplasmática HPr (histidina) é a mais importante na assimilação de carboidratos, e contribui significativamente para CCR. Tsakraklides et al., (2012) identificaram em *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, a ocorrência de CCR mediada pela fosforilação de HPr (Görke e Stülke, 2008; Tsakraklides et al., 2012). Já se é conhecido que bactérias e outros organismos absorvem preferencialmente glicose, e esse processo bloqueia a assimilação por açúcares menos preferidos, levando a uma das principais barreiras para o aumento de rendimento e produtividade do processo de fermentação a partir de pentoses.

Dessa forma, ressalta-se que esses estudos são pioneiros para bactérias do gênero *Thermoanaerobacterium*, e não há resultados conclusivos sobre preferências de fonte de carbono. Portanto, o presente trabalho é um indicativo de que a cultura isolada VCS1 (99% de similaridade com *Thermoanaerobacterium calidifontis*) metaboliza e cresce mais rapidamente em açúcares cuja base da cadeia seja glicose (glicose, sacarose e celobiose), em relação aos açúcares xilose, galactose e arabinose, sugerindo assim, a possível preferência por essas fontes de carbono.

A partir das hexoses e pentoses, os produtos formados foram H₂, etanol, ácido acético e ácido láctico (Figura 5.13). Observou-se o predomínio de produtos de elevado valor energético, hidrogênio e etanol, frente a todos os substratos metabolizados, evidenciando novamente, que a via metabólica para degradação de substrato utilizada pela cultura isolada VCS1 foi via EMP, e provavelmente expressa enzimas capazes de hidrolisar frutose, sacarose, celobiose, manose, galactose e arabinose à piruvato.

Figura 5.13 Produtos formados por *Thermoanaerobacterium calidifontis* VCS1 a partir de pentoses e hexoses (1,0 g/L) em pH 7 à 55°C



Fonte: Elaboração própria

O hidrogênio foi o principal produto formado a partir de todos os açúcares. Para os açúcares sacarose e glicose, fontes de carbono metabolizada mais rapidamente pela cultura VCS1 (em 24 horas), a produção foi de 12,07 e 10,23 mmol/L, respectivamente. Para xilose, observou-se melhores resultados na produção de hidrogênio, 11,78 mmol/L, quando comparados a glicose. Nos demais substratos, a produção de hidrogênio foi menor que 10,0 mmol/L. Ressalta-se que para manose e celobiose, os quais obteve significantes resultados em crescimento celular (503,7 mg/L e 443,8 mg/L) e redução do substrato (95,8% e 94,7%), a produção em hidrogênio foi menor, sendo 9,72 e 7,47 mmol//L, respectivamente, inferindo assim que a cultura isolada VCS1 pode preferencialmente metabolizar esse açúcar para a respiração e crescimento celular.

Sendo assim, concluiu-se que a cultura isolada VCS1 metaboliza eficientemente xilose, porém, com preferência para hexoses, como glicose, sacarose, celobiose e manose. Não se observou resultados expressivos na fermentação de arabinose.

5.4 Otimização das condições de cultivo em concentração de xilose (mmol/L) e pH

5.4.1 Produção de metabólitos

A concentração de substrato e pH inicial podem interferir no metabolismo de culturas puras e no fluxo de carbono, resultando em formação de diferentes compostos (Ciranna et al.,

2014; Sigurbjornsdottir e Orlygsson, 2012). A partir da ferramenta estatística de delineamento fatorial por composto central (DCC), analisou-se diferentes concentrações de xilose e pH inicial na formação de compostos finais, a fim de inferir se sobre metabólitos formados a partir da cultura isolada VCS1.

Para valores dos pontos centrais de ambas as variáveis foram adotados os valores definidos por Shang et al., (2013), cujos valores ótimos de condições de cultivo para *T. calidifontis* Rx1, foram temperatura de 55°C, 36,6 mmol/L de xilose e pH inicial 7.

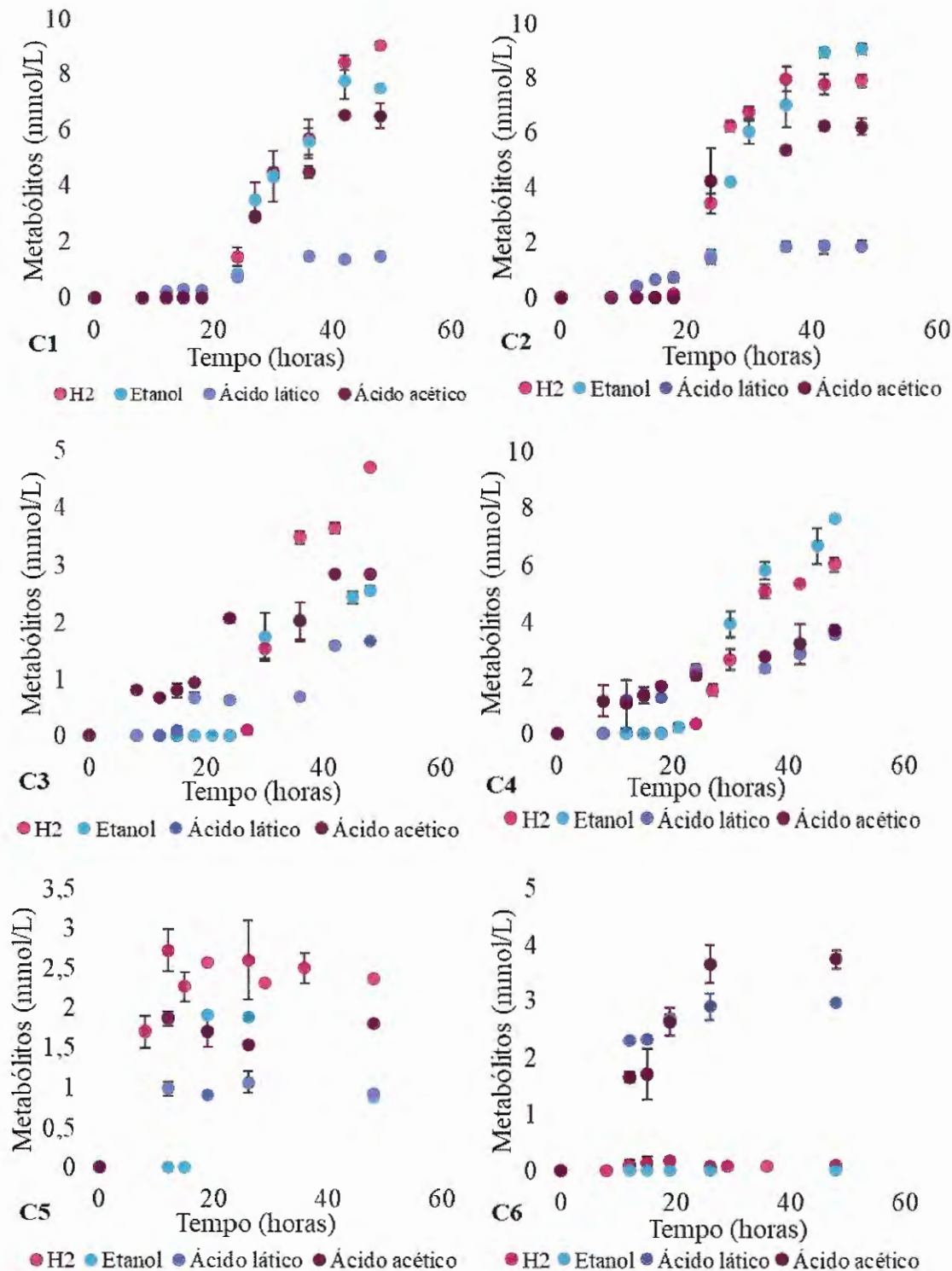
Determinou-se a produção de H₂, etanol ácido acético e ácido láctico, mediante o ajuste da equação de Gompertz modificada (Zwietering et al., 1990) (Tabela 5.4), a partir dos dados experimentais ilustrados nas Figuras 5.15 e 5.16.

Tabela 5.4 Delineamento por Composto Central da Concentração de xilose e pH para o Potencial Máximo de Produção (*P*) e ácidos orgânicos

Ensaio	Xilose	pH	<i>P</i> H ₂		<i>P</i> Etanol		<i>P</i> Ác. Acético		<i>P</i> Ác. Lático	
	mmol/L	inicial	mmol/L	mmol/L	(mmol/L)	(mmol/L)	(mmol/L)	(mmol/L)	(mmol/L)	(mmol/L)
	x1	x2	Valor experimental	Valor Predito	Valor experimental	Valor Predito	Valor experimental	Valor Predito	Valor experimental	Valor Predito
C1	13,3	6,2	10,24±0,03	6,21	7,99±0,44	4,29	8,73±0,09	5,27	1,56±0,02	1,58
C2	13,3	7,8	7,83±0,37	5,9	9,05±0,14	7,94	5,95±0,16	5,28	1,87±0,20	1,68
C3	60,0	6,2	4,31±0,02	1,34	2,50±0,03	0,26	4,16±0,48	2,41	2,12±0,03	2,32
C4	60,0	7,8	6,28±0,41	5,41	7,44±0,97	7,79	6,45±0,02	7,48	3,41±0,25	3,42
C5	3,66	7	2,34±0,03	5,54	0,88±0,03	3,59	1,80±0,02	4,21	0,92±0,05	1,05
C6	69,5	7	0,05±0,01	1,75	0,00	0,64	3,75±0,17	3,75	2,96±0,09	2,81
C7	36,6	5,87	0,53±0,03	4,46	0,57±0,01	4,07	1,28±0,11	4,45	2,29±0,32	2,15
C8	36,6	8,13	6,16±0,08	7,12	12,14±2,03	11,98	8,80±1,05	8,04	2,86±0,01	2,99
C9	36,6	7	13,68±0,01	14,01	16,72±0,53	15,37	9,35±0,05	9,25	3,71±0,11	3,56
C10	36,6	7	14,34±0,97	14,01	14,04±1,08	15,37	9,16±0,14	9,25	3,42±0,24	3,56

Figura 5.14 Produção de H₂, etanol, ácido acético e ácido láctico em reatores em batelada dos ensaios C1, C2, C3, C4, C5 e C6

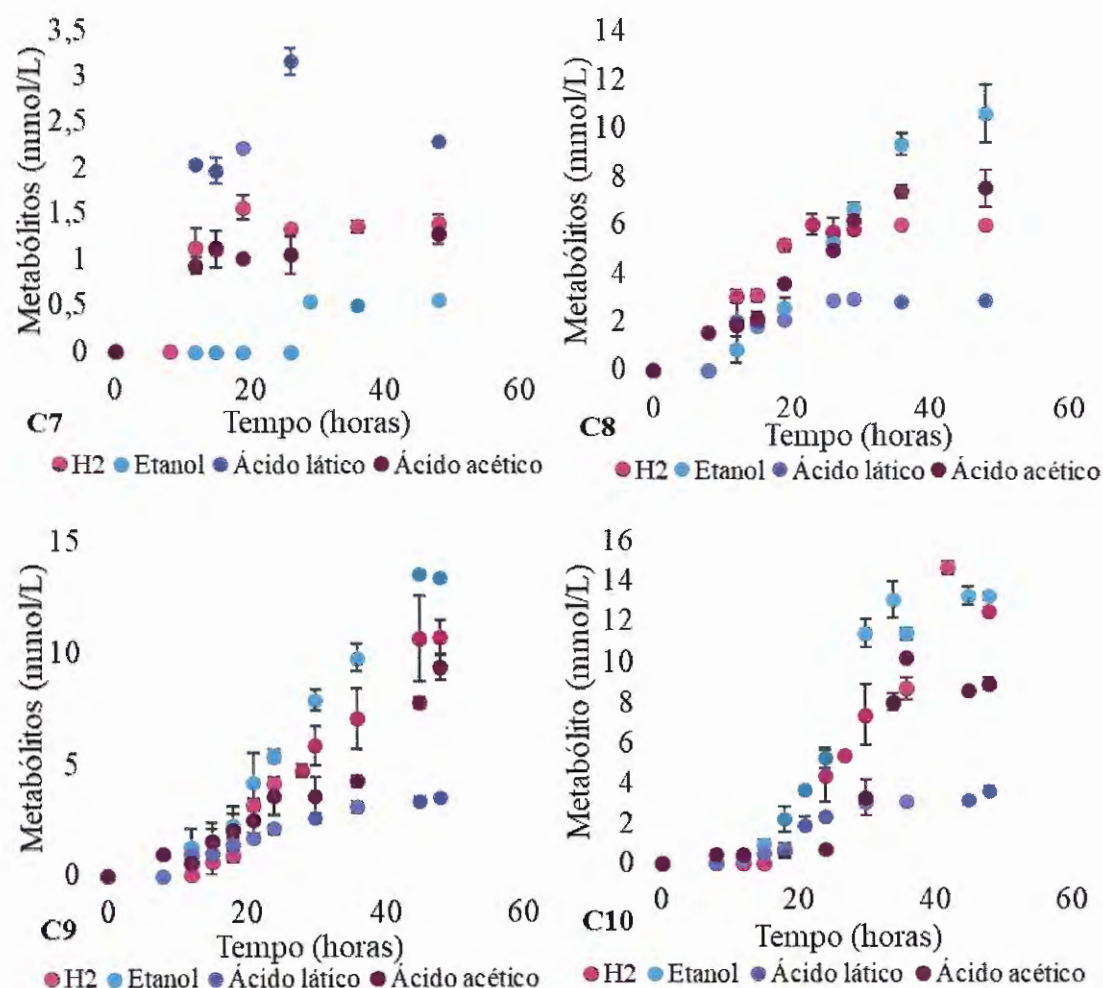
Ensaio: C1- 13,3 mmol/L de xilose e pH 6,2; C2- 13,3 mmol/L de xilose e pH 7,8; C3- 60,0 mmol/L de xilose e pH 6,2; C4- 60,0 mmol/L de xilose e pH 7,8; C5- 3,6 mmol/L de xilose à pH 7,0; C6- 69,5 mmol/L de xilose e pH 7,0;



Fonte: Elaboração própria

Figura 5.15 Produção de H₂, etanol, ácido acético e ácido láctico em reatores em batelada dos ensaios C7, C8, C9 e C10

Ensaio: C7- 36,6 mmol/L de xilose e pH 5,87; C8- 36,6 mmol/L de xilose e pH 8,13; C9- 36,6 mmol/L de xilose e pH 7,0; C10- 36,6 mmol/L de xilose e pH 7,0;



Fonte: Elaboração própria

A partir dos resultados obtidos, observou-se que na condição de pH 6,2, a rota de produção de hidrogênio foi favorecida em relação a do etanol. Sob tais condições (ensaio C1) obteve-se para potencial máximo de produção molar de hidrogênio (P) 10,2 mmol/L e 7,9 mmol/L de etanol. O mesmo ocorreu no ensaio C3 (pH 6,2), de 4,3 mmol/L e 2,50 mmol/L, respectivamente. Contudo, em faixa de pH (6,2) menores valores de P foram observados no ensaio C3, cuja concentração de xilose era consideravelmente maior que no ensaio C1, respectivamente de 60,0 mmol/L e 13,3 mmol/L, indicando assim possível inibição em maior concentração de substrato.

A influência do pH inicial na produção de hidrogênio também foi observada por Roy et al. (2013) que utilizaram *T. thermosaccharolyticum* IIT BT-ST1 e glicose como substrato. Os

autores relataram a necessidade de manter o pH do meio de cultivo próximo a 6,5 para favorecer a atividade enzimática da hidrogenase. Desta forma, é possível inferir que nos ensaios C1 e C3, cuja rota metabólica favoreceu a produção de hidrogênio, a faixa de pH 6,2 foi ideal para a atividade de enzimas hidrogenases.

A rota de produção de etanol foi favorecida nos ensaios em pH 7,8 e 8,13, principalmente nos ensaios C2, C4 e C8, sendo valores de *P* de etanol superiores aqueles de hidrogênio. No ensaio C2, (pH 7,8 e 13,3 mmol/L de xilose) obteve-se 9,05 mmol/L de etanol e 7,83 mmol/L de hidrogênio. Nas condições do ensaio C4 (pH 7,8 e 60,0 mmol/L de xilose), obteve-se menor produção de etanol (7,44 mmol/L) e de hidrogênio (6,28 mmol/L). Observou-se novamente valores menores de *P* para 60,0 mmol/L de xilose indicando inibição por substrato.

Para as condições do ensaio C8 (pH 8,13 e 36,6 mmol/L de xilose) obteve-se a maior discrepância entre valores de etanol e hidrogênio, respectivamente de 12,14 mmol/L e 6,16 mmol/L, constatando que pH mais alcalino favorece a produção de etanol em relação a produção de hidrogênio. A influência do pH no fluxo metabólico também foi verificada por Ciranna et al. (2014) em seus estudos com a cultura pura *Caloramator celer* em fermentação de glicose (27,7 mmol/L). Os autores observaram 106 mmol/L para hidrogênio em pH 6, e para pH 7 e 8, a produção de H₂ foi 33% menor, enquanto a produção de ácido fórmico e etanol foi 2 vezes maior que a obtida em pH 6. Portanto, é possível concluir que para a cultura isolada VCS1, a faixa de pH influenciou na produção de etanol e hidrogênio, sendo que a condição de pH mais alcalino favoreceu a produção de etanol.

Para os pontos centrais (ensaios C9 e C10) em pH inicial neutro (7,0) e 36,6 mmol/L de xilose, a relação hidrogênio/etanol foi aproximadamente 1, sendo para o ensaio C9, potencial de produção de hidrogênio de 13,68 mmol/L e etanol 16,18 mmol/L, e para C10, de 15,31 mmol/L e 15,12 mmol/L, respectivamente.

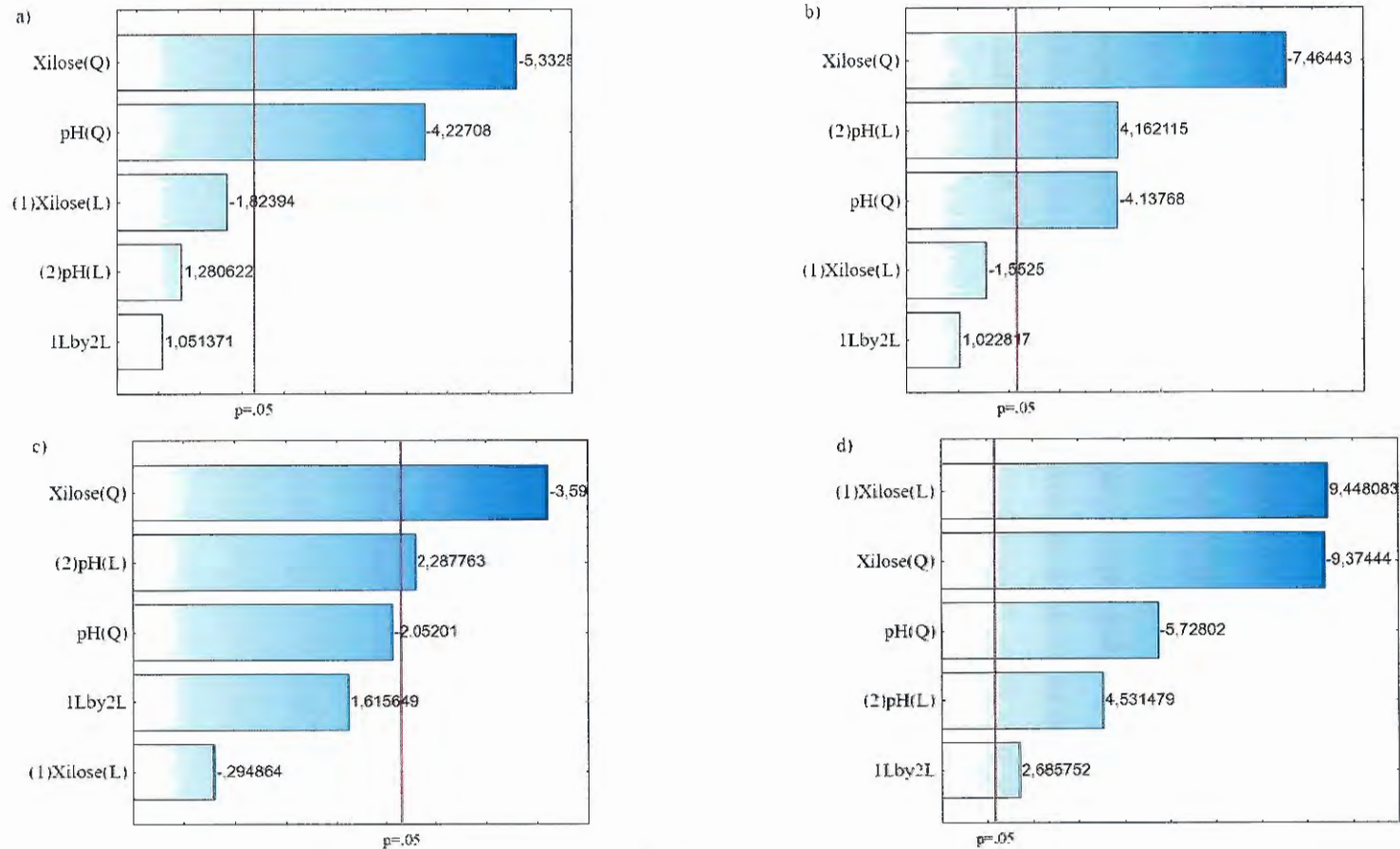
Para a condição de pH 5,87 (ensaio C7) e aquelas mais extremas de xilose (C5 com 3,66 mmol/L e C6 com 69,5 mmol/L) foram observados apenas CO₂, ácido acético e ácido láctico, provavelmente devido as condições de mínimo e máxima concentração de xilose, uma vez que o mínimo não foi suficiente para a suprir as condições básicas nutricionais da cultura isolada VCS1, e sob tal condição máxima provavelmente ocorreu inibição do metabolismo microbiano.

Resultado semelhante foi observado por Sigurbjornsdottir e Orlygsson (Sigurbjornsdottir and Orlygsson, 2012) com *Thermoanaerobacterium* AK54, bactérias

anaeróbia produtora de H₂, etanol, ácido acético e ácido lático. Os autores observaram boa relação entre concentração inicial de glicose (aprox. 5,5 a 20,0 mmol/L) e produção de compostos finais. Além disso, observaram que o aumento da concentração de glicose (maior que 20,0 mmol/L) não resultou em aumento de produtos finais, e que diminuição da produção de etanol foi observada para maior concentração de glicose de 20,0 para 50,0 mmol/L. No presente estudo, assim como no trabalho de Sigurbjornsdottir e Orlygsson (Sigurbjornsdottir e Orlygsson, 2012) a concentração de xilose acima de 60,0 mmol/L não favoreceu a produção de etanol.

Por meio da análise de variância (ANOVA) dos efeitos estimados da concentração de xilose e pH inicial na produção de compostos finais verificou-se que ambas as variáveis foram significativas para todos os compostos formados, $p < 0,05$. A partir dos diagramas de Pareto (Figura 5.16) pode-se observar os efeitos padronizados (t) das variáveis concentração de xilose e pH sobre as respostas. Os valores absolutos destes efeitos fornecem as alturas das barras, as quais estão dispostas em ordem decrescente na Figura 5.16.

Figura 5.16 Diagramas de Pareto dos efeitos da concentração de xilose e pH inicial para: a) Potencial máximo de produção de H_2 , b) Potencial máximo de produção de etanol, c) Potencial máximo de produção de ácido acético, e d) Potencial máximo de produção de ácido láctico
L: efeito linear; Q: efeito quadrático e 1Lby2L: efeito da interação entre concentração de substrato e pH



Fonte: Elaboração própria

Observou-se para os fatores concentração de xilose e pH e, também a interação entre eles, efeitos significativos sobre as respostas produção de hidrogênio, etanol, ácido acético e ácido láctico. Para produção de hidrogênio, constatou efeito significativo para concentração de xilose e pH (efeito quadrático). Para etanol, observou-se efeito significativo para ambas as variáveis, porém para a variável pH, observou-se maior significância (efeito linear e quadrático). Para a resposta produção de ácido acético, observou-se efeito quadrático para variável concentração de xilose, e efeito linear para pH. Para ácido láctico, todas as variáveis foram significativas, inclusive a interação entre concentração de xilose e pH. Os valores obtidos para p-valor para cada produto formado seguido de coeficiente estão apresentados na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 Análise de variância dos efeitos estimados da concentração de xilose e pH inicial para produção de H₂, etanol ácido acético e ácido láctico

	H ₂		Etanol		Ácido acético		Ácido láctico	
	p-valor	Coef.	p-valor	Coef.	p-valor	Coef.	p-valor	Coef.
Xilose (L) x ₁	0,0896	-1,3402	0,1429	-1,0424	0,7724	-0,1634	0,0000	0,6219
Xilose (Q) x ₁ ²	0,0001	-5,1833	0,0000	-6,6303	0,0029	-2,6381	0,0000	-0,8163
pH (L) x ₂	0,2211	0,9410	0,0010	2,7947	0,0382	1,2679	0,0005	0,2983
pH (Q) x ₂ ²	0,0008	-4,1088	0,0010	-3,6753	0,0594	-1,5044	0,0001	-0,4988
x ₁ . x ₂	0,3109	1,0925	0,3237	0,9713	0,1285	1,2663	0,0177	0,2500

Nível de significância de 95%.

Desta forma, a partir dos coeficientes, obteve-se equações referentes a cada produto final formado a partir das variações de concentração de xilose e pH inicial, respectivamente, sendo y representa o valor previsto da produção (mmol/L), x_1 o valor codificado de concentração de xilose e x_2 representa o valor codificado de pH.

$$\text{H}_2: \quad y = 13,99 - 5,19x_1^2 - 4,09x_2^2 \quad R^2 = 0,74$$

Equação 5.1

$$\text{Etanol:} \quad y = 15,37 - 6,65x_1^2 + 2,79x_2 - 3,66x_2^2 \quad R^2 = 0,85$$

Equação 5.2

$$\text{Ácido acético:} \quad y = 9,25 - 2,63x_1^2 + 1,26x_2 \quad R^2 = 0,60$$

Equação 5.3

$$\text{Ácido láctico: } y = 3,56 + 0,62x_1 - 0,82x_1^2 + 0,29x_2 - 0,49x_2^2 + 0,25x_1 \cdot x_2$$

Equação 5.4

A adequação dos modelos foi verificada por análise de variância (ANOVA) confirmando que os modelos obtidos com os dados do planejamento fatorial representam o delineamento composto central (Tabela 5.6).

Tabela 5.6 ANOVA de modelos propostos para potencial máximo de produção molar de H₂, etanol, ácido acético e ácido láctico

Resposta	Fontes de variação	Soma de quadrados	Grau de Liberdade	Quadrados médios	F-calculado	F-tabelado
Produção de hidrogênio (mmol/L)	Regressão	452,43	5	90,48	10,48	4,64
	Resíduo	120,93	14	8,63		
	Falta de ajuste	117,93	3	39,32		
	Erro puro	2,96	11	0,26		
	Total	573,37	19	99,00		
Produção de etanol (mmol/L)	Regressão	675,32	5	135,06	18,72	4,64
	Resíduo	100,99	14	7,21		
	Falta de ajuste	80,28	3	26,76		
	Erro puro	20,7	11	1,88		
	Total	776,32	19	142		
Produção de ácido acético (mmol/L)	Regressão	123,29	5	24,65	5,02	4,64
	Resíduo	68,79	14	4,91		
	Falta de ajuste	65,88	3	21,96		
	Erro puro	2,9	11	0,26		
	Total	192,09	19	30		
Produção de ácido láctico (mmol/L)	Regressão	16,47	5	3,29	47,54	4,64
	Resíduo	0,97	14	0,06		
	Falta de ajuste	0,3	3	0,1		
	Erro puro	0,66	11	0,06		
	Total	17,45	19	3		

Avaliando-se os parâmetros de R² e F-calculado, foi possível determinar o ajuste para cada modelo obtido a partir dos dados experimentais. Por se tratar de dados biológicos, nos quais interferências no cultivo resultam em discrepâncias nos resultados obtidos considerou-se valores de R² maior que 70% adequado.

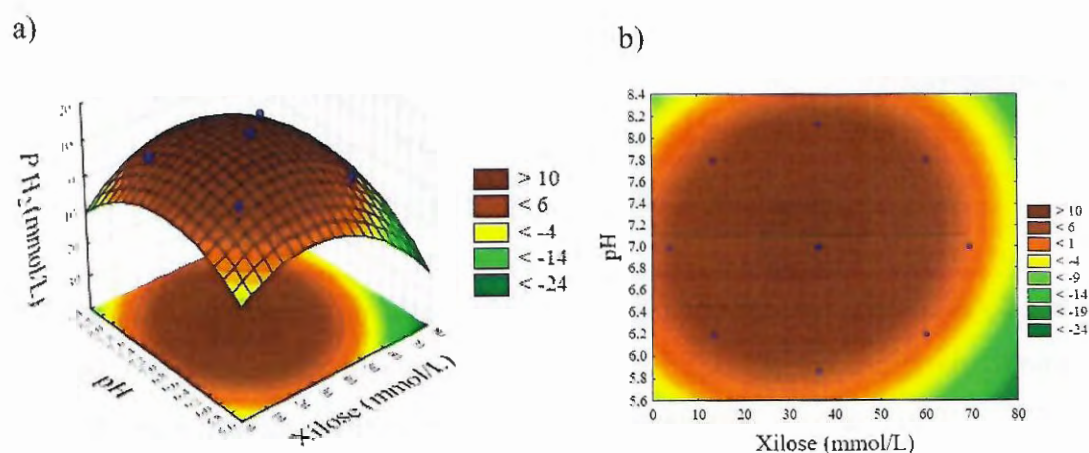
A partir dos dados experimentais obteve-se ácido acético foi desconsiderado, uma vez que o R^2 foi de 60%, e o F-calculado muito próximo ao valor do F-tabulado, indicando que dados obtidos não se ajustaram ao modelo, e não representando eficientemente o efeito das variáveis na formação de ácido acético.

Os dados experimentais referentes a produção de hidrogênio, etanol e ácido láctico ajustaram-se adequadamente aos modelos propostos, com valores de R^2 de 73%, 85% e 94%, respectivamente. A relação F-calculado e F-tabulado foi considerável significativa, principalmente para etanol e ácido láctico, sendo 4 e 10 vezes maior que o valor de F-tabulado.

Desta forma, a partir dos modelos significativos obtive-se as superfícies de resposta e curvas de contorno para produção de hidrogênio, etanol e ácido láctico (Figuras 5.17, 5.18 e 5.19), por meio das quais foi possível determinar o ponto ótimo para cada variável resposta.

Analisando a superfície de resposta e as curvas de contorno para a variável hidrogênio, verifica-se a existência de uma região ótima equivalente a produção de aproximadamente 10 mmol/L, numa faixa de combinação de pH inicial de 6,7 à 7,5, e concentração de xilose de 24,6 a 43,3 mmol/L (Figura 5.17).

Figura 5.17 Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) em função da concentração de xilose e pH inicial para produção de hidrogênio



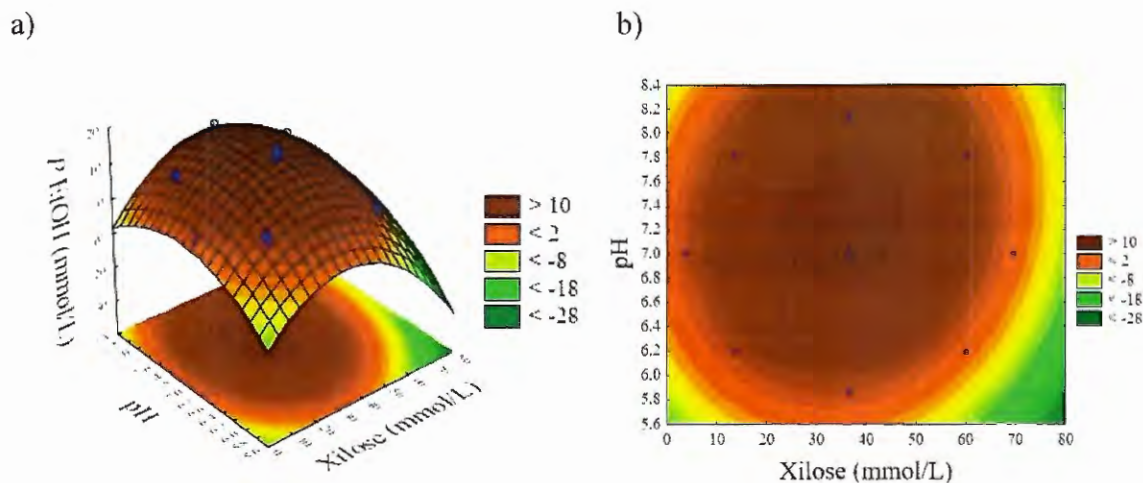
Fonte: Elaboração própria

De acordo com o modelo de produção de hidrogênio a partir de xilose, as condições ótimas previstas para a concentração de substrato e pH foram de 33,8 mmol/L e 7,0, respectivamente. Em tais condições, a produção de hidrogênio prevista seria de 14,1 mmol/L.

Obteve-se para hidrogênio 13,7 e 14,3 mmol/L para as condições dos ensaios C9 e C10, respectivamente. Desta forma, obteve-se grau de precisão do modelo de 99,2%.

Observou-se o mesmo comportamento para a variável resposta etanol, cuja região ótima em pH inicial de 6,7 a 7,9 e concentração de xilose de 23,3 a 50,0 mmol/L, indicou produção de aproximadamente 10,0 mmol/L (Figura 5.18). Desta forma, a partir dos resultados de DCCR, foi possível inferir que o pH ótimo para o cultivo da cultura isolada VCS1 foi entre 6,7 e 7,9, e entre 20,0 a 50,0 mmol/L de xilose. Valores inferiores e superiores a região ótima de produção de hidrogênio e etanol, não corresponderam a melhor condição de cultivo da cultura VCS1 visando a obtenção desses compostos.

Figura 5.18 Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) em função da concentração de xilose e pH inicial para produção de etanol

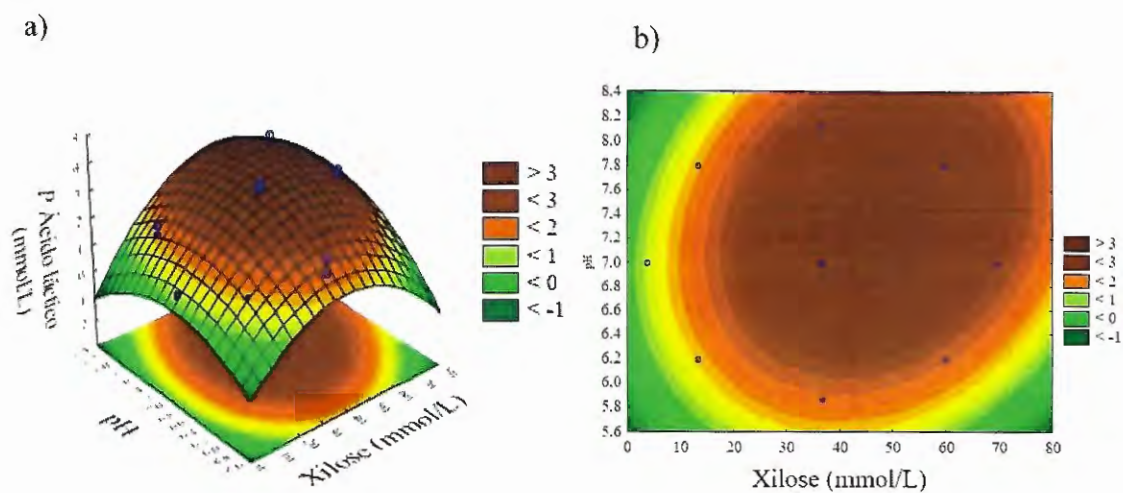


Fonte: Elaboração própria

Em relação as condições ótimas previstas de produção de etanol obteve-se 15,9 mmol/L para 35,3 mmol/L de xilose em pH 7,2. Estas condições também foram similares aquelas definidas em C9 e C10, referente ao planejamento fatorial, cujos valores obtidos foram de 16,7 e 14,0 mmol/L, obtendo-se grau de precisão do modelo de 96,5%.

Em relação a variável resposta ácido lático obteve-se 3,8 mmol/L como valor predito ótimo em pH 7,3 e 46,93 mmol/L de xilose (Figura 8). Observou-se que tais valores preditos foram discrepantes em relação aqueles obtidos para produção de hidrogênio (pH 7,0 e 33,8 mmol/L de xilose) e etanol (pH 7,3 e 33,5 mmol/L de xilose). Sendo assim, optou-se por otimizar simultaneamente as respostas etanol e hidrogênio em relação ao ácido lático para a cultura VCS1.

Figura 5.19 Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) em função da concentração de xilose e pH inicial para produção de ácido láctico



Fonte: Elaboração própria

5.4.2 Remoção de xilose

Outra resposta considerável a partir dos dados experimentais, condiz ao percentual de degradação da xilose dos ensaios C1 a C10, conforme apresentado na tabela 5.7.

Tabela 5.7 Delineamento por Composto Central da conversão de xilose pela cultura isolada VCS1

Ensaio	Xilose mmol/L		pH inicial		Degradação de xilose %		pH final
	x1	x2	Valor experimental	Valor predito			
C1	13,3	6,2	98,75	88,14			3,81
C2	13,3	7,8	98,75	94,03			4,19
C3	60,0	6,2	70,55	62,35			3,60
C4	60,0	7,8	62,22	61,15			3,71
C5	3,66	7	94,18	102,02			4,51
6	69,5	7	52,14	60,54			4,23
C7	36,6	5,87	57,27	69,90			3,66
C8	36,6	8,13	69,09	73,21			3,91
C9	36,6	7	86,36	85,45			3,56
C10	36,6	7	84,54	85,45			3,60

A partir dos dados obtidos experimentalmente observou-se variação no percentual de remoção de xilose. Nos ensaios C5, C6, C9 e C10 obteve-se remoção de xilose de 52 a 94% em pH inicial 7, e entre 3,6 a 69,5 mmol/L de xilose. No ensaio C5, com 3,6 mmol/L de xilose obteve-se remoção de 94%, enquanto no ensaio C6, com a maior concentração inicial de xilose (69,5 mmol/L) observou-se valor menor de 52%, indicando que ocorreu insuficiente remoção nesta condição. Este resultado condiz, com os dados obtidos de *P* para hidrogênio e etanol, na qual nesta condição não obteve produção, alegando assim, que a concentração mais elevada de substrato inibiu a atividade metabólica da cultura isolada VCS1. Nos ensaios C5 e C6 observou-se pH final de 4,4 e 4,0, respectivamente.

Nos ensaios C9 e C10 nos quais correspondem ao ponto central desse delineamento, para concentração inicial de xilose de 36,6 mmol/L, obteve-se remoção de 86% e 85% e pH final de 3,5 e 3,6.

Nos ensaios C1 e C2, nos quais as concentrações iniciais de xilose foram menores (13,3 mmol/L) que as demais condições, e pH inicial de 6,20 e 7,8, respectivamente, obteve-se os melhores resultados em percentual de remoção, cerca de 99%. O pH final para o ensaio C1 e C2 foram de 3,8 e 4,1, respectivamente. Em contrapartida, nos ensaios C3 e C4, com 60,0 mmol/L de xilose, e variação de pH semelhante aos ensaios C1 e C2, obteve-se remoção inferior

a 72% em pH final foram de 3,6 e 3,7, respectivamente. Sendo assim, é possível inferir que a concentração inicial de xilose tem efeito significativo na remoção do substrato pela cultura isolada VCS1, uma vez que para concentração maior que 60,0 mmol/L de xilose, obteve-se percentual de remoção reduzido e possível inibição do metabolismo microbiano.

Nos ensaios C7 e C8, nos quais manteve-se a concentração inicial de xilose semelhante aos pontos centrais (36,6 mmol/L) e variou a faixa de pH (5,84 a 8,13), observou-se que a remoção de xilose foi maior, 69%, em C8 em pH 8,13 (pH alcalino), contra 57% em C7 em pH 5,84 (pH ácido). Ciranna et al. (2014) também observaram maior remoção de glicose por *Caloramotor celer* em pH mais alcalino, 8 e 7, em relação a condições em pH 6 e 5,5.

O pH final de ambos (C7 e C8) foram de 3,6 e 3,8. Constatou-se que o pH final próximo a 3,6 foi comum nos ensaios com 36,6 mmol/L de xilose (C7, C8, C9 e C10). A partir disso pode-se inferir que não foram obtidos melhores resultados no percentual de remoção devido a valores de pH final na faixa ácida, provavelmente, relacionado ao acúmulo de ácidos orgânicos. Durand et al., (2016) constataram que o pH mínimo para crescimento da cultura *T. thermosaccharolyticum* DSM571, foi de 3,79. Sigurbjornsdottir e Orlygsson (2012), não observaram crescimento de *T. thermosaccharolyticum* AK54 em pH menor que 4,00.

Ressalta-se, como já constatado por meio do delineamento fatorial das variáveis respostas de produção de metabólitos, que valores de pH menores que 6,5 desfavorecem a produção de compostos pela cultura isolada VCS1 a partir de xilose.

Roy et al., (2013) avaliaram a influência do pH do meio na produção de hidrogênio por *T. thermosaccharolyticum*, e constataram que em fermentação com pH final de 4,5, provavelmente o pH ácido inibiu a atividade de enzimas responsáveis pela produção de hidrogênio. Os autores também reafirmam a importância do pH final na remoção de substrato, suscitando a necessidade de evitar a diminuição do pH no meio fermentativo, por meio da adição de agente tamponante para manutenção em pH 6,5 em reatores de leito fixo.

Desta forma, concluiu-se que o pH final foi importante parâmetro que influenciou a remoção de xilose e produção de metabólitos pela cultura isolada VCS1, uma vez que como observados na maioria dos ensaios, o pH final de 3,5 limitou a eficiência de remoção de xilose e produção de hidrogênio, etanol e demais ácidos orgânicos.

Por meio da análise de variância (ANOVA) dos efeitos estimados da concentração de xilose e pH inicial no percentual de remoção de xilose, observou-se que ambas as variáveis foram significativas ($p > 0,05$) (Tabela 5.8).

Tabela 5.8 Análise de variância dos efeitos estimados da concentração de xilose e pH na degradação de xilose

	Efeito	p-valor	Coef.
Intercepção	85,4545	0,000000	85,4545
Xilose (L) x1	-29,3293	0,000006	14,6646
Xilose (Q) x1 ²	-4,1710	0,462267	-2,0855
pH (L) x2	2,3416	0,583444	1,1708
pH (Q) x2 ²	-13,8961	0,024586	-6,9480
x1 . x2	-3,5486	0,557099	-1,7743

Observou-se para a variável concentração de xilose (x1) efeito linear negativo, na resposta remoção de xilose, ou seja, quanto menor a concentração inicial de xilose, em escala linear, maior será a eficiência de degradação. Para a variável pH inicial, observou-se apenas efeito quadrático negativo, ou seja, menor o valor de pH inicial, melhores serão os resultados na resposta de remoção de xilose, entretanto, como visto anteriormente, ressalta-se quanto menor o pH inicial mais rápido o pH do meio irá acidificar, devido a formação de ácidos pela cultura VCS1, inibindo assim o metabolismo da cultura.

Sendo assim, obteve-se equação do modelo proposto para a resposta remoção de xilose, a partir das variáveis concentração inicial de xilose e pH inicial, na qual z representa o valor previsto da degradação de xilose (%), x_1 o valor codificado de concentração de xilose e x_2 representa o valor codificado de pH inicial.

$$\text{Remoção: } z = 85,45 - 29,32x_1 - 13,89x_2^2 \quad R^2 = 0,81$$

Equação 5.5

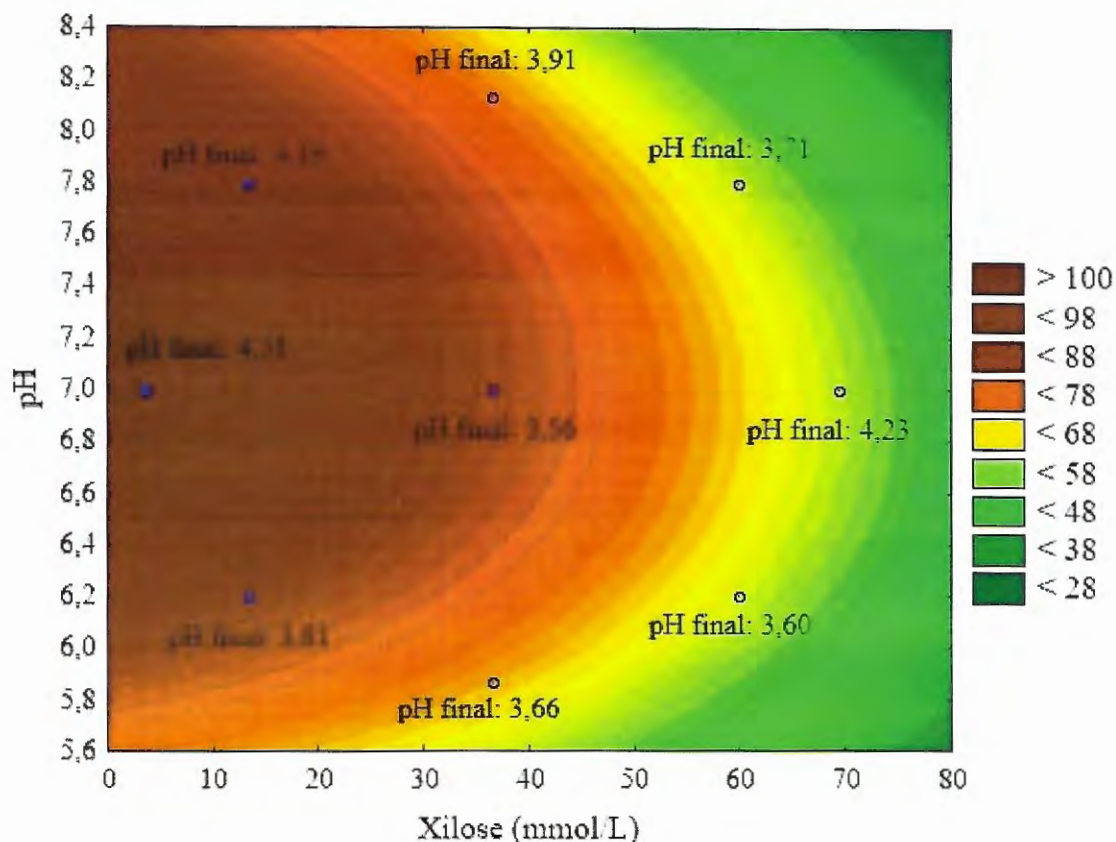
A partir da análise de variância (ANOVA) foi verificada a adequação do modelo proposto (Tabela 5.9).

Tabela 5.9 ANOVA de modelo proposto para degradação de xilose

Resposta	Fontes de variação	Soma de quadrados	Grau de Liberdade	Quadrados médios	F-calculado	F-tabelado
Remoção de xilose (%)	Regressão	3969,09	5	793,82	11,41	4,64
	Resíduo	974,43	14	69,60		
	Falta de ajuste	939,80	3	313,27		
	Erro puro	34,64	11	3,15		
	Total	4943,52	19	863,42		

Por meio dos dados obtidos de análise de variância, obteve-se $R^2 = 0,81$ e F-calculado maior que F-tabulado. O modelo referente a remoção de xilose a partir da interação das variáveis concentração de xilose e pH inicial, foi ajustado e adequado de modo significativo. Desta forma, obteve-se curvas de contorno a partir do modelo proposto (Figura 5.20).

Figura 5.20 Curvas de contorno em função da degradação de xilose



Fonte: Elaboração própria

A partir das curvas de contorno, observou-se que a região ótima de remoção de xilose foi próxima as menores concentrações iniciais de xilose (inferiores à 36,6 mmol/L) e pH 7. Para 13,3 mmol/L, o percentual de remoção foi próximo ao ótimo (100%), e a faixa de pH inicial e final foi indiferente. A região ótima se distancia a medida que a concentração de xilose aumenta, e a variação de pH inicial pouco interfere nesse percentual de degradação. Para região referente a 36,6 mmol/L de xilose e pH inicial 7, constatou-se maior proximidade a região ótima em relação as regiões em pH inicial 8,13 e 5,8, nos quais os valores percentuais aproximam-se de 68%. Ressalta-se ainda que o pH final foi igual para as três condições, indicando assim, que

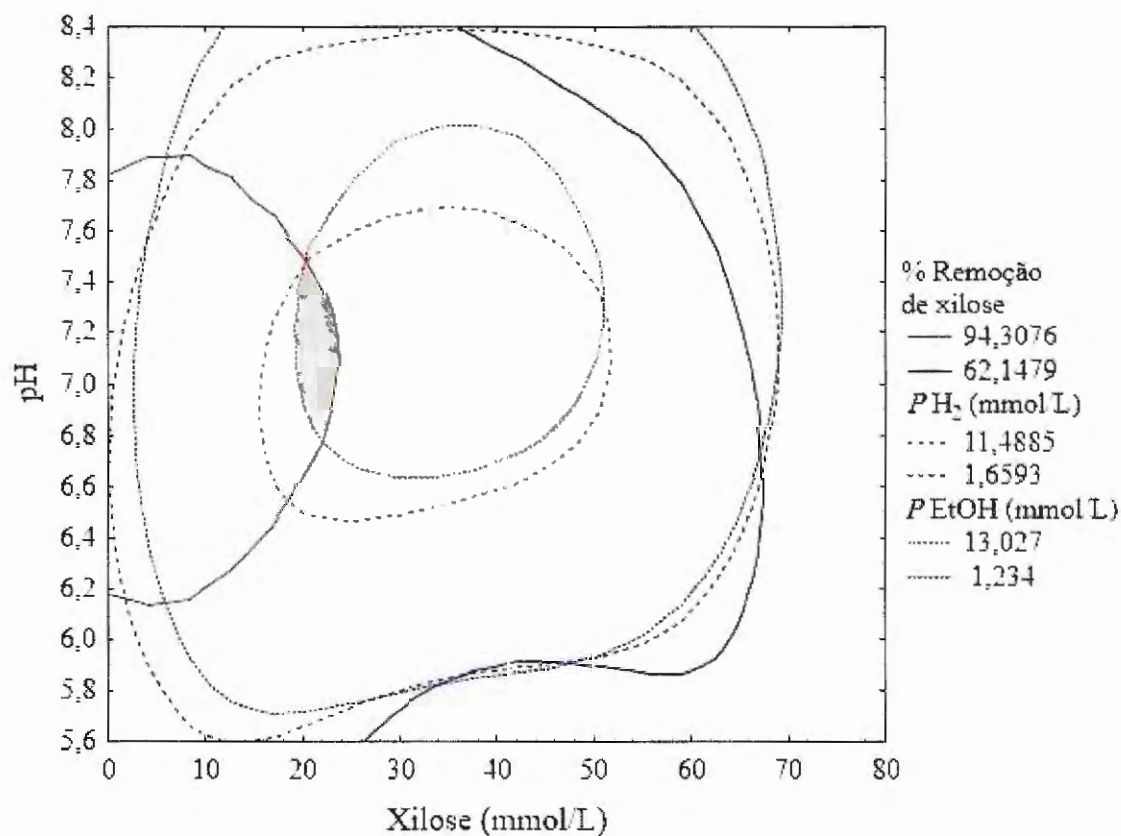
nesta condição a concentração de xilose não foi responsável por inibir o metabolismo, mas, ocorre inibição por valores de pH ácidos em relação ao ótimo.

Por fim, observou-se também nos ensaios com concentração de xilose maior que 60,0 mmol/L, menor percentual de remoção de xilose, e tanto o pH inicial, quanto o final não interferiram significativamente na resposta, indicando assim, inibição por substrato.

Analisando conjuntamente as respostas, produção de hidrogênio, etanol e degradação remoção de xilose, pela sobreposição dos respectivos dados, pode-se observar que a região ótima refere-se aquelas da otimização das condições de cultivo para cultura isolada VCS1 (Figura 5.21).

Desta forma, a otimização do processo, referente a região ótima de remoção de xilose, potencial máximo de produção de H₂ e etanol, abrange a faixa de pH entre 6,8 e 7,4, para valores próximos a 20,0 mmol/L de xilose.

Figura 5.21 Sobreposição das respostas de produção de H₂, etanol e degradação de xilose a partir das variáveis pH e xilose para cultura isolada VCS1. A área hachurada corresponde a região ótima.



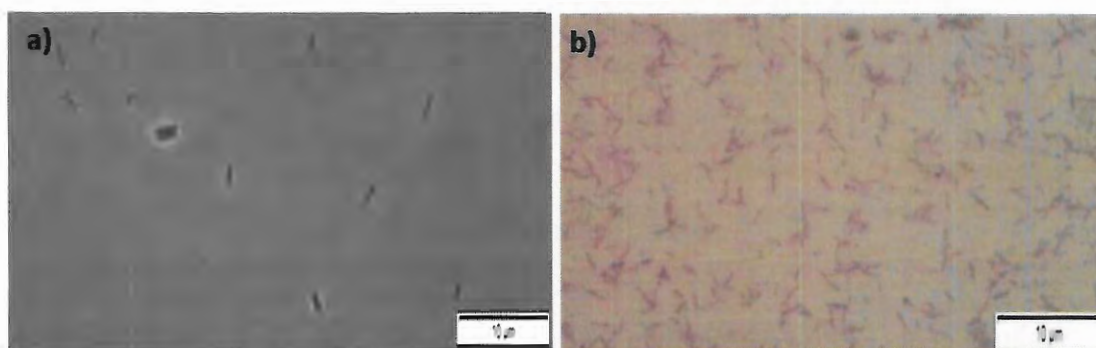
Fonte: Elaboração própria

5.5 Características morfológicas e fisiológicas de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* VCS6

5.5.1 Morfologia

Observou-se morfologia de bacilos curtos para a cultura de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* VCS6, agrupados em duas ou mais células gram-positivas, com formação de colônias irregulares, protuberantes, rugosas, translúcidas e de diâmetro de 4 a 5 mm (Figura 5.22). Morfologia semelhante foi observada para *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, sendo bacilos gram-positivos, endósporo positivo (Khamtib e Reungsang, 2012; Ren et al., 2008; Roy et al., 2013).

Figura 5.22 Microscopia de contraste de fase (a) e microscopia de luz comum (b) de bactérias gram-positivas da cultura VCS6

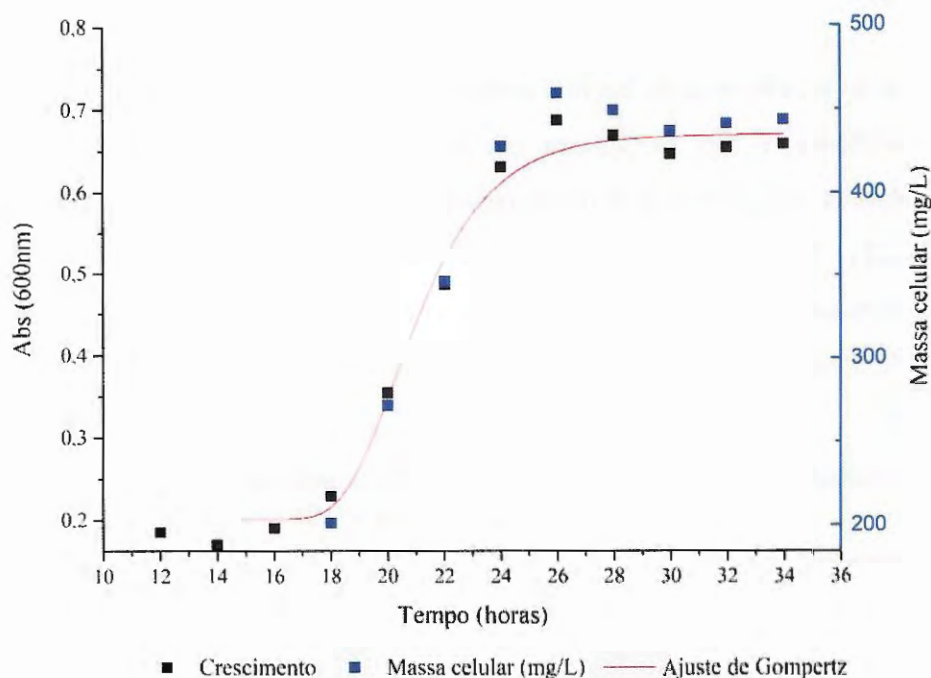


Fonte: Elaboração própria

5.5.2 Cinética de crescimento

Para a cultura isolada VCS6 obteve-se fase *lag* de 18,4 horas, e fase exponencial de aproximadamente 12 horas, com crescimento máximo de 331,9 mg/L (0,46 abs), em 34 horas de fermentação (Figura 5.23). Resultados estes bem próximos aos obtidos para a cultura isolada VCS1 ($R^2 = 0,9884$ ajustado pelo Modelo de Gompertz). Observou-se tempo de geração de 6,1 horas, e velocidade específica de $0,11 \text{ h}^{-1}$. O tempo de geração foi menor em relação a cultura isolada VCS1, e aquele obtido por Hoster et al., (2001) para *T. thermosaccharolyticum* FH1, cujo tempo de geração foi de 7,8 horas em 5,0 g/L (27,7 mmol/L) de glicose e 68°C. Entretanto, esses valores são superiores quando comparados aos obtidos por outros autores que isolaram bactérias semelhantes a *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (Khamtib e Reungsang, 2012; O-thong et al., 2008; Ren et al., 2008).

Figura 5.23 Curva de crescimento da cultura isolada VCS6 em 2,0 g/L (13,3 mmol/L) de xilose, meio *T. ethanolicus*, pH 6,8 e 55°C.



Fonte: Elaboração própria

O-thong et al., (2008) constataram fase *lag* de 2 horas, fase exponencial de 16 horas, e fermentação com duração total de 24 horas em seus estudos com a cultura isolada PSU-2 (98% de similaridade a *T. thermosaccharolyticum* DSM571). A fase *lag* obtida pelos autores foi consideravelmente menor que a fase *lag* da cultura isolada VCS6. Essa diferença provavelmente provém das diferenças nutricionais e condições de cultivo de ambas as culturas.

Os autores supracitados ressaltaram a importância da fonte de nitrogênio orgânico para o crescimento dessa espécie, uma vez que observaram aumento no crescimento celular e na produção de hidrogênio quando a fonte de nitrogênio inorgânica (NH_4Cl) foi substituída por fonte orgânica (1,0 g/L de peptona), sendo esta uma fonte de aminoácidos essencial para a síntese celular. As condições de cultivo aplicadas para a cultura PSU-2 foram meio BA, temperatura de incubação de 60°C, pH 6,25, sacarose (10,0 g/L ou 29,2 mmol/L) em reatores em batelada sequenciais. Para a cultura isolada VCS6, a fonte orgânica de nitrogênio utilizada foi o extrato de levedura (1,0 g/L) e a triptona (1,0 g/L), com acréscimo de 0,5 g/L de NH_4Cl como fonte inorgânica de nitrogênio.

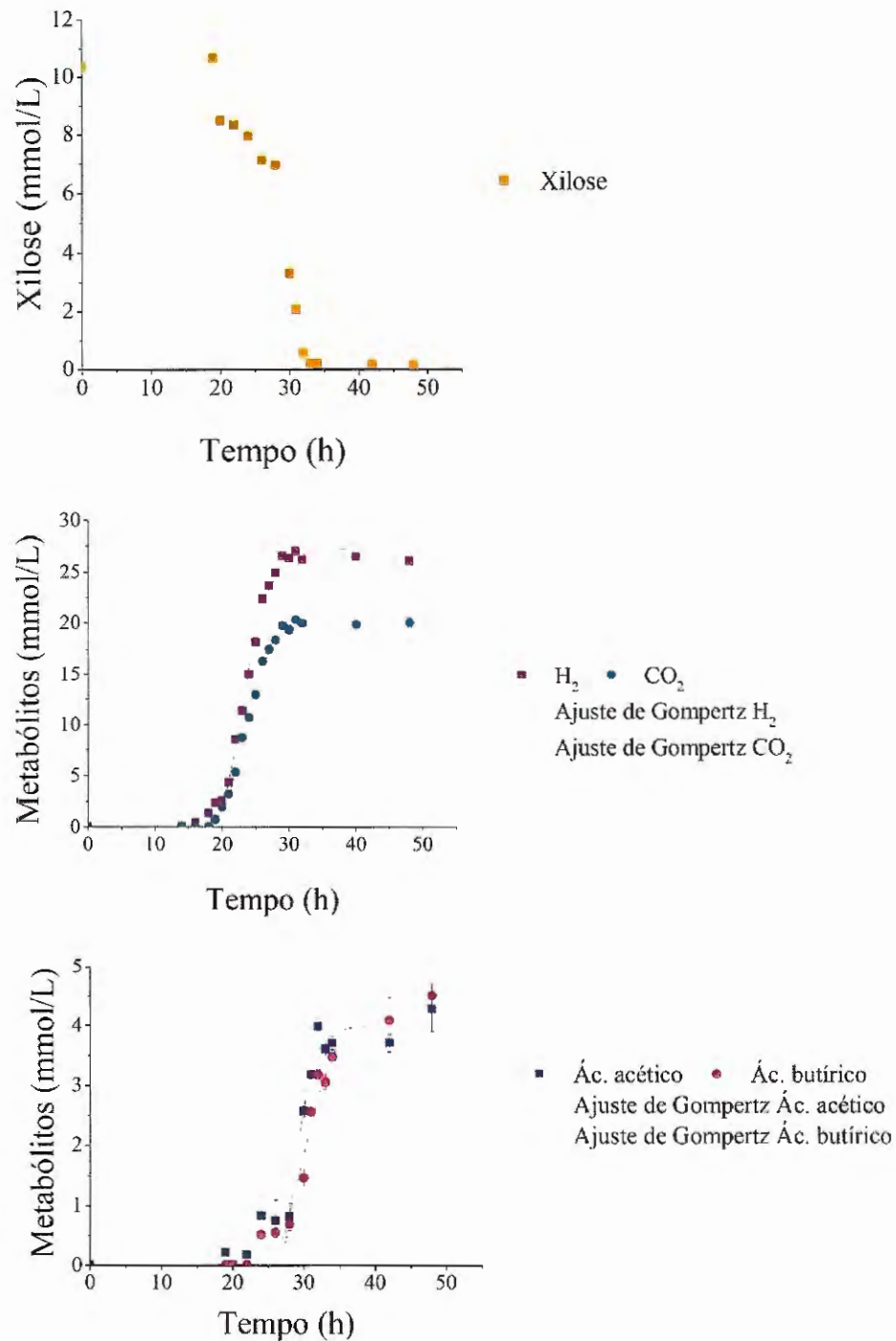
Ren et al., (2008) também observaram menor fase *lag* (5 horas) em crescimento de *T. thermosaccharolyticum* W16, com 25 horas de fermentação e fase exponencial de 10 horas. Os autores também citaram a importância da fonte de nitrogênio orgânica, sendo que a cultura foi capaz de degradar xilose na ausência desses nutrientes, entretanto, quando o meio foi suplementado com 5,0 g/L de extrato de levedura, 2,0 g/L de triptona e 10,0 g/L de xilose (66,6 mmol/L), obtiveram maior crescimento celular (OD = 1,85), correspondendo a 1,1 a 1,3 g/L de massa celular seca.

As condições de cultivo impostas neste trabalho para cultura isolada VCS6 foram o meio *T. ethanolicus* (Tabela 4.1), suplementado com 1,0 g/L de extrato de levedura e 1,0 g/L de triptona, fontes de nitrogênio orgânico, com 2,0 g/L de xilose (13,3 mmol/L), em temperatura de 55°C e pH 6,8. Estas condições nutricionais foram menos concentradas em fonte de nitrogênio e carbono em relação aos trabalhos de O-thong et al., (2008); Ren et al., (2008), podendo assim, interferir nos tempos referentes a cinética de crescimento.

5.5.3 Produção de metabólitos

Observou-se para VCS6 consumo de 99% da concentração inicial de xilose (1,5 g/L ou 10,0 mmol/L) em período de 34 horas, nas condições de cultivo com meio *T. ethanolicus*, pH 6,8 e 55°C. Os produtos observados foram principalmente H₂ (26,13 mmol/L ±1,85), CO₂ (19,97 mmol/L ±0,79), ácido acético (4,27 mmol/L ±0,37) e ácido butírico (4,50 mmol/L ±0,39) (Figura 5.24). Não se observou produção de etanol, acetona, metanol, n-butanol, glicerol, ácidos propiônico, isobutírico, valérico, isovalérico e capríco.

Figura 5.24 Produtos formados a partir do consumo de xilose (10 mmol/L) para a cultura isolada VCS6 em meio de cultivo *T. ethanolicus*, pH 6,8 e 55°C.



Fonte: Elaboração própria

Ren et al., (2008) observaram para *T. thermosaccharolyticum* W16 a partir da fermentação de xilose (10,0 g/L ou 66,6 mmol/L) em pH 6,5 e 60°C, os seguintes compostos:

H₂ (10,7 mmol/L/h), ácido acético (32,3 mmol/L) ácido butírico (18,7 mmol/L), etanol (9,1 mmol/L) e butanol (0,85 mmol/L). A partir dos resultados obtidos, os autores indicaram que a produção de hidrogênio pela cultura isolada W16, foi por via fermentativa acético-butírica.

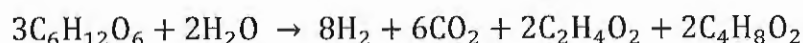
Khamtib e Reungsang, (2012) também sugeriram a via fermentativa acético-butírica para produção de hidrogênio por *T. thermosaccharolyticum* KKU19. Os autores observaram 117,54 mmol/L de H₂, 32,13 mmol/L de ácido acético, 20,57 mmol/L de ácido butírico, 16,93 mmol/L de etanol e 6,30 mmol/L de ácido fórmico, a partir da degradação de 10,0 g/L (66,6 mmol/L) de xilose.

Os dados de produção em função do tempo referentes a fermentação de xilose para VCS6, foram ajustados ao Modelo Matemático de Gompertz. O potencial máximo de produção (*P*) para hidrogênio foi de 28,26 mmol/L, seguido de 21,21 mmol/L para CO₂. Para ácido acético e ácido butírico, os valores referentes ao Potencial Máximo de Produção (*P*), foram de 4,36 e 3,97 mmol/L, respectivamente. Ao observar as taxas de produção (*Rm*), é possível inferir a preferência em produção de hidrogênio pela cultura VCS6, uma vez que *Rm* foi de 3,79 mmol/L.h para H₂, contra 0,97 mmol/L.h para ácido acético e 0,53 mmol/L.h para ácido butírico (Tabela 5.10).

Tabela 5.10 Parâmetros ajustados via Gompertz para os produtos formados a partir de xilose (1,5 g/L) em meio *T. ethanolicus*, pH 6,8 e 55°C para a cultura isolada VCS6

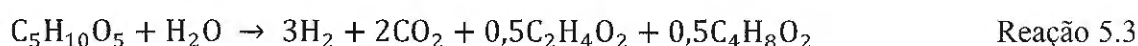
Produtos	<i>P</i> (mmol/L)	<i>Rm</i> (mmol/L.h)	λ (h)	R ²
H ₂	28,26	3,79	19,84	0,9944
CO ₂	21,21	2,84	20,03	0,9972
Ácido butírico	4,36	0,53	26,5	0,9735
Ácido acético	3,97	0,97	27,14	0,9469

A via acético-butírica para a produção de hidrogênio por culturas de *T. thermosaccharolyticum*, também foi citada por O-thong et al., (2008). Os autores constataram principalmente produção de hidrogênio, ácido acético e butírico, a partir da fermentação da sacarose. Concentrações menores de ácido láctico e propiônico foram observadas, entretanto, 80% dos ácidos formados corresponderam ao ácido acético e ácido butírico. Os autores relataram razão de 1/1 em base molar para esses ácidos orgânicos, sendo assim, propuseram uma reação 5.2, exemplificando a produção de hidrogênio a partir de glicose, sendo:



Reação 5.2

Para a cultura isolada VCS6, também obteve-se razão próxima a 1/1 de ácido acético e ácido butírico, sendo o H₂ o principal produto a partir da degradação da xilose, indicando assim a via fermentativa foi acético-butírica, a mesma observada pelos autores supracitados para bactérias semelhantes a *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* em glicose (Chang e Yao, 2011). A partir dos dados obtidos neste trabalho, sugeriu-se a reação estequiométrica 5.2, sendo o rendimento teórico de 3 mols de H₂, 2 mols de CO₂, 0,5 mols de ácido acético e ácido butírico por mol de xilose metabolizada.



Portanto, obteve-se para a cultura isolada VCS6 rendimento de 2,69 mol-H₂ / mol de xilose, correspondendo a 86,9% em relação ao rendimento teórico.

A conversão da matéria orgânica em metabólitos (ácido acético e butírico) foi de 56,5%, e o residual observado provavelmente foi convertido em H₂, CO₂ e crescimento celular (Tabela 5.11).

Khamtib e Reungsang, (2012), avaliaram faixas de pH inicial, temperatura e concentração de xilose, visando otimizar a condição de cultivo para *T. thermosaccharolyticum* KKKU19 para obtenção de hidrogênio. As condições otimizadas foram de 10,0 g/L de xilose (66,6 mmol/L), pH 6,5 e 60°C, com rendimento de 2,09 mol-H₂/mol de xilose e taxa de produção de 3,94 mmol-H₂/L.h. Para a cultura isolada VCS6 obteve-se rendimento superior ao obtida pelos autores; ou seja de 2,69 mol H₂/ mol de xilose, em condições semelhantes à otimizada, pH 6,5 e 55°C, exceto concentração inicial de xilose, que neste trabalho foi de 1,5 g/L (10,0 mmol/L).

Tabela 5.11 Balanço da fermentação de xilose (1,5 g/L ou 10,0 mmol/L) por cultura isolada VCS6 em meio *T. ethanolicus*, pH 6,8 e 55°C

Substrato:	mmol/L
Xilose	10,0
Produtos	
Ácido Acético	3,97
Ácido Butírico	4,36
CO ₂	21,2
H ₂	28,26
DQO	
Inicial	1,68
Produtos	0,95
Residual	0,73
Rendimento	
Hidrogênio	2,69
Ácido acético	0,38
Ácido butírico	0,42

Ren et al., (2008) em seus estudos com *T. thermosaccharolyticum* W16, também avaliaram os parâmetros pH, temperatura e concentração inicial de xilose para produção de hidrogênio. Os autores obtiveram resultados semelhantes aos descritos por Khamtib e Reungsang, (2012), com rendimento de 2,19 mol H₂/ mol de xilose, e taxa de produção (*Rm*) de 10,7 mmol/L.h nas condições ótimas de pH de 6,5 a 60°C a partir da fermentação de 10,0 g/L de xilose. Ressalta-se que a taxa de produção obtida pelos autores foi significativamente maior à relatada neste trabalho (*Rm* = 3,79 mmol/L.h), e por Khamtib e Reungsang, (2012) (*Rm* = 3,94 mmol/L.h).

Obteve-se para a cultura isolada VCS6 rendimento superior ao relatado para outras bactérias semelhantes a essa (Tabela 5.12), nas condições de cultivo apresentadas desde a etapa de isolamento.

Tabela 5.12 Rendimento em hidrogênio a partir de bactérias anaeróbias e termófilas da espécie *T. thermosaccharolyticum*

Microrganismo	Substrato	Temperatura	pH	Rendimento	Referência
<i>T. thermosaccharolyticum</i> KKU19	Hidrolisado de bagaço de sorgo (hidrólise enzimática)	55°C	6,5	2,02 mol H ₂ . mol ⁻¹ -substrato consumido	Boonsayompoo e Reungsang, 2013
<i>T. thermosaccharolyticum</i> KKU19	Xilose (10 g.L ⁻¹)	60°C	6,5	2,09 mol H ₂ . mol ⁻¹ -substrato consumido	Khamtib e Reungsang (2012)
<i>T. thermosaccharolyticum</i> W16	Xilose (12,24 g.L ⁻¹)	60°C	6,5	2,39 mol H ₂ . mol ⁻¹ -xilose	Cao et al
<i>T. thermosaccharolyticum</i> W16	Glicose (10 g.L ⁻¹)	60°C	6,5	2,42 mol H ₂ . mol ⁻¹ -xilose	Ren et al, 2008
<i>T. thermosaccharolyticum</i> W16	Xilose (10 g.L ⁻¹)	60°C	6,5	2,19 mol H ₂ . mol ⁻¹ -xilose	Ren et al, 2008
<i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2	Sacarose (20 g.L ⁻¹)	60°C	6,25	2,53 mol H ₂ . mol ⁻¹ -sacarose	O-thong et al, 2008
<i>T. thermosaccharolyticum</i> VCS6 - cultura isolada	Xilose (2 g.L ⁻¹)	55°C	6,8	2,69 mol H ₂ . mol ⁻¹ -xilose	Neste trabalho

5.5.4 Consumo de hexoses e pentoses

Em relação a cultura isolada VCS6 obteve-se crescimento em vários substratos orgânicos, a saber: 5,5 mmol/L de glicose, 5,5 mmol/L de frutose, 6,6 mmol/L de xilose, 6,6 mmol/L de arabinose, 2,9 mmol/L de sacarose, 5,5 mmol/L de galactose, 5,5 mmol/L de manose e 2,9 mmol/L de celobiose. Não se observou crescimento em celulose e extrato de levedura. Para xilose e frutose, açúcares de simples, o crescimento máximo observado foi de 0,628 abs (426,9 mg/L) e 0,592 abs (406,5 mg/L) em 24 horas. Evidenciou-se também o crescimento em até 24 horas em arabinose, 0,569 abs (393,5 mg/L), açúcar de difícil degradação, muito comum em resíduos lignocelulósicos.

O crescimento (0,522 abs. ou 367,0 mg/L) em glicose ocorreu em 36 horas de fermentação, e semelhante para os demais açúcares, tais como, manose (0,559 abs. ou 387,9 mg/L), celobiose (0,547 abs. ou 381,1 mg/L) e galactose (0,477 abs. ou 341,6 mg/L). Para sacarose, observou-se crescimento máximo (0,669 abs ou 450,1 mg/L) após 48 horas.

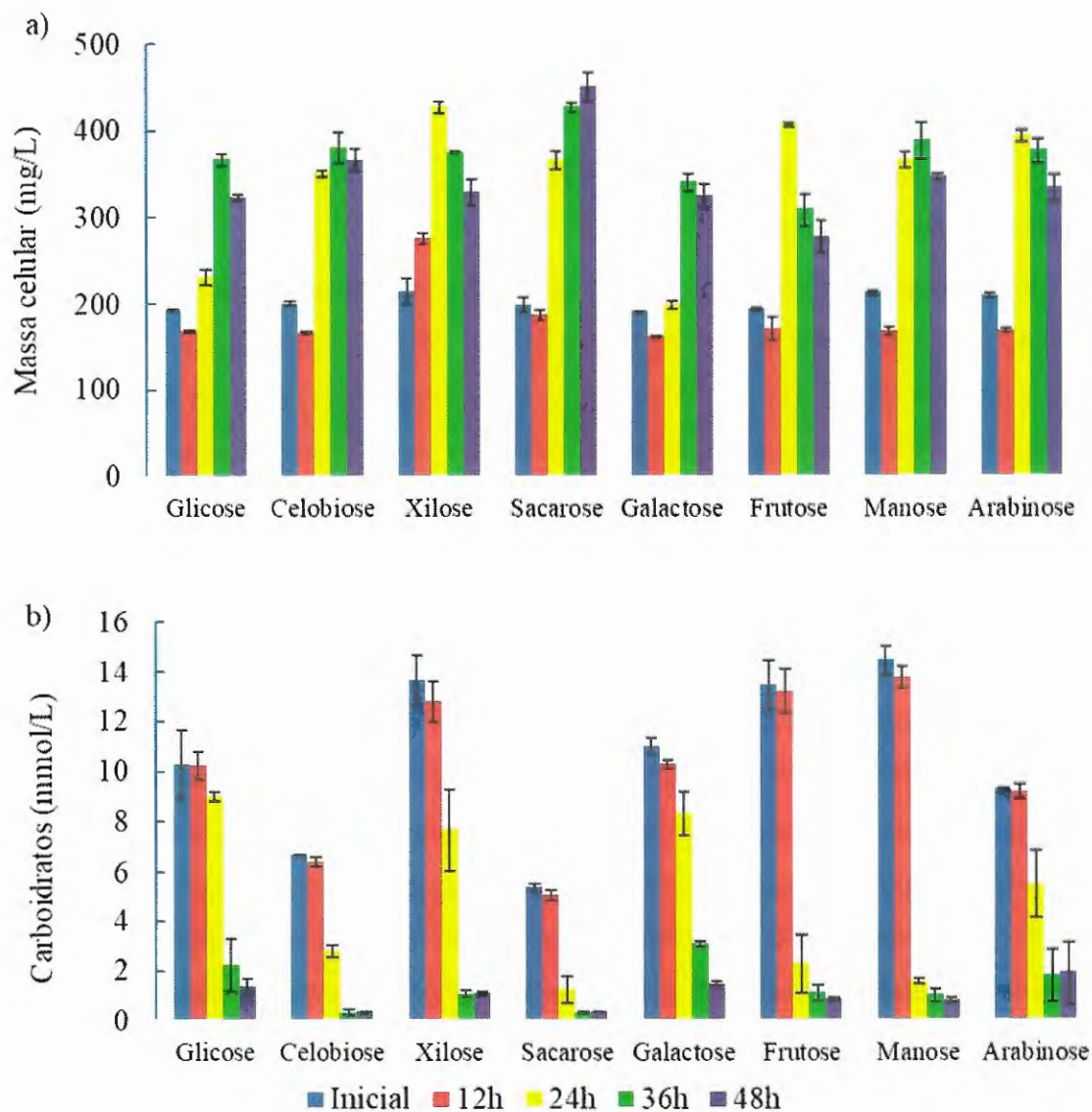
O-thong et al., (2008) obtiveram resultados semelhantes em seus estudos com a cultura *T. thermosaccharolyticum* PSU-2, com crescimento em arabinose, frutose, galactose, glicose, manose, xilose, celobiose e sacarose. Também observaram crescimento em ramosa, lactose, maltose, trealose, rafinose, dextrana, amido, xilana, celulose, extrato de levedura, e peptona. Os autores observaram crescimento máximo no final da fase exponencial, após 24 horas de fermentação, e a partir de 10,0 g/L de substrato, cujo rendimento em massa celular foi de 0,51 g/g de glicose e 0,45 g/g de sacarose. Estes resultados foram próximos aos obtidos para a cultura isolava VCS6, de 0,37 g/g de glicose e 0,45 g/g de sacarose, a partir de 1,0 g/L de cada substrato.

O crescimento celular em pentoses e hexoses por culturas de *T. thermosaccharolyticum* também foi estudada por outros autores. Ren et al., (2008) constataram crescimento da cultura W16 em 10,0 g/L de sacarose, lactose, celobiose, glicose, frutose e xilose (absorbância maior que 1,5), e crescimento discreto (abs < 0,5) para celulose e xilana. Especificamente para glicose e xilose, verificaram crescimento máximo em densidade celular de 3,2 e 2,7, após 24 horas de fermentação, no final da fase exponencial de crescimento. Khamtib e Reungsang, (2012) também observaram crescimento em xilose, arabinose, glicose, frutose, galactose, manose, sacarose, celobiose e extrato de levedura, porém não constatou crescimento em xilana e celulose.

Verificou-se consumo dos diferentes substratos orgânicos maior que 80%. Os melhores resultados foram obtidos para celobiose (95%), sacarose (94%), manose (93%), xilose (92%),

frutose (92%) e arabinose (80%) em 36 horas de fermentação. Obteve-se maior consumo de glicose e galactose; ou seja, de 87% e 86%, respectivamente, após 48 horas (Figura 5.25).

Figura 5.25 Crescimento celular (a) e consumo de substrato (b) por cultura isolada VCS6 a partir de pentoses e hexoses em pH 7 e 55°C



Fonte: Elaboração própria

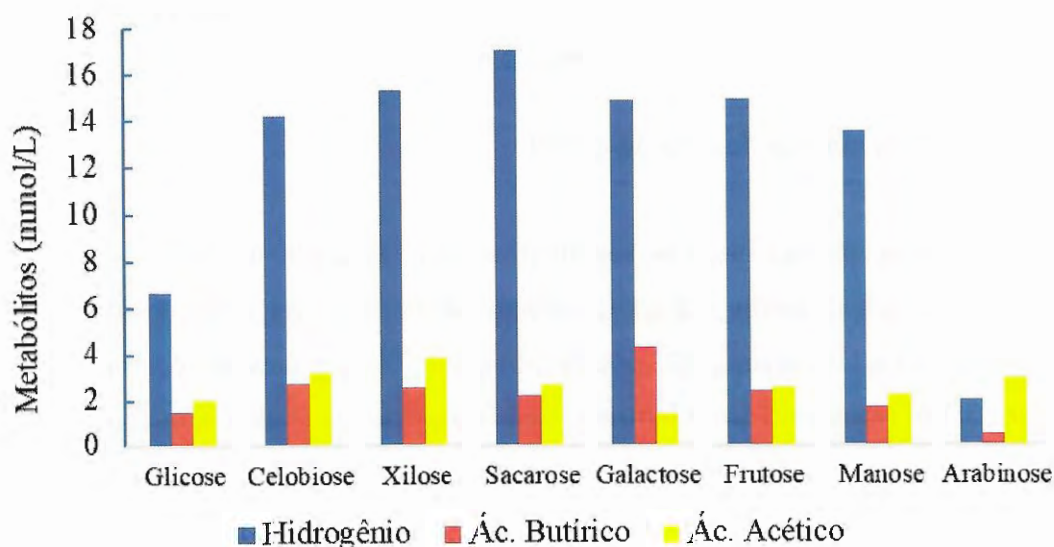
Para todos os substratos orgânicos, observou-se a formação dos mesmos metabólitos, com maior produção de hidrogênio, seguido de ácido acético e ácido butírico. Os maiores rendimentos de produção foram para os dissacarídeos sacarose e celobiose, sendo 3,18 mol H₂/mol e 2,13 mol H₂/mol, respectivamente. Para arabinose, observou-se moderada produção de metabólitos, inferindo assim, dificuldades em metabolizar esse substrato (Figura 5.26).

O-thong et al., (2008) também observaram produção de hidrogênio, ácido acético e butírico por *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 a partir de 10,0 g/L de amido, celobiose, glicose, xilose e sacarose, além de produção de butanol, ácido propiônico e etanol na degradação de polímeros de xilana e celulose.

Os mesmos metabólitos foram observados por Ren et al., (2008) para a cultura W16, sendo hidrogênio, ácido acético, ácido butírico, etanol e butanol, a partir de sacarose, lactose, celobiose, glicose, frutose e xilose (10,0 g/L). Não foi significativa a produção de metabólitos a partir de celulose e xilana.

Nos ensaios com a cultura isolada VCS6, não foram observados etanol e butanol, entretanto, a concentração de substrato foi menor que a utilizada pelos autores supracitados (1,0 g/L), sendo assim, pode ter ocorrido formação desses compostos, porém em concentrações menores que o limite de detecção do equipamento (Anexo D).

Figura 5.26 Produtos formados para acultura isolada VCS6 a partir de pentoses e hexoses (1,0 g/L) em pH 7 e 55°C



Fonte: Elaboração própria

Desta forma, a partir dessas possibilidades pode-se inferir que a cultura isolada VCS6 produz hidrogênio a partir de pentoses e hexoses. Além disso, amplia as possibilidades de sua aplicação para degradação de diversos substratos orgânicos, destacando os constituídos de biomassa lignocelulósica, como hidrolisado da palha de milho (Ren et al., 2008), hidrolisado de madeira de palmeira (Sitthikitpanya et al., 2017), bagaço de cana de açúcar (Saripan e Alissara, 2013).

5.6 Fermentação e bioaugmentação das culturas isoladas VCS1 e VCS6 em vinhaça de cana-de-açúcar

A auto-fermentação da vinhaça, consiste em submeter a comunidade autóctone presente na vinhaça de cana-de-açúcar às condições anaeróbias e termófilas, a fim de fermentar os açúcares residuais e obter produtos metabólicos.

A fermentação a partir da vinhaça de cana-de-açúcar esterilizada e inoculada com as culturas isoladas VCS1 e VCS6 objetivou-se a avaliar o comportamento das culturas puras na remoção de açúcares e compostos residuais da vinhaça. A vinhaça bruta foi autoclavada a 121°C por 20 minutos, a fim de garantir sua esterilidade da vinhaça e possibilitar a condição de fermentação por cultura pura.

A bioaugmentação é uma estratégia utilizada para potencializar a degradação dos substratos e melhorar a estabilidade do processo, durante a qual adiciona-se no reator uma cepa específica ou população microbiana com atividade catalítica desejada (Kumar et al., 2016; Sivagurunathan e Kumar, 2015). Portanto, optou-se por bioaugmentar a vinhaça bruta com as culturas isoladas VCS1 e VCS6, e avaliar as vantagens reportadas na degradação do substrato e aumento de rendimento na produção de hidrogênio e produtos de agregado valor.

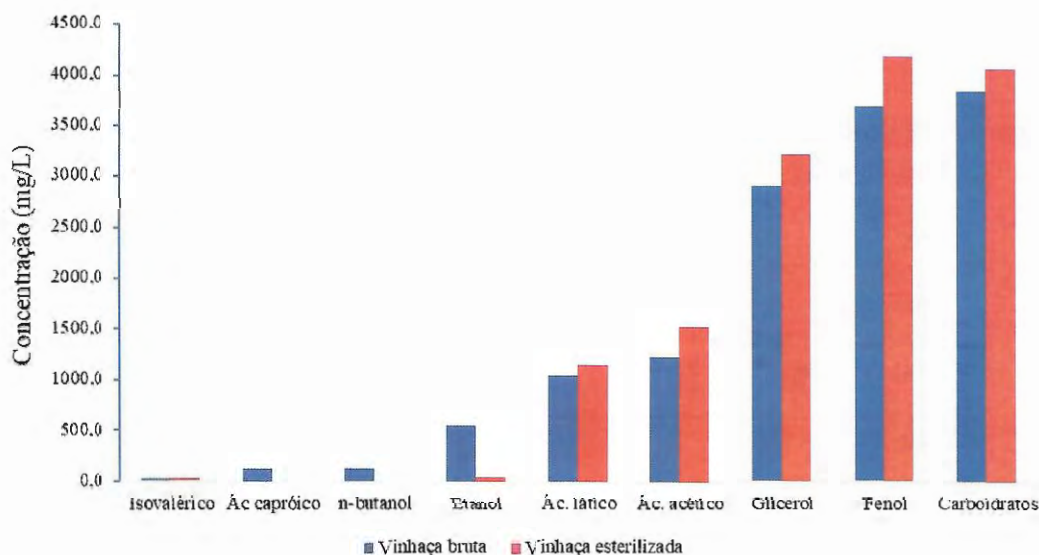
5.6.1 Caracterização da vinhaça de cana-de-açúcar

Obteve-se para a vinhaça bruta os seguintes valores: 30,9 g/L de DQO, 3,9 g/L de carboidratos totais, 3,6 g/L de fenóis, 2,9 g/L de glicerol, além de 1,2 g/L de ácido acético, 1,0 g/L de ácido láctico, 0,5 g/L de etanol, 0,13 g/L de n-butanol, 0,12 g/L de ácido capróico e 0,02 g/L de isovalérico. Em relação ao ácido butírico, ácido propiônico e ácido valérico os valores observados foram abaixo do limite de detecção do método cromatográfico (Anexo D)

Em relação a vinhaça bruta esterilizada, não foi observado alteração em sua composição, exceto para etanol ($< 0,05$ g/L), n-butanol e ácido capróico que provavelmente foram volatilizados (Figura 5.27). O pH da vinhaça bruta e vinhaça esterilizada foi ajustado a pH inicial 7.

Resultados similares a concentração de DQO e carboidratos em vinhaça de cana de açúcar foram reportadas por Ramos and Silva, (2017), sendo pH de 4,41, 6,2 g/L de carboidratos totais, 28,6 g/L de DQO e Lucas T Fuess et al., (2015), com 5,6 g/L de carboidratos e 28,3 g/L de DQO.

Figura 5.27 Caracterização da vinhaça de cana-de açúcar bruta e estéril



Fonte: Elaboração própria

5.6.2 Produção de Hidrogênio

Avaliou-se a produção de hidrogênio a partir das seguintes condições: auto-fermentação da vinhaça bruta, fermentação com cultura pura VCS1 e VCS6, e a partir da bioaugmentação da vinhaça bruta com as culturas isoladas em reatores distintos.

A produção de hidrogênio foi observada em todas as condições analisadas, entretanto, não se observou produção de hidrogênio para a vinhaça estéril e inoculada com a cultura isolada VCS1, na qual a produção acumulada não excedeu $1,09 \pm 0,01$ mmol/L de hidrogênio durante as 96 horas de incubação.

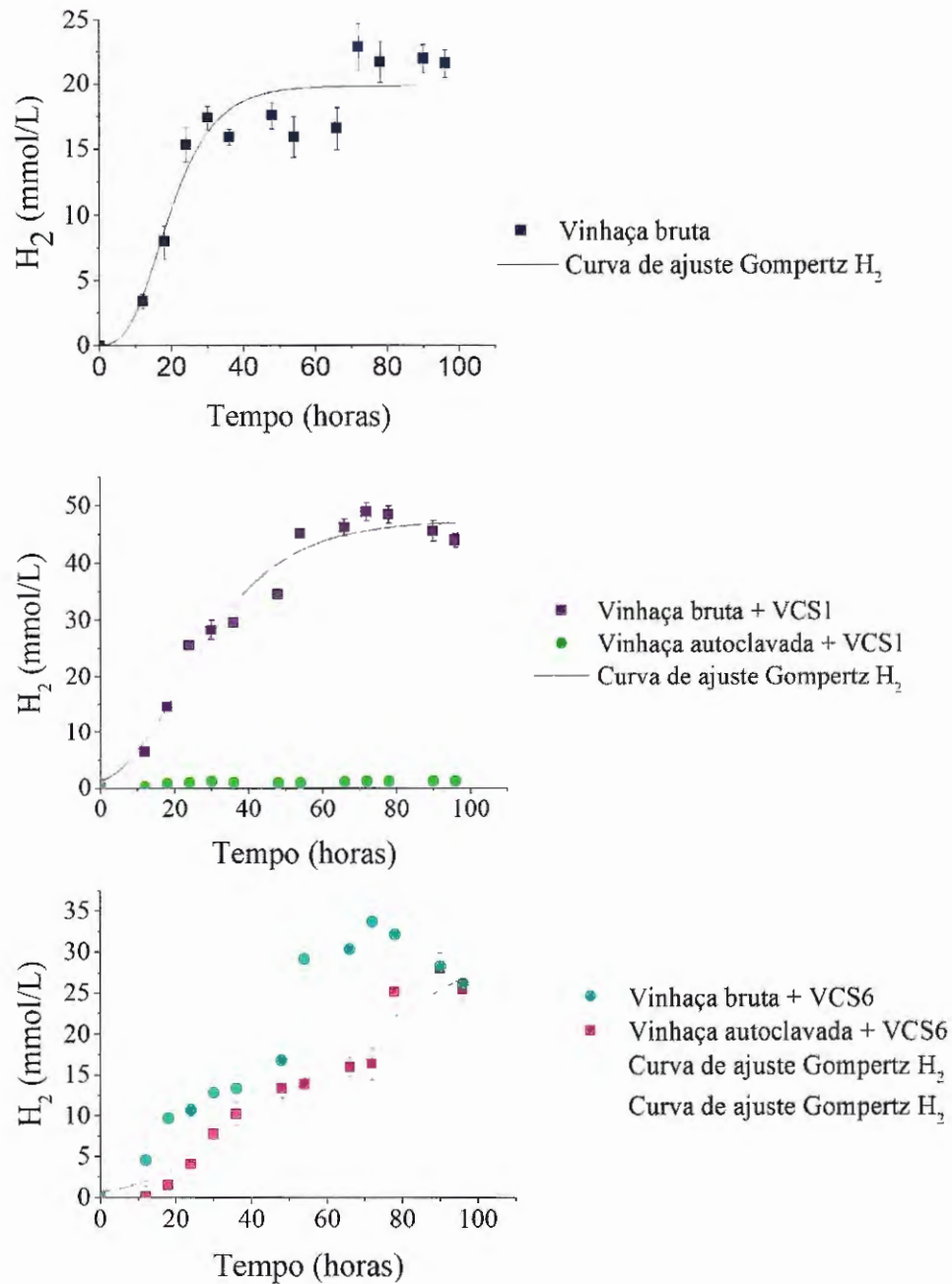
Na auto-fermentação da vinhaça obteve-se produção acumulada de H_2 de $22,89 \pm 1,84$ mmol/L em 72 horas, após esse período, observou-se diminuição da produção e formação de sulfeto na fase gasosa de 1,38 mmol/L (Figura 5.28).

Para as condições dos ensaios com a vinhaça bruta e bioaugmentada com a cultura isolada VCS1 observou-se os melhores resultados de produção acumulada de hidrogênio, cerca de $48,77 \pm 1,59$ mmol/L em 72 horas de incubação, e logo após, observou-se novamente diminuição dessa produção e formação de sulfeto (Figura 5.28).

Nos ensaios com a cultura isolada VCS6, também constatou significativa produção de hidrogênio. Na vinhaça estéril e inoculada com a cultura isolada VCS6, a produção observada foi de $25,38 \pm 1,26$ mmol/L em 96 horas de incubação, enquanto no processo de bioaugmentação

da vinhaça bruta com a cultura VCS6, a produção acumulada de hidrogênio foi de $33,63 \pm 1,21$ mmol/L em 72 horas, e depois decréscimo e surgimento de sulfeto (Figura 5.28).

Figura 5.28 Produção de hidrogênio a partir de vinhaça de cana-de-açúcar por auto-fermentação e bioaugmentação com VCS1 e VCS6, em pH 7 e 55°C



Fonte: Elaboração própria

Os dados obtidos experimentalmente foram ajustados ao modelo matemático de Gompertz, e obteve-se resultados referentes ao Potencial máximo de produção de hidrogênio (P), taxa máxima de produção (Rm) e a tempo de adaptação ao substrato (λ), estes descritos na Tabela 5.13.

Tabela 5.13 Parâmetros ajustados ao modelo de Gompertz para produção de hidrogênio pela cultura isolada de VCS1 e VCS6 a partir de vinhaça em meio *T. ethanolicus*, pH 6,8 e 55°C

Produtos	P (mmol/L)	Rm (mmol/L.h)	λ (h)	R^2	Rendimento por DQO ¹	Rendimento por carboidratos ²
Vinhaça bruta	19,85	0,85	7,68	0,8876	0,64	0,94
Vinhaça + VCS1	47,24	1,12	5,06	0,9637	1,52	2,24
Cultura pura VCS6	36,38	0,35	14,67	0,9400	1,22	1,65
Vinhaça + VCS6	32,06	0,57	6,64	0,8899	1,03	1,52

¹ mmol / g-DQO afluyente

² mol / mol-carboidratos totais

O melhor desempenho em P correspondeu a fermentação da vinhaça bruta, com sua própria comunidade microbiana acrescentado a cultura isolada VCS1, obtendo-se Potencial de produção (P) de 47,24 mmol/L, melhor taxa de produção (Rm de 1,12 mmol/L h), e o menor tempo de adaptação, 5,06 horas.

Outro dado importante, refere-se a cultura isolada VCS6, no qual a partir da fermentação da vinhaça esterilizada, obteve-se os melhores resultados, sendo P de 36,38 mmol/L contra 19,85 mmol/L para a auto-fermentação da vinhaça bruta.

Constatou-se maior taxa de produção ($Rm = 0,85$) e menor tempo de adaptação ($\lambda = 7,68h$), na condição de auto-fermentação da vinhaça bruta, em contrapartida, a condição de fermentação com cultura pura VCS6, obteve menor taxa de produção e maior tempo de adaptação ($Rm = 0,35$ e $\lambda = 14,67h$), fato esse justificável, uma vez que a vinhaça esterilizada é constituída por elevada carga orgânica (DQO 29,8 g/L), na qual a cultura isolada VCS6, não tinha sido anteriormente adaptada.

Por fim, obteve-se para a vinhaça bruta bioaumentada com a cultura isolada VCS6, resultados superiores aos obtidos via auto-fermentação da vinhaça ($P = 32,06$ contra $P = 19,85$), porém observou-se potencial de produção menor em relação a fermentação a partir da cultura pura, na qual obteve-se potencial de hidrogênio de 36,38 mmol/L. Sob tais condições, pode-se inferir que a cultura isolada VCS6, é uma bactéria produtora de hidrogênio, capaz de utilizar

compostos orgânicos da vinhaça, entretanto, em conjunto com a comunidade microbiana da vinhaça bruta, exerceu função importante na produção de hidrogênio, porém outras rotas podem ter sido favorecidas.

Dessa forma, o melhor rendimento observado foi de 1,52 mmol-H₂/ g DQO afluente e 2,24 mol-H₂ / mol carboidratos totais, a partir da bioaugmentação da vinhaça bruta (30,9 g/L de DQO) para a cultura isolada VCS1. Ressalta-se que o rendimento em hidrogênio para a cultura isolada VCS6, na qual estava pura, sem cooperação com outras populações de bactérias foi de 1,22 mmol-H₂/g DQO afluente e 1,65 mol-H₂/mol carboidratos totais.

A produção de hidrogênio a partir da vinhaça de cana-de-açúcar vem sendo estudada por diversos autores, uma vez que é um resíduo do processo de produção de etanol, com elevada carga orgânica e potencial de produção de energia, como hidrogênio e metano.

Lazaro et al., (2014) avaliaram diferentes concentrações de DQO afluente e temperatura na degradação de vinhaça de cana-de-açúcar por consórcio microbiano. Os autores utilizaram meio sintético e vinhaça como substrato (2,0, 5,0, 7,0 e 12 g/L de DQO). Os autores verificaram que em condição termófila (55°C), a concentração do substrato interferiu significativamente na produção de hidrogênio, obtendo-se 2,31 mmol-H₂ /g DQO afluente para menor concentração de vinhaça, e 0,44 mmol-H₂/g DQO afluente para 12,0 g/L. Os autores clonaram e sequenciaram colônias produtoras de hidrogênio a partir do consórcio microbiano, e as cepas foram classificadas em 100% de similaridade com *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16, mesma classificação obtida para a cultura isolada VCS6. Esses resultados elucidaram a hipótese de obter melhores rendimentos a partir das culturas isoladas VCS1 e VCS6, caso a carga orgânica da vinhaça seja diminuída e as condições de fermentação otimizadas, e bom desempenho da cultura isolada VCS6, com rendimento de 1,22 mmol-H₂/g DQO afluente em vinhaça bruta, com concentração de DQO maior das utilizadas por Lazaro et al (2014).

Ferraz et al., (2014) utilizaram vinhaça com características semelhantes a utilizada neste trabalho, sendo DQO 35,2 g/L e carboidratos totais de 4,1 g/L na produção de hidrogênio em reatores de leito fixo e fluxo ascendente em condição termófila (55°C). Os autores obtiveram rendimentos de 2,4 mol-H₂ / mol carboidratos totais a partir da fermentação por consórcio microbiano, rendimento similar ao obtido pela cultura VCS1 em bioaugmentação da vinhaça bruta (2,24 mol-H₂ / mol carboidratos totais). Os autores também clonaram e sequenciaram amostras e verificaram 99% de similaridade com *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* DSM571. Para a cultura isolada VCS6 (100% de similaridade a *T. thermosaccharolyticum*), e rendimento de 1,65 mol-H₂ / mol-carboidratos totais a partir da

vinhaça em condições de cultura pura, e 1,52 mol-H₂ / mol-carboidratos totais a partir da bioaumentação em vinhaça bruta. Os rendimentos da presente pesquisa foram menores em relação ao trabalho de Ferraz et al., (2014), provavelmente devido as condições de reator e adaptação da biomassa, uma vez que este reator de leito fixo e fluxo ascendente foi operado por 30 dias. Entretanto, foi possível observar que os autores também constataram em suas amostras biológicas, similaridade a *T. thermosaccharolyticum* em condições de carga orgânica elevada, corroborando assim, a capacidade da cultura isolada VCS6 produzir hidrogênio eficientemente a partir da vinhaça bruta.

T. thermosaccharolyticum também foi aplicada como cultura pura para produção de hidrogênio a partir de outros resíduos. Cao et al., (2009) obtiveram rendimento de 2,24 mol-H₂ / mol-carboidratos a partir da fermentação de hidrolisado de palha de milho por *T. thermosaccharolyticum* W16. Boonsayompoo e Reungsang, (2013) utilizaram a cultura pura de *T. thermosaccharolyticum* KKU19 em hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino e constataram rendimento em meio de cultivo BA de 1,42 mol-H₂ / mol-carboidratos consumidos, e ao otimizar as condições de cultivo, obtiveram aumento do rendimento para 2,02 mol-H₂/mol-carboidrato consumido.

Desta forma, a partir dos resultados obtidos em produção de hidrogênio, foi verificada a capacidade da cultura VCS6 em produzir hidrogênio a partir da vinhaça, até mesmo em cargas orgânicas elevadas. Não se obteve para cultura isolada VCS1 produção de hidrogênio a partir da vinhaça, indicando assim, que as características da vinhaça de cana-de-açúcar podem ter desfavorecido o cultivo da cultura isolada VCS1.

5.6.3 Produção de etanol e ácidos orgânicos

A vinhaça bruta contém residual de etanol e ácidos orgânicos (Figura 5.27), e durante os ensaios de fermentação e auto-fermentação, observou-se principalmente etanol, ácido acético, ácido butírico e ácido láctico. Em relação aos ácidos propiônico, valérico, isovalérico, isobutírico, capróico e butanol, provavelmente, estiveram em menor concentração que o limite de detecção do método cromatográfico (Anexo D).

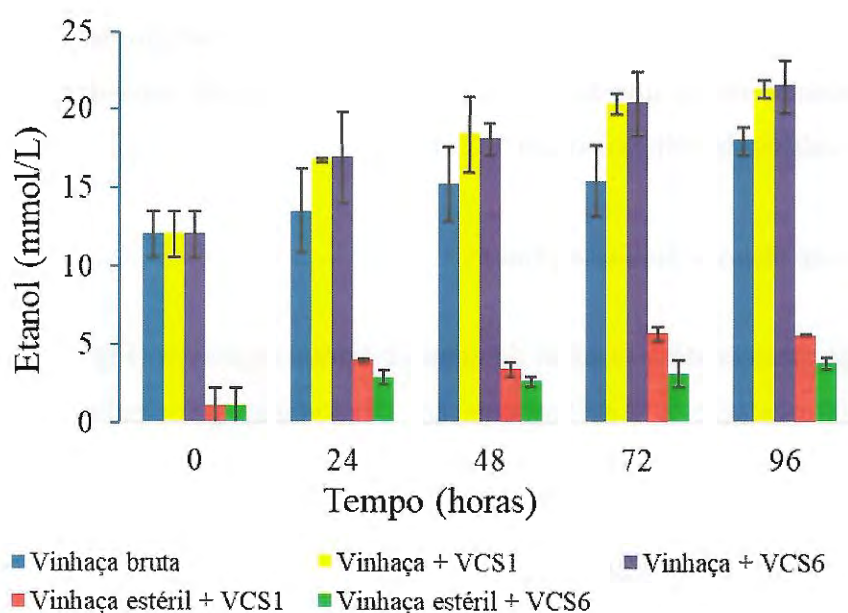
Para as condições de auto-fermentação da vinhaça bruta com consórcio autóctone obteve-se 5,93±0,82 mmol/L de etanol, desconsiderando o residual inicial. Nas condições dos ensaios com vinhaça estéril e inoculada por cultura VCS1, anteriormente caracterizada como produtora de hidrogênio e etanol, obteve-se 4,52±0,02 mmol/L de etanol. Para as condições de cultura pura por VCS6 observou-se valor inferior, ou seja, de 2,72±0,36 mmol/L. Para os

ensaios com vinhaça bioaugmentada com VCS1 e VCS6, obteve-se produção semelhante de $9,22 \pm 0,58$ mmol/L e $9,47 \pm 1,67$ mmol/L, respectivamente (Figura 5.29).

Fuess et al., (2018) associaram a produção de etanol a partir da auto-fermentação da vinhaça de cana-de-açúcar, ao metabolismo de bactérias heteroláticas, as quais podem fermentar carboidratos, principalmente em ácido láctico e etanol, tais como as semelhantes a *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, sendo esta última, bactéria heterolática, que converte ácido pirúvico em etanol, como estratégia de regenerar moléculas de NADH (re-oxidação de NAD^+).

A produção de etanol foi relatada como metabólito da fermentação por VCS1 a partir de xilose, reportada no capítulo 5.3.3 deste trabalho. Para a cultura isolada VCS6, não observou anteriormente produção de etanol, entretanto, diversos autores em seus estudos com *T. thermosaccharolyticum* observaram produção desse álcool (Khamtib e Reungsang, 2012; Othong et al., 2008; Ren et al., 2008). Desta forma, foi verificado que as culturas isoladas VCS1 e VCS6 podem produzir etanol a partir da vinhaça em condições de cultura pura, e o sinergismo com comunidade autóctone da vinhaça favoreceu um aumento na produção de etanol.

Figura 5.29 Variação temporal de etanol em reatores alimentados com vinhaça a partir por VCS1 e VCS6 em 55°C



Fonte: Elaboração própria

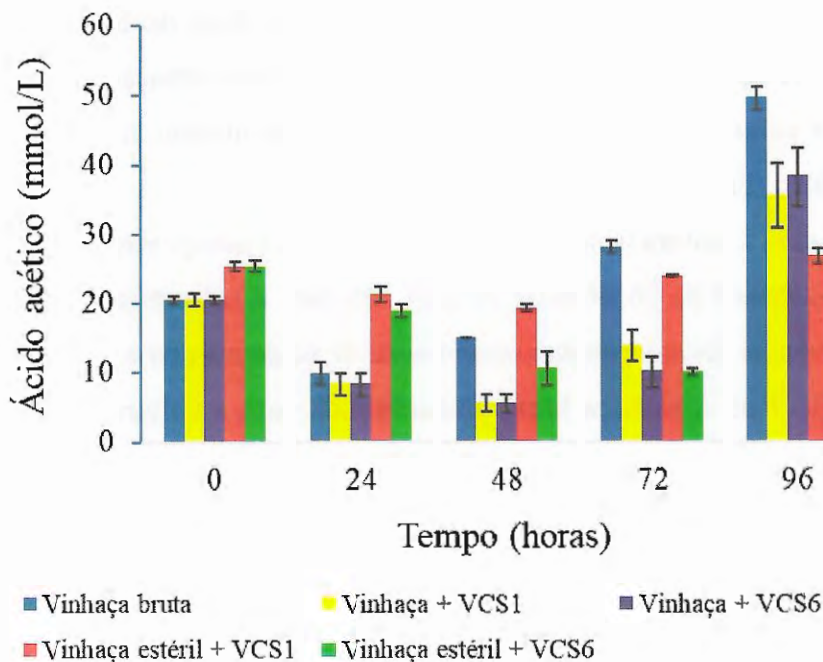
Observou-se oscilação na produção de ácido acético para todas as condições, com consumo nas primeiras 48 horas, seguida de produção até as 96 horas de fermentação. Exceto

para a condição de cultura pura por VCS6, na qual observou-se o consumo desse ácido durante todo o período de fermentação. No ensaio com auto-fermentação da vinhaça, observou-se variação para a concentração de ácido acético cujo valor ao final da fermentação foi de $49,57 \pm 0,91$ mmol/L. Comportamento similar foi observado na fermentação da vinhaça bruta bioaumentada com a cultura isolada VCS1, porém com concentração final de $35,53 \pm 2,21$ mmol/L de ácido acético (Figura 5.30).

Para o ensaio com a cultura isolada VCS1 inoculada em vinhaça esterilizada observou-se concentração final menor de $26,84 \pm 0,09$ mmol/L. Já para a cultura isolada VCS6, com vinhaça estéril observou-se diminuição da concentração de ácido acético e concentração final de $6,13 \pm 0,80$ mmol/L. Para a vinhaça bruta bioaumentada com a cultura isolada VCS6, a produção correspondente ao ácido acético foi de 17,77 mmol/L, desconsiderando o residual inicial da vinhaça (Figura. 5.27). Sendo assim, pouco se pode inferir sobre a produção de ácido acético nos ensaios que utilizaram vinhaça bruta, uma vez que havia populações microbianas, sendo o ácido acético um dos subprodutos de diversas rotas metabólicas.

Porém, nas condições da vinhaça estéril, na qual se avaliou o comportamento das culturas puras VCS1 e VCS6, o principal resultado foi referente ao consumo do ácido acético pela cultura isolada VCS6. O consumo de ácido acético por cultura pura foi relatado também por Matsumoto e Nishimura, (2007) que observaram decréscimo na concentração de ácido acético e ácido láctico, em decorrência da produção de hidrogênio e CO₂ e acúmulo de ácido butírico, a partir da cultura isolada *Clostridium diolis* JPCC-3 na fermentação de lodo residual de batata doce, em pH 6,8 e 40°C. Entretanto, aos autores constataram que a cultura isolada não foi capaz de utilizar o ácido acético como substrato, mas a junção de ácido acético e ácido láctico como substratos em um mesmo reator. Desta forma, os autores propuseram a reação 3.11, descrita no capítulo 3 deste trabalho, na qual é possível obter 1 mol de hidrogênio, 2 mols de CO₂, 1,5 mol de ácido butírico, a partir da relação 1 mol de ácido acético e 2 mols de ácido láctico.

Figura 5.30 Variação temporal de ácido acético em reatores alimentados com vinhaça a partir por VCS1 e VCS6 em 55°C



Fonte: Elaboração própria

Semelhante ao estudo supracitado observou-se acúmulo de ácido butírico, uma vez que a vinhaça bruta inicial não continha residual desse ácido. Nos ensaios com a cultura isolada VCS1, não se observou produção de ácido butírico, em condições de cultura pura, resultado visto anteriormente na caracterização dessa cultura isolada. No ensaio com bioaumentação por VCS1, observou-se produção de 49,90±6,89 mmol/L. Na auto-fermentação da vinhaça bruta, a produção de ácido butírico foi de 42,90±0,81 mmol/L. Nos ensaios com a cultura isolava VCS6, observou-se produção de ácido butírico, de 43,52±4,71 mmol/L em cultura pura de VCS6, e 45,10±1,58 mmol/L em vinhaça bruta bioaumentada com VCS6 (Figura 5.31). Desta forma, provavelmente, a cultura isolava VCS6 foi uma das bactérias responsáveis pela produção de ácido butírico a partir da vinhaça, evidenciando-se assim, a produção de hidrogênio via rota acético-butírica, na degradação da vinhaça de cana-de-açúcar.

A rota acético-butírica para produção de hidrogênio pela cultura isolada VCS6 foi anteriormente relatada, nos quais foi constatado essa rota metabólica como principal via de produção de hidrogênio por *T. thermosaccharolyticum* (Khamtib e Reungsang, 2012; O-thong et al., 2008; Ren et al., 2008).

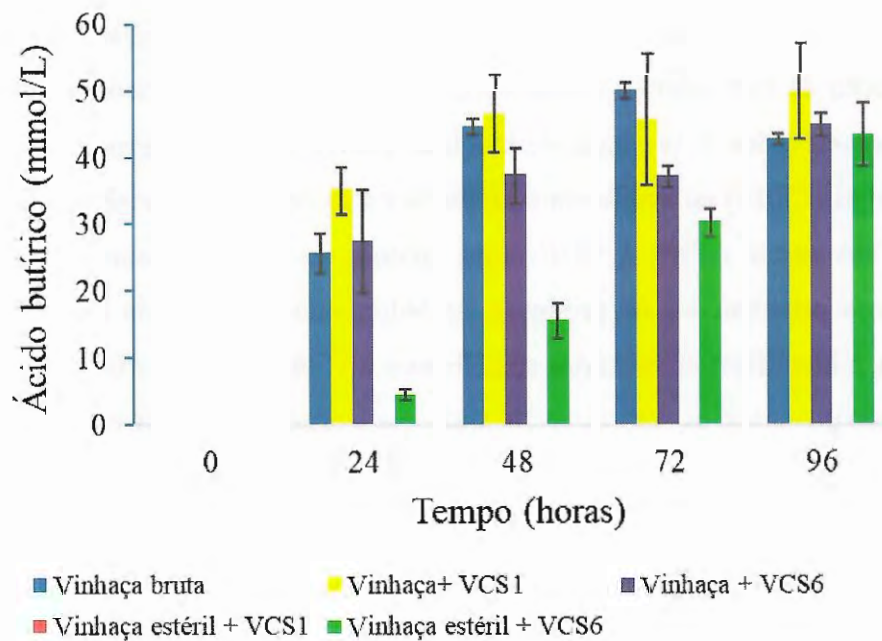
Em estudos com vinhaça, esta rota metabólica de produção de hidrogênio também foi citada. Fuess et al., (2018) ao estudarem a dinâmica e o metabolismo da comunidade microbiana na fermentação escura da vinhaça de cana-de-açúcar, constataram a relação entre elevados níveis de produção de hidrogênio e concentração elevada de ácido acético e ácido butírico, e associaram níveis elevados de produção de bioH₂ ao gênero *Thermoanaerobacterium*.

Ferraz et al., (2014) ao avaliarem o efeito da carga orgânica de vinhaça para produção de hidrogênio em reator APBR à 55°C, com inóculo de lodo de tratamento de vinhaça, observaram que a principal via de produção de hidrogênio estabelecida no reator foi a via acético-butírica, e identificaram bactérias semelhantes a *T. thermosaccharolyticum*.

Em estudo posterior, os autores verificaram que a produção acética e butírica contribuiu em 78,3% e 21,7%, respectivamente, para o rendimento teórico de hidrogênio a partir de vinhaça de cana-de-açúcar em reator APBR. Entretanto, a quantidade de hidrogênio observado representou apenas 12,8% em relação ao rendimento teórico, indicando assim a necessidade de minimizar a distribuição de elétrons, e formação de produtos intermediários como ácido propiônico (Ferraz Júnior et al., 2015).

Por mais que os estudos referentes a fermentação da vinhaça não sejam conclusivos para apontar *Thermoanaerobacterium* como o principal produtor de hidrogênio pela via acético-butírica, por meio do presente trabalho possibilita-se a afirmação de que a cultura isolava VCS6 (100% de similaridade com *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*) utilizou a via acético-butírica para a produção de hidrogênio, a partir de pentoses, hexoses e compostos orgânicos da vinhaça de cana-de-açúcar.

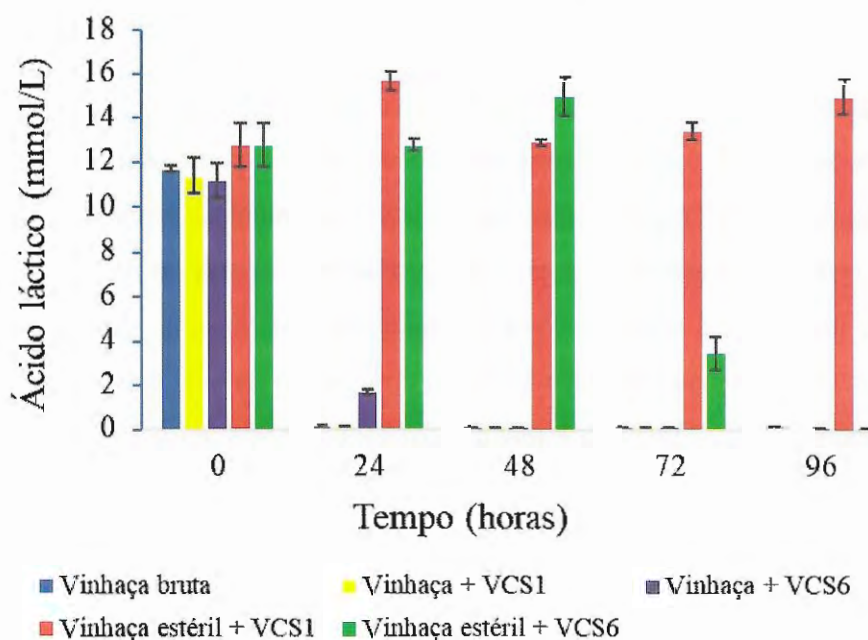
Figura 5.31 Variação temporal de ácido butírico em reatores alimentados com vinhaça a partir por VCS1 e VCS6 em 55°C



Fonte: Elaboração própria

A vinhaça bruta continha residual de ácido láctico, porém observou-se em todos os ensaios, consumo desse ácido, exceto para a condição vinhaça estéril inoculada com a cultura VCS1, na qual obteve produção discreta de 2,22 mmol/L de ácido láctico. Nas condições de auto-fermentação da vinhaça verificou-se que o ácido láctico foi consumido nas primeiras 24 horas, ocorrendo o mesmo para as condições dos ensaios correspondentes a vinhaça bruta bioaugmentada com as culturas isoladas VCS1 e VCS6. Apenas para o ensaio de fermentação com a cultura pura VCS6 observou-se que o consumo de ácido láctico só ocorreu após 72 horas de incubação, porém, sugerindo assim, que cultura isolada VCS6 pode consumir ácido láctico (Figura 5.32).

Figura 5.32 Variação temporal de ácido láctico em reatores alimentados com vinhaça a partir por VCS1 e VCS6 em 55°C



Fonte: Elaboração própria

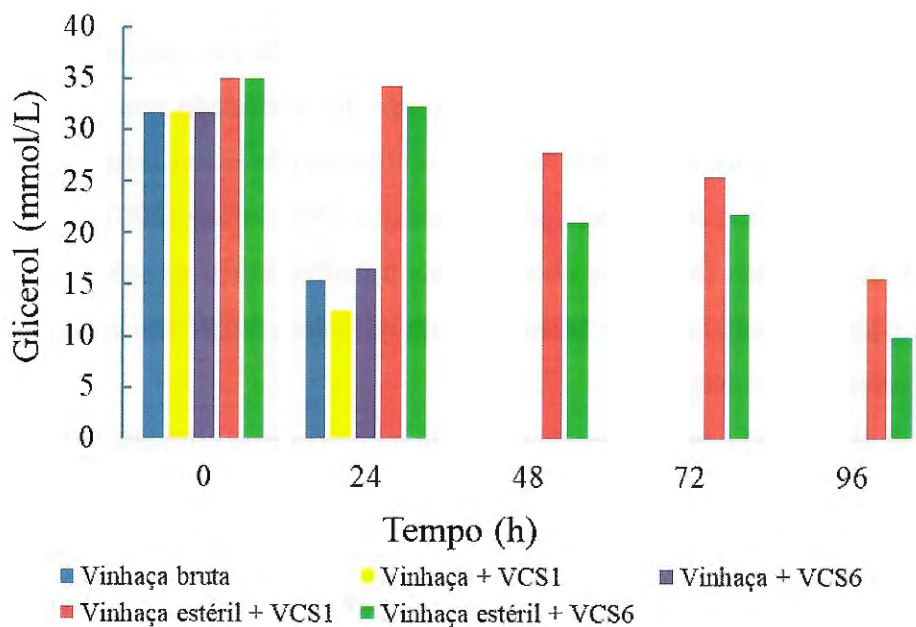
A produção de ácido láctico foi anteriormente relatada na caracterização da cultura isolada VCS1, entretanto, o consumo desse ácido não foi verificado nos ensaios anteriores, tanto para VCS1, quanto VCS6. A relação entre o consumo de ácido láctico e ácido acético para produção de hidrogênio foi relatada por Matsumoto e Nishimura, (2007) para *Clostridium diolis* JPCC-3. A partir dos resultados obtidos neste trabalho, infere-se sobre a possibilidades dessa rota ter ocorrido nos ensaios referentes a cultura isolada VCS6 em condição de cultura pura e nos ensaios com vinhaça bruta.

Fuess et al., (2018) observaram em reator de biohidrogênio alimentado com vinhaça de cana-de-açúcar, duas rotas de consumo de ácido láctico, sendo uma rota de produção de hidrogênio (acetato + lactato \rightarrow butirato + bioH₂) e outra não-produtora de hidrogênio (lactato \rightarrow propionato + acetato). Os autores sugeriram que o ácido láctico foi a principal fonte alternativa de carbono em sistemas alimentados com vinhaça submetidos a escassez de carboidratos. Os autores observaram correlação entre ácido láctico, ácido acético e *Clostridium*, uma vez que diversas espécies desse gênero podem fermentar ácido láctico em ácido acético e ácido propiônico. Todavia, para o consumo de ácido láctico e ácido acético para produção de ácido butírico, H₂ e CO₂ foram relatados bactérias semelhantes a *Lactibacillus* e *Clostridium*.

Sendo assim, a partir dos dados obtidos, insere-se uma nova hipótese neste trabalho; ou seja, a cultura isolada VCS6 é capaz realizar a rota descrita por Matsumoto e Nishimura, (2007), e produzir hidrogênio utilizando como substrato ácido láctico e ácido acético.

A vinhaça bruta continha residual significativo de glicerol, cerca de 32 mmol/L, e esse residual manteve-se após a etapa de autoclavação da vinhaça. Entretanto, nos ensaios com vinhaça bruta, seja na auto-fermentação ou na vinhaça bioaumentada com as culturas isoladas VCS1 e VCS6, o teor de glicerol foi menor nas primeiras 24 horas, até não observar mais a concentração do mesmo nos reatores. Para as condições dos ensaios com vinhaça estéril e inoculada com as culturas puras VCS1 e VCS6, a diminuição da concentração de glicerol foi menos expressiva, sendo que após 96 horas de incubação observou-se 15,59 mmol/L e 9,75 mmol/L para as condições dos ensaios com a cultura isolada VCS1 e VCS6, respectivamente (Figura 5.33).

Figura 5.33 Variação temporal de glicerol em reatores alimentados com vinhaça a partir por VCS1 e VCS6 em 55°C



Fonte: Elaboração própria

O consumo do glicerol pelo consórcio microbiano da própria vinhaça foi observado em 48 horas de fermentação nas condições de pH 7 e 55°C. Para as culturas isoladas VCS1 e VCS6,

o consumo de glicerol não foi significativo como na vinhaça bruta, indicando assim, que essas bactérias não foram as principais consumidoras de glicerol.

O glicerol é um dos principais resíduos das indústrias sucroalcooleiras, uma vez que é formado na fermentação do caldo de cana em etanol por *Saccharomyces cerevisiae* (Bai et al., 2008) sendo assim, um dos principais compostos da vinhaça de cana-de-açúcar (Dowd et al., 1994; Reis e Hu, 2017). Eiteman e Ramalingam, (2015) relataram a produção de ácido láctico utilizando o glicerol como substrato, por *E.coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Não há relatos na literatura sobre crescimento de bactérias semelhantes a *Thermoanaerobacterium* em glicerol, ao contrário, a não ocorrência de crescimento neste substrato (Khamtib e Reungsang, 2012; Othong et al., 2008; Ren et al., 2008; Roy et al., 2013; Shang et al., 2013).

5.6.4 Balanço de massa

A partir da análise de matéria orgânica e comparação com a matéria orgânica teórica das principais fontes de carbono da vinhaça, observou-se que 49,0% desse material da vinhaça bruta foi referente aos carboidratos, álcoois, ácidos orgânicos, glicerol e fenóis. Para a vinhaça esterilizada obteve-se percentual de 52,0%. Na auto-fermentação da vinhaça obteve-se remoção de matéria orgânica de 33,5%, sendo que 58,74% desse residual corresponderam a etanol, ácido butírico e ácido acético. A conversão de carboidratos foi de 60,2%.

Para a vinhaça bioaumentada com a cultura VCS1 obteve-se remoção de matéria orgânica de 26,3%, e conversão de carboidratos de 62,1%. A produção de etanol, ácido butírico e ácido acético equivaleram a 55,5% da matéria orgânica residual.

Resultados semelhantes foram obtidos nos ensaios de fermentação de vinhaça bruta bioaumentada com a cultura isolada VCS6, na qual a remoção de matéria orgânica foi de 36,4%, e a conversão de carboidratos observada foi a mais expressiva; ou seja, de 69,50%. Percentual de 56,5% de matéria orgânica residual foi condizente ao etanol e ácidos orgânicos formados.

É possível inferir que parte da matéria orgânica removida nos ensaios supracitados, correspondeu ao ácido láctico e glicerol, que foram metabolizados na fermentação.

Na fermentação com culturas puras, VCS1 e VCS6, a remoção de matéria orgânica observada foi de 21,3 e 23,7%, respectivamente. Nesses ensaios, não ocorreu remoção de glicerol. A conversão de carboidratos foi de 26,4% e 31,8% para a cultura VCS1 e VCS6. Em relação aos ácidos orgânicos e álcoois obteve-se apenas 23,6 e 39,1% da matéria orgânica residual, respectivamente. O balanço de massa pode ser observado na Tabela 5.14.

Tabela 5.14 Balanço de massa referente a auto-fermentação e bioaumentação da vinhaça bruta, e da fermentação por cultura pura de VCS1 e VCS6, em condições anaeróbias, pH 7 e 55°C

	Afluente		Efluente		Afluente		Efluente	
	Vinhaça bruta	Auto-fermentação	Vinhaça bruta + VCS1	Vinhaça bruta + VCS6	Vinhaça estéril	Vinhaça estéril + VCS1	Vinhaça estéril + VCS6	
DQO analisada (mg/L)	30925	20550	22800	21512	29775	23425	22715	
DQO Teórica (mg/L)								
Carboidratos	4120	1637	1562	1263	4360	3210	2975	
Etanol	1347	2005	2380	2408	123	629	429	
Ac. Butírico	0	6881	8003	7232	0	0	6980	
Ác. láctico	1124	0	0	0	1231	1445	0	
Ác. acético	1316	3185	2283	2458	1629	1725	394	
Glicerol	3527	0	0	0	3902	1738	1087	
Fenol	3732	3286	4008	3527	4249	3174	2746	
DQO Total (mg/L)	15165	16994	18236	16888	15494	11921	14610	
Conversão de carboidratos %		60,25	62,07	69,50		26,38	31,78	
Remoção de Matéria orgânica %		33,54	26,27	36,41		21,33	23,72	

Observou-se resultados de percentual de conversão de carboidratos da vinhaça de cana-de-açúcar superior ao obtido por Lazaro et al., (2014) em condições termófilas (55°C) em reatores em batelada. Os autores relataram consumo de carboidratos de 42,9 a 61,3%, em função da concentração de matéria orgânica. Para concentrações reduzidas (2,0 g/L) e elevadas (12,0 g/L), os autores observaram remoção de carboidratos solúveis de 42,9% e 53,3%, respectivamente.

Ferraz Júnior et al., (2015) em seus estudos em reator APBR alimentado com vinhaça de cana-de-açúcar com características similares a utilizada neste trabalho (DQO afluente de 35,2 g/L, obtiveram em média remoção de matéria orgânica de 31,3% e conversão de carboidratos totais de 73%. Resultados estes próximos obtidos a partir da fermentação da vinhaça bioaumentada com a cultura isolada VCS6.

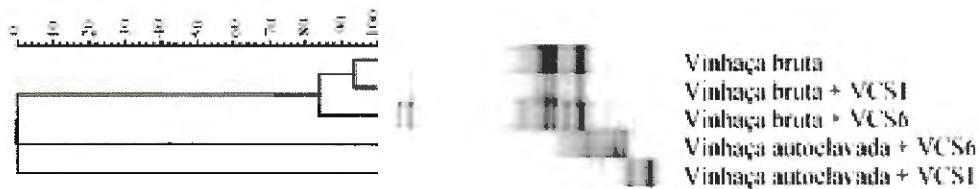
Ressalta-se que a partir da fermentação da vinhaça bruta, tanto por auto-fermentação quanto por bioaumentação com as culturas isoladas, mais que 50% de DQO residual corresponderam ao etanol e ácidos orgânicos, sendo que o ácido acético pode ser utilizado como subproduto de outros processos metabólicos, como a metanogênese. Sugere-se assim, um tratamento da vinhaça por duas fases, uma acidogênica, com recuperação de hidrogênio e, remoção de matéria orgânica e conversão de carboidratos em etanol e ácidos, seguido para uma fase metanogênica, com produção de metano, agregando assim, maior potencial em geração de energia. Volpini et al., (2018) apontaram a partir de seus estudos, os benefícios da separação da hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese em diferentes reatores, na geração de energia, uma vez que, por meio da aplicação de sistema bioenergético em dois estágios pode-se obter 13,6 KJ por grama de matéria orgânica aplicada, ou seja, rendimento energético de 38,8% maior que o sistema tradicional em um estágio.

Conclusões similares foram obtidas por Lucas et al., (2018); ou seja, a biodigestão em dois estágios pode aumentar a produção de energia a partir da vinhaça em 20 a 30%.

5.6.5 Análise da comunidade microbiana

Após cada ensaio com a vinhaça de cana-de-açúcar, amostras da biomassa celular foram analisadas por DGGE (Figura 5.34). As amostras referentes aos ensaios com vinhaça estéril e bioaumentada com as culturas isoladas VCS1 e VCS6, não foram significativamente similares às amostras dos ensaios com vinhaça bruta, constatando assim, que o processo de autoclavar a vinhaça foi eficiente para eliminar a comunidade autóctone da vinhaça bruta, mantendo-se a condição de cultura pura no decorrer do ensaio.

Figura 5.34 Dendrograma representando a similaridade genética (Correlação de Pearson) para o Domínio Bacteria a partir do perfis de bandas do DGGE.



Fonte: Elaboração própria

A maior similaridade (95%) foi observada entre as amostras de vinhaça bruta e vinhaça bruta bioaumentada com a cultura VCS1. Provavelmente, o fato de adicionar a cultura VCS1 à comunidade microbiana da vinhaça, pouco interferiu na constituição do consórcio microbiano.

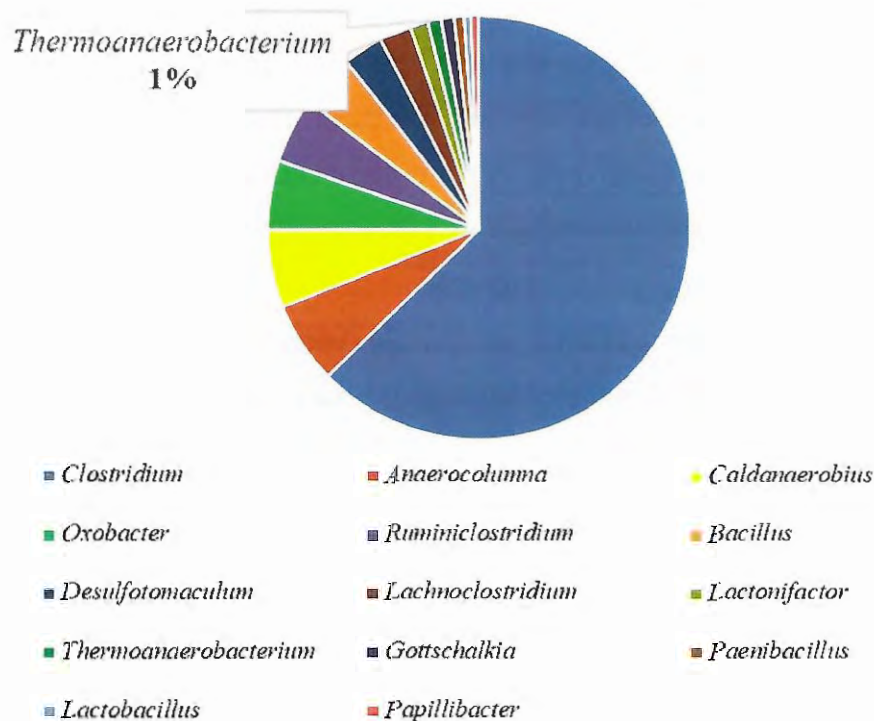
Para a amostra com vinhaça bruta bioaumentada com a cultura VCS6, constatou-se similaridade entre as populações de 82% com a vinhaça bruta, elucidando assim, a alterações na comunidade microbiana após a adição da cultura VCS6.

Desta forma, optou-se por analisar filogeneticamente as amostras referentes a vinhaça bruta bioaumentada com as culturas VCS1 e VCS6, a fim de identificá-las no consórcio microbiano da vinhaça bruta.

5.6.6 Caracterização filogenética das condições de bio-aumentação da vinhaça de cana-de-açúcar por VCS1 e VCS6

Para a comunidade microbiana obtida a partir da fermentação da vinhaça bruta bioaumentada com VCS1 foi observado 99% de bactérias pertencentes ao Filo Firmicutes. Os principais gêneros identificados foram *Clostridium* (61%), *Anaerocolumna* (6%), *Caldanaerobius* (6%), *Oxobacter* (5%), *Ruminiclostridium* (5%), *Bacillus* (4%), *Desulfotomaculum* (3%), *Lachnoclostridium* (2%), *Lactonifactor* (1%), *Thermoanaerobacterium* (1%), *Gottschalkia* (1%), *Paenibacillus* (1%), *Lactobacillus* sp. (1%) e *Papillibacter* (1%) (Figura 5.35).

Figura 5.35 Caracterização filogenética do Domínio Bacteria da vinhaça bruta inoculada com VCS1



Fonte: Elaboração própria

A cultura isolada VCS1 (99% de similaridade com *Thermoanaerobacterium calidifontis*) pertence ao filo Firmicutes, e classe Clostridia. A abundância relativa deste gênero na vinhaça bruta bioaumentada foi de apenas 1% mantendo-se o predomínio de bactérias semelhantes a *Clostridium* (61%).

Como já visto nos ensaios anteriores, não se obteve para a cultura isolada VCS1 em vinhaça estéril, produção significativa de metabólitos. Além disso, nas condições de bioaumentação obteve-se menor abundância de VCS1 (1%), em relação a comunidade da vinhaça bruta. Desta forma, pode-se inferir que as características da vinhaça de cana-de-açúcar não foram adequadas para a manutenção da população de VCS1.

Ressalta-se que os melhores resultados de produção de hidrogênio neste trabalho (47,88 mmol/L) foram observados nos ensaios a partir da vinhaça bioaumentada com VCS1, além da considerável produção de ácido butírico (49,90 mmol/L). Esses metabólitos possivelmente foram produzidos pelas populações da vinhaça bruta.

Bactérias do gênero *Clostridium* são microrganismos anaeróbios que podem produzir hidrogênio a partir de resíduos orgânicos, destacam-se *C. buytricum*, *C. thermolacticum*, *C. pasteurianum*, *C. paraputrificum* e *C. bifermentans* (Kapdan e Kargi, 2006).

Lazaro et al (2014) constataram que 59% das sequências do consórcio microbiano utilizado na fermentação de vinhaça de cana-de-açúcar foram similares a *Clostridium acetobutylicum* e *Clostridium aciditolerans*. A partir desse consórcio, os autores isolaram três cepas (C1, C5 e CA) de culturas semelhantes a *Clostridium* (99% de similaridade), e apenas uma das cepas (CA) foi capaz de produzir hidrogênio (1,8 mol/mol) e ácido butírico (2,0 g/L) a partir de glicose (10,0 g/L). A cepa C1 foi caracterizada como cultura homoacetogênica, com baixa produção de hidrogênio (0,2 mol/mol de glicose) e maior produção de ácido acético (1,7 g/L).

Anaerocolumna são bactérias anaeróbias, mesófilas (30 - 35°C), fermentativas de ampla variedade de açúcares e ácidos orgânicos, principalmente ácido acético, etanol e hidrogênio (Ueki et al., 2016). *Caldanaerobius* sp. são bactérias estritamente anaeróbias e termófilas (temperatura ótima de 60 – 63°C), capazes de degradar diversas pentoses e hexoses, como arabinose, celobiose, galactose, glicose, manose, xilose, ribose, entre outros. Os principais produtos são etanol, ácido acético e fórmico (Lee et al., 2019). Não há relatos desses gêneros em estudos com vinhaça de cana-de-açúcar.

Oxobacter são bactérias anaeróbias, acetogênicas, capaz de oxidar monóxido de carbono e também produzir ácido butírico (Bengelsdorf et al., 2015). Ferraz Júnior et al., (2015) identificaram representantes desse gênero na vinhaça de cana-de-açúcar e abundância relativa de 0,4%.

Ruminiclostridium sp. é um microrganismo celulolítico e termófilo (55-60°C) que produz hidrogênio, gás carbônico, etanol e ácido acético (Koeck et al., 2014; Sheng et al., 2016).

Bacillus são bactérias facultativas, capazes de produzir grandes quantidades de enzimas extracelulares, fato este que as colocou entre os mais importantes produtores industriais de enzimas (Schallmeyer et al., 2004). Kotay e Das, (2007) isolaram *Bacillus coagulans*, a partir de lodo anaeróbio, e constataram produção de H₂ frente a variedade de substratos orgânicos, obtendo maior rendimento de 2,28 mol-H₂/mol de glicose. Bactérias semelhantes a *Bacillus subtilis* crescem na ausência de oxigênio utilizando a amonificação do nitrato e diversos processos de fermentação, produzindo principalmente ácido láctico, ácido acético e 2,3 butanodiol (Ramos et al., 2000). Identificação de bactérias semelhantes a essa espécie foram

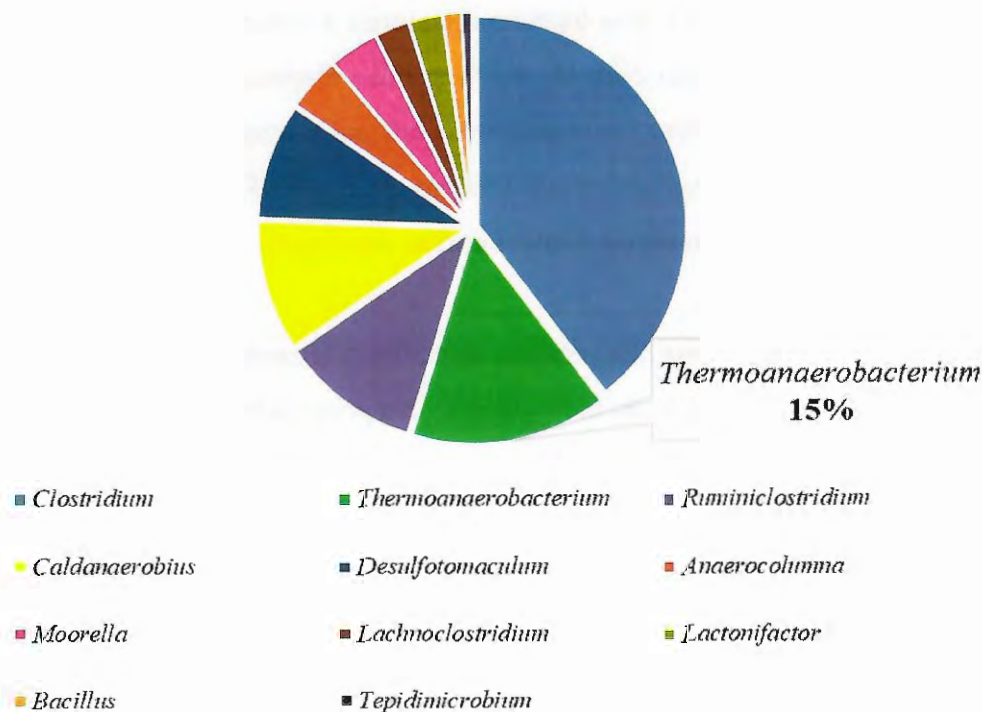
identificadas no consórcio microbiano utilizado na fermentação de vinhaça de cana-de-açúcar (Moraes et al., 2018), com abundância relativa de 3%.

Desulfotomaculum nigrificans é uma bactéria relacionada a redução de sulfato a sulfeto de hidrogênio, em meio suplementado com H₂ e CO₂, ácido fórmico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido málico, ácido fumárico, ácido succínico, metanol, etanol, propanol, butanol, ácido burítico, ácido valérico ou ácido palmítico (Nazina et al., 2005). Os autores também constataram a oxidação do ácido láctico e ácido butírico resultando no acúmulo de ácido acético.

Desta forma, a partir da análise filogenética da vinhaça bioaumentada com a cultura isolada VCS1, conclui-se que a produção de hidrogênio se deu principalmente por *Clostridium*, *Anaerocolumna*, *Ruminiclostridium* e *Bacillus*. Ressalta-se também que no final de cada ensaio com vinhaça bruta observou-se diminuição do hidrogênio, e formação de sulfeto decorrente da redução de sulfato, podendo este mecanismo ter sido realizado por bactérias semelhantes a *Desulfotomaculum*. Não observou-se produção de hidrogênio a partir de vinhaça de cana-de-açúcar por cultura VCS1 e provavelmente seu crescimento foi inibido por este substrato (Figura 5.37).

No ensaio com a cultura isolada VCS6 em vinhaça bruta, 100% da comunidade microbiana foi relacionada ao Filo Firmicutes. Os principais gêneros identificados foram *Clostridium* (38%), *Thermoanaerobacterium* (15%), *Ruminiclostridium* (10%), *Caldanaerobius* (10%), *Desulfotomaculum* (9%), *Anaerocolumna* (4%), *Moorella* (4%), *Lachnoclostridium* (3%), *Lactonifactor* (2%), *Bacillus* (1%), *Tepidimicrobium* (1%) (Figura 5.36).

Figura 5.36 Caracterização filogenética do Domínio Bacteria da vinhaça bruta inoculada com VCS6



Fonte: Elaboração própria

A partir da vinhaça estéril e bioaugmentação com a cultura VCS6 (100% de similaridade a *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*) observou-se principalmente produção de hidrogênio e ácido butírico. Provavelmente, sob tais condições não ocorreu inibição do seu metabolismo. Obteve-se para a vinhaça bruta bioaugmentada abundância relativa de 15% referente a cultura VCS6

Observou-se abundância relativa de 38% de bactérias semelhantes a *Clostridium* no consórcio microbiano da vinhaça bruta bioaugmentada, como já observado por diversos autores (Lucas Tadeu Fuess et al., 2018; Lamaison et al., 2015; Lazaro et al., 2014; Moraes et al., 2018). Representantes deste gênero também foram relatados como produtores de H₂ (Hoang et al., 2018).

Neste ensaio, observou-se consumo de ácido láctico e glicerol. Matsumoto e Nishimura (2007) relataram em seus estudos com *Clostridium diolis* JPC H-3, o consumo de ácido acético e ácido láctico, com produção de ácido butírico e hidrogênio.

Detman et al., (2019) confirmaram a partir de seus estudos que o ácido acético e láctico podem ser convertidos em ácido butírico por populações microbianas de biorreatores de fermentação escura e por *Clostridium butyricum*, uma vez que

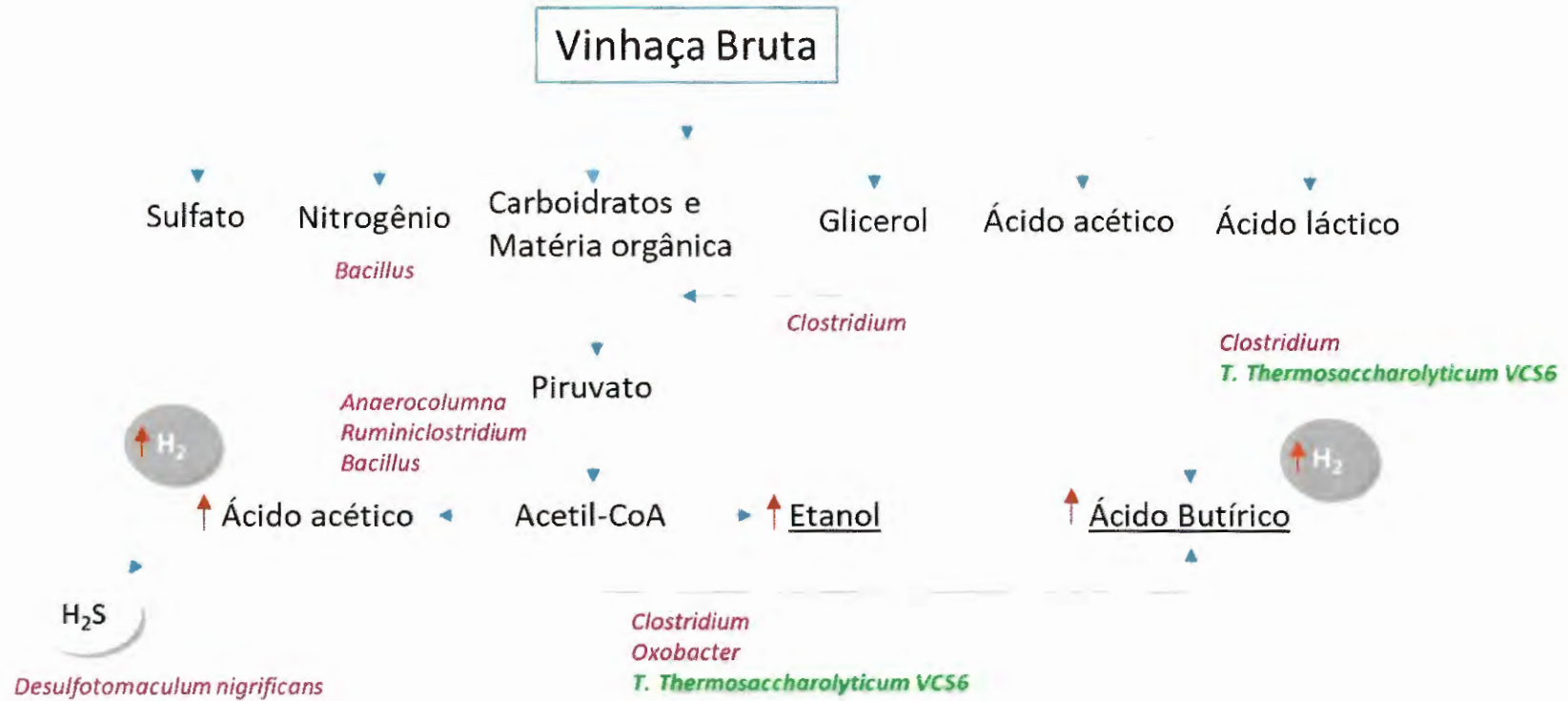
este esta bactéria foi capaz de metabolizar o ácido láctico juntamente com o ácido acético, e produzir hidrogênio e ácido butírico.

Leja et al., (2014) observaram a degradação de glicerol por espécies de *Clostridium*. Os autores avaliaram a capacidade de três linhagens recém-isoladas, obtidas a partir de fontes ambientais (esterco, sedimento e resíduos alimentares) e identificadas como *Clostridium bifermentans*, *Clostridium butyricum* e *Hafnia alvei*, em sintetizar 1,3-propanodiol (1,3 -PD), ácidos orgânicos (tais como ácidos láctico, acético, fumárico, succínico e butírico) e etanol a partir de glicerol.

Desta forma, pouco se pode inferir sobre a atividade metabólica da cultura isolada VCS6 em vinhaça bruta diante do consumo de ácido láctico e glicerol, uma vez que não há relatos desse gênero *Thermoanaerobacterium* na degradação desses compostos. Entretanto, vale ressaltar, que nos ensaios com a vinhaça estéril e cultura VCS6 observou-se consumo de ácido láctico após 72 horas de incubação, inferindo-se assim, a possibilidade dessa cultura ter participado dessa rota metabólica a partir da vinhaça. Nesta condição, não se observou consumo de glicerol.

Na vinhaça bruta bioaumentada com a cultura VCS6 observou-se maior abundância relativa de *Ruminiclostridium* (10%), *Caldanaerobius* (10%), *Desulfotomaculum* (9%), em relação ao ensaio com vinhaça bruta bioaumentada com a cultura VCS1. Estes microrganismos têm características celulolíticas, podendo produzir H₂, etanol e ácidos orgânicos, e são também redutores de sulfato. Entretanto, não há relatos sobre produção de hidrogênio a partir dos mesmos. Sendo assim, é possível inferir que *Clostridium* e *Thermoanaerobacterium* foram as precursoras da produção de hidrogênio a partir da vinhaça de cana-de-açúcar no presente ensaio (Figura 5.37).

Figura 5.37 Rotas de conversão da vinhaça de cana-de-açúcar bioaumentada com as culturas VCS1 e VCS6



* Não se observou abundancia relativa significativa para a cultura VCS1

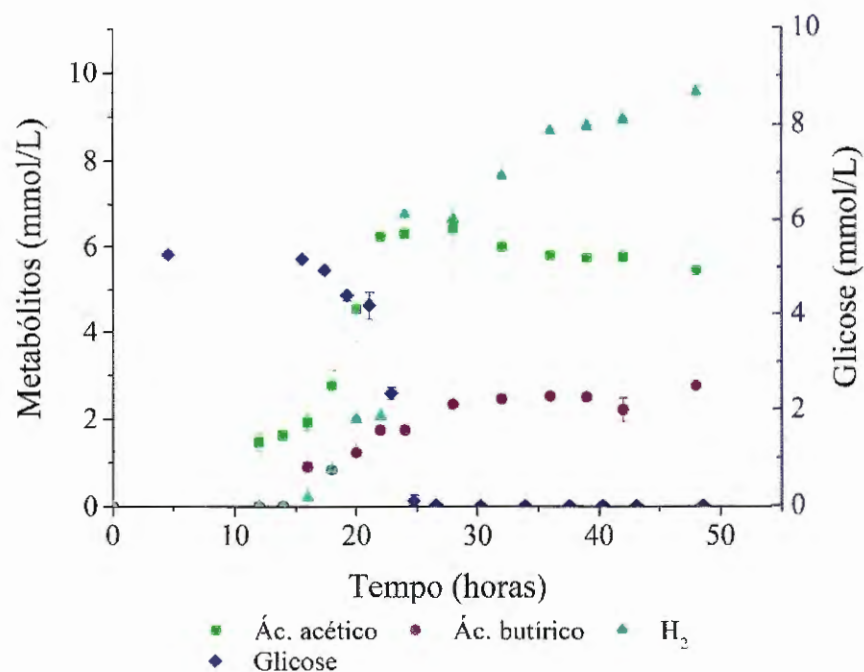
5.7 Produção de hidrogênio a partir de ácido láctico por cultura VCS6

Ensaio foi realizado com a cultura VCS6 em meio de cultivo suplementado apenas com ácido láctico (1,0 g/L). Sob tais condições não foi observada produção de hidrogênio e metabólitos. Todavia, verificou-se consumo de glicose (1,0 g/L ou 5,27 mmol/L) em 24 horas de fermentação, com produção de ácido acético ($5,40 \pm 0,02$ mmol/L) e ácido butírico ($2,74 \pm 0,07$ mmol/L) (Figura 5.38).

No reator alimentado com glicose e ácido láctico (0,5 g/L cada ou 2,69 mmol/L de glicose e 5,01 mmol/L de ácido láctico) verificou-se também o consumo de glicose em 24 horas, com produção de ácido acético ($3,62 \pm 0,06$ mmol/L) e ácido butírico ($1,49 \pm 0,04$ mmol/L). Todavia, sob tais condições o ácido láctico não foi consumido. Após 24 horas iniciais de fermentação e total consumo da glicose constatou-se decréscimo nas concentrações de ácido láctico e ácido acético, e aumento na produção de ácido butírico. Ao final de 72 horas observou-se $2,51 \pm 0,41$ mmol/L de ácido láctico, $1,59 \pm 0,18$ mmol/L de ácido acético e $5,27 \pm 0,14$ mmol/L de ácido butírico (Figura 5.39).

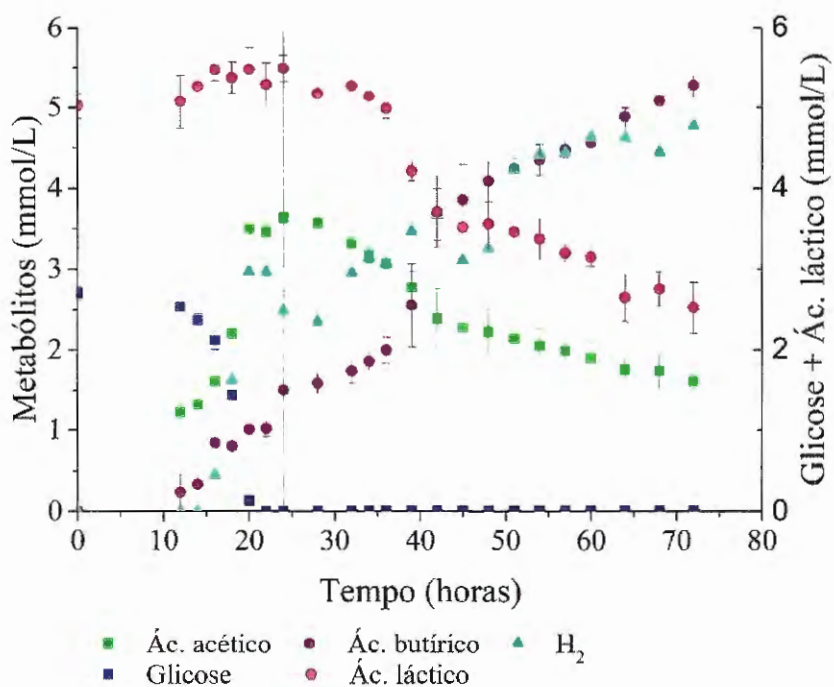
Observou-se produção de hidrogênio em ambos os reatores, sendo naquele com glicose estabilização da produção de hidrogênio, após 36 horas de incubação de $8,61 \pm 0,10$ mmol/L (Figura 5.38). Para o reator alimentado com glicose e ácido láctico, no período de 36 horas, obteve-se $3,41 \pm 0,67$ mmol/L, e após 72 horas de fermentação, de $4,83 \pm 0,20$ mmol/L (Figura 5.39).

Figura 5.38 Produção de metabólitos por cultura VCS6 a partir de glicose (1,0 g/L ou 5,2 mmol/L) em meio de cultivo *T. ethanolicus*, pH 6,8 e 55°C



Fonte: Elaboração própria

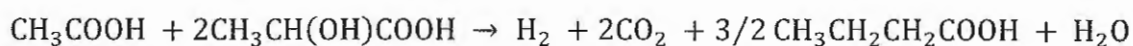
Figura 5.39 Metabolismo da cultura VCS6 a partir de glicose e ácido láctico (0,5 g/L cada) em meio de cultivo *T. ethanolicus*, pH 6,8 e 55°C



Fonte: Elaboração própria

Considerando que as 24 horas iniciais corresponderam a fermentação da glicose, pode-se inferir que após este período até 72 horas ocorreu o consumo de 2,97 mmol/L de ácido láctico e 2,03 mmol/L de ácido acético. A produção neste período foi de 3,77 mmol/L de ácido butírico e 2,28 mmol/L de hidrogênio.

Matsumoto e Nishimura (2007) avaliaram o consumo de ácido acético e ácido láctico com produção de ácido butírico e hidrogênio por *Clostridium diolis* JPC H-3 em reatores alimentados com ácido acético (3,0 g/L) e ácido láctico (3,0 g/L). Os autores observaram consumo de 0,099 mmol e 1,83 mmol, respectivamente, e razão molar de consumo de 1:2, com produção de 0,099 mmol de H₂, 0,078 mmol de CO₂, e 0,125 mmol de ácido butírico, de acordo com a equação 5.4.



Reação 5.4

A energia livre de Gibbs também foi calculada para a equação, e os autores obtiveram $\Delta G = -156,6 \text{ kJ / mol}$, ou seja, reação termodinamicamente favorável.

Fuess et al., (2018) também observaram em seus reatores alimentados com vinhaça de cana-de-açúcar, produção de hidrogênio pela via acético-láctica definida por (Matsumoto e Nishimura, 2007), e associaram-na ao gênero *Clostridium*. Os autores relataram a possibilidade da fermentação de ácido láctico corresponder a via alternativa usada por bactérias para obter energia em condições de baixa disponibilidade de carboidratos. Outro dado importante, refere-se a forte relação entre produção de hidrogênio e *Thermoanaerobacterium*.

Por meio dos resultados obtidos neste trabalho pode-se inferir sobre o início da fermentação por VCS6 a partir do ácido láctico, após consumir toda glicose disponível (após 24 horas), reafirmando assim, a hipótese definida por Fuess et al (2018).

Portanto, infere-se que a cultura VCS6 semelhante a *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* fermentou ácido láctico e ácido acético para produção de ácido butírico e hidrogênio, em condições de não disponibilidade de açúcares, podendo esta ser uma das principais bactérias responsáveis por esta rota na fermentação da vinhaça de cana-de-açúcar.

6 CONSIDERAÇÕES ÀS HIPÓTESES

O objetivo inicial deste trabalho foi isolar bactérias que produzissem etanol e hidrogênio, sendo este alcançado, uma vez que se isolou bactérias anaeróbias e termófilas, VCS1 e VCS6, ambas semelhantes a *Thermoanaerobacterium*, produtoras de hidrogênio e etanol, no entanto, com diferente classificação em termos de espécie: *T. calidifontis* e *T. thermosaccharolyticum*, respectivamente.

Em resposta as hipóteses desta pesquisa podem-se mencionar o seguinte relato:

Hipótese 1: Produzir hidrogênio e etanol a partir de pentoses e hexoses por bactérias anaeróbias termófilas.

✓ Hipótese aceita.

Tanto, a cultura isolava VCS1, quanto a cultura isolada VCS6 metabolizaram ampla variedade de açúcares em etanol e hidrogênio.

A cultura VCS1 cresceu e consumiu eficientemente glicose, xilose, frutose, manose, galactose, sacarose e celobiose. Os principais produtos formados foram CO₂, H₂, etanol, ácido acético e ácido láctico, com rendimento de 0,79 mol de H₂ e 0,59 mol de etanol por mol de xilose.

As condições ótimas de cultivo para a cultura isolada VCS1 considerando conversão de xilose, potencial máximo de produção de H₂ e etanol, abrange a faixa de pH entre 6,8 e 7,4, e entre 2,0 e 4,0 g/L de xilose.

Obteve-se para a cultura isolada VCS6 crescimento e consumo dos substratos glicose, frutose, xilose, arabinose, sacarose, galactose, manose e celobiose. Destaca-se predominância de produção de H₂, seguido de ácido acético e ácido butírico, com rendimento de 2,69 mol de H₂ por mol de xilose, em pH 6,8 à 55°C.

Observou-se também para a cultura isolada VCS6 produção de H₂ e ácido butírico a partir do consumo de ácido láctico e ácido acético.

Hipótese 2: Obter hidrogênio e etanol, além da conversão eficiente dos carboidratos a partir da vinhaça bruta de cana-de-açúcar com cultura pura de bactéria anaeróbia termófila.

- ✓ Hipótese negada para cultura isolada VCS1 e aceita para cultura isolada VCS6

A partir da cultura VCS1 não obteve-se produção significativa de metabólitos a partir da vinhaça de cana-de-açúcar, inferindo assim, que as características da vinhaça (29,7 g/L de matéria orgânica e 4,4 g/L de carboidratos totais), não foram ideais para o cultivo dessa cultura. A conversão de carboidratos foi de 26,4% em condições de cultura pura.

Referente a bioaugmentação da vinhaça bruta com a cultura VCS1, no observou-se abundância relativa menor que 1%, e desta forma, conclui-se adicionalmente, que a cultura não se estabeleceu no consórcio autóctone da vinhaça.

Para VCS6, na condição de cultura pura, com vinhaça estéril, obteve-se rendimento de 1,22 mmol-H₂/g-matéria orgânica e 1,65 mol-H₂/mol-carboidratos totais, com conversão de carboidratos de 31,8% e remoção de matéria orgânica de 23,7%.

Na condição da vinhaça bruta bioaugmentada com a cultura VCS6 obteve-se rendimento e conversão superiores aos relatados a partir da auto-fermentação da vinhaça bruta, sugerindo assim, que a cultura contribui com o sinergismo do consórcio autóctone na degradação da vinhaça para produção de energia. O rendimento em H₂ foi de 1,03 mmol / g-matéria orgânica e 1,52 mol / mol-carboidratos totais, com conversão de carboidratos de 69,50% e remoção de matéria orgânica de 36,4%.

7 CONCLUSÕES

Duas culturas do mesmo gênero, mas de espécies distintas foram isoladas, VCS1 (99% de similaridade *Thermoanaerobacterium calidifontis*) e VCS6 (100% de similaridade *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*) a partir da aplicação de técnicas anaeróbias para bactérias termófilas.

A cultura VCS1 é uma bactéria anaeróbia e termófila, produtora de etanol e hidrogênio, com crescimento e consumo de diversas fontes de carbono, com rendimento em hidrogênio e etanol de 0,79 mol e 0,59 mol por mol de xilose metabolizada, respectivamente.

As variáveis pH e concentração de xilose interferiram significativamente no metabolismo da cultura VCS1, sendo que a produção de hidrogênio foi favorecida em pH 6,2, e a produção de etanol em pH mais alcalino, 7,8 e 8,13. Além disso, para 60,0 mmol/L de xilose, a remoção não foi maior que 70%, indicando assim, possível inibição por substrato.

As melhores condições de cultivo para VCS1 foram pH 6,8 a 7,4 e concentração inicial de xilose de aproximadamente 20,0 mmol/L.

Em relação ao emprego da cultura isolada VCS1 em vinhaça de cana-de-açúcar, em condições de cultura pura, não se observou produção de metabólitos.

Já a cultura isolada VCS6 é uma bactéria produtora de hidrogênio pela via acetato/butirato, com rendimento de 2,69 mol H₂ por mol de xilose, nas condições de meio *T. ethanolicus*, 2,0 g/L ou 13,3 mmol/L de xilose, pH 6,8 a 55°C.

Crescimento e metabolização de pentoses e hexoses em hidrogênio, ácido acético e ácido butírico foi obtido para a cultura VCS6.

Na aplicação da cultura isolada VCS6 em vinhaça de cana-de-açúcar, obteve-se resultados de produção de metabólitos, tanto para a condição de cultura pura, quanto na condição de bioaugmentação. Destaca-se o crescimento da cultura isolada VCS6 em elevado teor de matéria orgânica (31,9 g/L de DQO) em vinhaça de cana-de-açúcar. O rendimento em hidrogênio foi considerado significativo em relação ao obtido por consórcios microbianos em reatores alimentados com vinhaça, sendo 1,22 mmol-H₂/g-DQO em cultura pura e 1,03 mmol-H₂/g-matéria orgânica em condição de bioaugmentação.

Observou-se consumo de ácido láctico ao longo dos ensaios com a vinhaça, e a partir de ensaio mais detalhado, foi possível concluir que a cultura isolada VCS6 utilizou preferencialmente glicose, e na ausência dessa fonte de carbono, pode metabolizar ácido láctico e ácido acético em hidrogênio e ácido butírico.

8 RECOMENDAÇÕES

O autor recomenda:

- Aplicar as culturas isoladas VCS1 e VCS6 em licor hemicelulósico obtido após pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar
- Utilizar as condições otimizadas para a cultura VCS1 em águas residuárias, cuja o teor de carboidratos não exceda 5,5 g/L ou 36,6 mmol/L.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Mohammedawi, H.H., Znad, H., Eroglu, E., 2019. Improvement of photofermentative biohydrogen production using pre-treated brewery wastewater with banana peels waste. *International Journal of Hydrogen Energy* 44, 2560–2568. doi:10.1016/j.ijhydene.2018.11.223
- Atlas, R.M., 2005. *Handbook of Media for Environmental Microbiology*, 2^o. ed, Microbiology. Taylor and Francis Group. doi:10.1201/9781420037487
- Avanthi, A., Kumar, S., Sherpa, K.C., Banerjee, R., 2017. Bioconversion of hemicelluloses of lignocellulosic biomass to ethanol: an attempt to utilize pentose sugars. *Biofuels* 8, 431–444. doi:10.1080/17597269.2016.1249738
- Azwar, M.Y., Hussain, M.A., Abdul-wahab, A.K., 2014. Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 31, 158–173. doi:10.1016/j.rser.2013.11.022
- Bai, F.W., Anderson, W.A., Moo-young, M., 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks 26, 89–105. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.09.002
- Bala, A., Singh, B., 2019. Cellulolytic and xylanolytic enzymes of thermophiles for the production of renewable biofuels. *Renewable Energy* 136, 1231–1244. doi:10.1016/j.renene.2018.09.100
- Bassani, J.C., Queiroz Santos, V.A., Barbosa-Dekker, A.M., Dekker, R.F.H., da Cunha, M.A.A., Pereira, E.A., 2019. Microbial cell encapsulation as a strategy for the maintenance of stock cultures. *Lwt - Food Science and Technology* 102, 411–417. doi:10.1016/j.lwt.2018.12.058
- Batyrova, K., Hallenbeck, P.C., 2017. Hydrogen production by a *Chlamydomonas reinhardtii* strain with inducible expression of photosystem II. *International Journal of Molecular Sciences* 18. doi:10.3390/ijms18030647
- Beato, F.B., Bergdahl, B., Rosa, C.A., Forster, J., Gombert, A.K., 2016. Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Brazilian biomes: New insights into biodiversity and industrial applications. *FEMS Yeast Research* 16. doi:10.1093/femsyr/fow076
- Bengelsdorf, F.R., Poehlein, A., Schiel-Bengerlsdorf, B., Daniel, R., Dürre, P., 2015. Genome Sequence of the Acetogenic Bacterium *Oxobacter pfennigii* DSM 3222. *Genome Announcements* 3, 4–5. doi:10.1128/genomeA.01408-15.Copyright

- Björkmalm, J., Byrne, E., Van Niel, E.W.J., Willquist, K., 2018. A non-linear model of hydrogen production by *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* for diauxic-like consumption of lignocellulosic sugar mixtures. *Biotechnology for Biofuels* 11. doi:10.1186/s13068-018-1171-3
- Boileau, C., Auria, R., Davidson, S., Casalot, L., Christen, P., Liebgott, P.-P., Combet-Blanc, Y., 2016. Hydrogen production by the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* part I: effects of sulfured nutriment, with thiosulfate as model, on hydrogen production and growth. *Biotechnology for Biofuels* 9, 1–17. doi:10.1186/s13068-016-0678-8
- Boonsayompoo, O., Reungsang, A., 2013. Thermophilic biohydrogen production from the enzymatic hydrolysate of cellulose fraction of sweet sorghum bagasse by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* KKU19: Optimization of media composition. *International Journal of Hydrogen Energy* 38, 15777–15786. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.04.129
- Braga, J.K., Abreu, A.A., Motteran, F., Pereira, M.A., Alves, M.M., Varesche, M.B.A., 2019. Hydrogen Production by *Clostridium cellulolyticum* a Cellulolytic and Hydrogen-Producing Bacteria Using Sugarcane Bagasse. *Waste and Biomass Valorization* 10, 1–11. doi:10.1007/s12649-017-0105-9
- Cao, G., Ren, N., Wang, A., Guo, W., Yao, J., Feng, Y., Zhao, Q., 2010. Statistical optimization of culture condition for enhanced hydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. *Bioresource Technology* 101, 2053–2058. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.031
- Cao, G., Ren, N., Wang, A., Lee, D., Guo, W., Liu, B., 2009. Acid hydrolysis of corn stover for biohydrogen production using *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. *International Journal of Hydrogen Energy* 34, 7182–7188. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.07.009
- Chang, T., Yao, S., 2011. Thermophilic, lignocellulolytic bacteria for ethanol production: current state and perspectives 13–27. doi:10.1007/s00253-011-3456-3
- Chen, W.M., Tseng, Z.J., Lee, K.S., Chang, J.S., 2005. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy* 30, 1063–1070. doi:10.1016/j.ijhydene.2004.09.008
- Ciranna, A., Pawar, S.S., Santala, V., Karp, M., Niel, E.W.J. Van, 2014. Assessment of metabolic flux distribution in the thermophilic hydrogen producer *Caloramator celer* as affected by external pH and hydrogen partial pressure. *Microbial Cell Factories* 13, 1–15.

- Collins, M.D., Lawson, P.A., Willems, A., Cordoba, J.J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H., Farrow, J.A.E., 1994. The Phylogeny of the Genus *Clostridium*: Proposal of Five New Genera and Eleven New Species Combinations. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 812–826.
- Crespo, C., Pozzo, T., Karlsson, E.N., Alvarez, M.T., Mattiasson, B., 2012. *Caloramator boliviensis* sp. nov., a thermophilic, ethanol-producing bacterium isolated from a hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62, 1679–1686. doi:10.1099/ijs.0.032664-0
- Detman, A., Mielecki, D., Chojnacka, A., Salamon, A., Błaszczuk, M.K., 2019. Cell factories converting lactate and acetate to butyrate: *Clostridium butyricum* and microbial communities from dark fermentation bioreactors. *Microbial Cell Factories* 1–12. doi:10.1186/s12934-019-1085-1
- Díaz, V.H.G., Willis, M.J., 2019. Ethanol production using *Zymomonas mobilis* : Development of a kinetic model describing glucose and xylose co-fermentation. *Biomass and Bioenergy* 123, 41–50. doi:10.1016/j.biombioe.2019.02.004
- Djalma, A., Ferraz, N., Zaiat, M., Gupta, M., Elbeshbishy, E., Hafez, H., Nakhla, G., 2014. Impact of organic loading rate on biohydrogen production in an up-flow anaerobic packed bed reactor (UAnPBR) 164, 371–379. doi:10.1016/j.biortech.2014.05.011
- Dowd, M.K., Johansen, S.L., Cantarella, L., Reilly, P.J., 1994. Low Molecular Weight Organic Composition of Ethanol Stillage from Sugarcane Molasses, Citrus Waste, and Sweet Whey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42, 283–288. doi:10.1021/jf00038a011
- DSMZ, 2018. DSMZ [WWW Document]. URL www.dsmz.de
- Dugmore, T.I.J., Clark, J.H., Bustamante, J., Houghton, J.A., Matharu, A.S., 2017. Valorisation of Biowastes for the Production of Green Materials Using Chemical Methods. *Topics in Current Chemistry* 375, 1–49. doi:10.1007/s41061-017-0133-8
- Durand, L., Mathot, A., Coroller, L., Couvert, O., Venaille, L., Legu, I., 2016. Effect of pH on *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* DSM 571 growth, spore heat resistance and recovery phanie Gu e 55, 64–72. doi:10.1016/j.fm.2015.11.015
- Eiteman, M.A., Ramalingam, S., 2015. Microbial production of lactic acid. *Biotechnology Letters* 37, 955–972. doi:10.1007/s10529-015-1769-5
- Elia Neto, A., 2016. Novas Tecnologias para a Vinhaça. CAMPETRO Energy 2016.
- Ergal, Í., Fuchs, W., Hasibar, B., Thallinger, B., Bochmann, G., Rittmann, S.K.M.R., 2018. The physiology and biotechnology of dark fermentative biohydrogen production.

- Biotechnology Advances 36, 2165–2186. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.10.005
- Eroglu, E., Melis, A., 2016. Microalgal hydrogen production research. *International Journal of Hydrogen Energy* 41, 12772–12798. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.05.115
- Ferraz Júnior, D.A.N., Wenzel, J., Etchebehere, C., Zaiat, M., 2014. Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors b. *International Journal of Hydrogen Energy* 9, 0–10. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.08.017
- Ferraz Júnior, D.A.N., Etchebehere, C., Zaiat, M., 2015. High organic loading rate on thermophilic hydrogen production and metagenomic study at an anaerobic packed-bed reactor treating a residual liquid stream of a Brazilian biorefinery. *Bioresource Technology* 186, 81–88. doi:10.1016/j.biortech.2015.03.035
- Ferraz, N., Koyama, M.H., Araújo, M.M. De, Zaiat, M., 2016. Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse Ant o 89. doi:10.1016/j.renene.2015.11.064
- Fito, J., Tefera, N., Kloos, H., Van Hulle, S.W.H., 2019. Physicochemical Properties of the Sugar Industry and Ethanol Distillery Wastewater and Their Impact on the Environment. *Sugar Tech* 21, 265–277. doi:10.1007/s12355-018-0633-z
- Fuess, L.T., Ferraz Júnior, A.D.N., Machado, C.B., Zaiat, M., 2018. Temporal dynamics and metabolic correlation between lactate-producing and hydrogen-producing bacteria in sugarcane vinasse dark fermentation: The key role of lactate. *Bioresource Journal*. 247, 426–433. doi:10.1016/j.biortech.2017.09.121
- Fuess, L.T., Klein, B.C., Chagas, M.F., Rezende, M.C.A.F., Garcia, M.L., Bonomi, A., Zaiat, M., 2018. Diversifying the technological strategies for recovering bioenergy from the two-phase anaerobic digestion of sugarcane vinasse: An integrated techno-economic and environmental approach. *Renewable Energy* 122, 674–687. doi:10.1016/j.renene.2018.02.003
- Fuess, L.T., Rodrigues, I.J., Garcia, M.L., Fuess, L.T., Rodrigues, I.J., Ferrirrigation, M.L.G., 2017. Ferrirrigation with sugarcane vinasse: Foreseeing potential impacts on soil and water resources through vinasse characterization. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 52, 1063–1072. doi:10.1080/10934529.2017.1338892
- Görke, B., Stülke, J., 2008. Carbon catabolite repression in bacteria: Many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews Microbiology* 6, 613–624. doi:10.1038/nrmicro1932
- Guo, W., Li, J., Zheng, H., Wu, Q., 2016. Hydrogen Production from Corn cob by

Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum M18 214–220.

- Hallenbeck, P.C., 2013. Photofermentative Biohydrogen Productio, in: Biohydrogen. pp. 145–159.
- Hallenbeck, P.C., Benemann, J.R., 2002. Biological hydrogen production; Fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy* 27, 1185–1193. doi:10.1016/S0360-3199(02)00131-3
- Hallenbeck, P.C., Ghosh, D., 2009. Advances in fermentative biohydrogen production : the way forward ? 287–297. doi:10.1016/j.tibtech.2009.02.004
- Hawkes, F.R., Dinsdale, R., Hawkes, D.L., Hussy, I., 2002. Sustainable fermentative hydrogen production: Challenges for process optimisation. *International Journal of Hydrogen Energy* 27, 1339–1347. doi:10.1016/S0360-3199(02)00090-3
- Hniman, A., O-Thong, S., Prasertsan, P., 2011. Developing a thermophilic hydrogen-producing microbial consortia from geothermal spring for efficient utilization of xylose and glucose mixed substrates and oil palm trunk hydrolysate. *International Journal of Hydrogen Energy* 36, 8785–8793. doi:10.1016/j.ijhydene.2010.09.067
- Hoang, V.T., Hoang, D.H., Pham, N.D., Tran, H.M., Bui, H.T.V., Ngo, T.A., 2018. Hydrogen production by newly isolated *Clostridium* species from cow rumen in pure- and co-cultures on a broad range of carbon sources. *AIMS Energy* 6, 846–865. doi:10.3934/energy.2018.5.846
- Hoster, F., Daniel, R., Gottschalk, G., 2001. Isolation of a new *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* strain (FH1) producing a thermostable dextranase 192, 187–192.
- Huesemann, M.H., Hausmann, T.S., Carter, B.M., Gerschler, J.J., Benemann, J.R., 2010. Hydrogen Generation Through Indirect Biophotolysis in Batch Cultures of the Nonheterocystous Nitrogen-Fixing Cyanobacterium *Plectonema boryanum* 208–220. doi:10.1007/s12010-009-8741-6
- Kanchanasuta, S., Prommeenate, P., 2016. Stability of *Clostridium butyricum* in biohydrogen production from non-sterile food waste. *International Journal of Hydrogen Energy* 42, 3454–3465. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.09.111
- Kapdan, I.K., Kargi, F., 2006. Bio-hydrogen production from waste materials 38, 569–582. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.09.015
- Khamtib, S., Reungsang, A., 2012. Biohydrogen production from xylose by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* KKU19 isolated from hot spring sediment. *International Journal of Hydrogen Energy* 37, 12219–12228.

- doi:10.1016/j.ijhydene.2012.06.038
- Kim, D., Kim, M., 2013. Development of a novel three-stage fermentation system converting food waste to hydrogen and methane. *Bioresource Technology* 127, 267–274. doi:10.1016/j.biortech.2012.09.088
- Koeck, D.E., Wibberg, D., Maus, I., Winkler, A., Albersmeier, A., Zverlov, V. V., Liebl, W., Pühler, A., Schwarz, W.H., Schlüter, A., 2014. Complete genome sequence of the cellulolytic thermophile *Ruminoclostridium cellulosic* wild-type strain DG5 isolated from a thermophilic biogas plant. *Journal of Biotechnology* 188, 136–137. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.08.024
- Kotay, S.M., Das, D., 2007. Microbial hydrogen production with *Bacillus coagulans* IIT-BT S1 isolated from anaerobic sewage sludge. *Bioresource Technology* 98, 1183–1190. doi:10.1016/j.biortech.2006.05.009
- Krishnan, A., Zhang, S., Liu, Y., Tadmori, K.A., Bryant, D.A., Dismukes, C.G., 2016. Consequences of *ccmR* deletion on respiration, fermentation and H₂ metabolism in cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Biotechnology and Bioengineering* 113, 1448–1459. doi:10.1002/bit.25913
- Kumar, G., Bakonyi, P., Kobayashi, T., Xu, K.Q., Sivagurunathan, P., Kim, S.H., Buitrón, G., Nemestóthy, N., Bélafi-Bakó, K., 2016. Enhancement of biofuel production via microbial augmentation: The case of dark fermentative hydrogen. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 57, 879–891. doi:10.1016/j.rser.2015.12.107
- Kumari, S., Das, D., 2016. Improvement of biohydrogen production using acidogenic culture. *International Journal of Hydrogen Energy* 42, 4083–4094. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.09.021
- Lamaison, C., Avelino, P., Andrade, M. De, Durrer, A., Dini, F., 2015. Long-term effect of acid and heat pretreatment of sludge from a sugarcane vinasse treatment plant on the microbial community and on thermophilic biohydrogen production 0. doi:10.1016/j.ijhydene.2015.08.096
- Larsen, L., Nielsen, P., Ahring, B.K., 1997. *Thermoanaerobacter mathranii* sp. nov., an ethanol-producing, extremely thermophilic anaerobic bacterium from a hot spring in Iceland. *Arch Microbiol* 168, 114–119.
- Lazaro, C.Z., Perna, V., Etchebehere, C., Varesche, M.B.A., 2014. Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: The effects of temperature and substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy* 39, 6407–6418.

doi:10.1016/j.ijhydene.2014.02.058

- Lee, Y., Mackie, R.I., Cann, I.K.O., Wiegel, J., 2019. Description of *Caldanaerobius fijiensis* gen. nov., thermophilic bacterium from a Fijian hot spring sediment, and reclassification of *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum* and *Thermoanaerobacterium zeae* as *Caldanaerobius*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 666–670. doi:10.1099/ijms.0.65329-0
- Leja, K., Samul, D., Myszk, K., 2014. Hypothetical glycerol pathways of newly isolated strains capable of 1,3-propanediol production. *Acta biochimica Polonica* 61. doi:10.18388/abp.2014
- Levin, D.B., Pitt, L., Love, M., 2004. Biohydrogen production : prospects and limitations to practical application 29, 173–185. doi:10.1016/S0360-3199(03)00094-6
- Li, X., Shi, H., Ding, H., Zhang, Y., Wang, F., 2014. Production , Purification , and Characterization of a Cellulase-Free Thermostable Endo-xylanase from *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. *Appl Biochem Biotechnol* 174, 2392–2402. doi:10.1007/s12010-014-1135-4
- Li, Y., Zhang, Q., Deng, L., Liu, Z., Jiang, H., Wang, F., 2018. Biohydrogen production from fermentation of cotton stalk hydrolysate by *Klebsiella* sp . WL1316 newly isolated from wild carp (*Cyprinus carpio* L .) of the Tarim River basin 4231–4242.
- Maintinguer, S.I., Fernandes, B.S., Duarte, I.C.S., Ka, N., Adorno, M.A.T., Varesche, M.B.A., 2011. Fermentative hydrogen production with xylose by *Clostridium* and *Klebsiella* species in anaerobic batch reactors 6. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.07.095
- Maintinguer, S.I., Lazaro, C.Z., Pachiega, R., Varesche, M.B.A., Sequinel, R., Oliveira, J.E. de, 2016. Hydrogen bioproduction with *Enterobacter* sp. isolated from brewery wastewater 2. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.11.104
- Matsumoto, M., Nishimura, Y., 2007. Hydrogen Production by Fermentation Using Acetic Acid and Lactic Acid 103, 236–241. doi:10.1263/jbb.103.236
- McClung, L.S., 1935. Studies on anaerobic bacteria. *Journal of bacteriology* 24, 189–203.
- Mittelman, K., Barkai, N., 2017. The Genetic Requirements for Pentose Fermentation in Budding Yeast. *Genes Genomes Genetics* 7, 1743–1752. doi:10.1534/g3.117.039610
- Mohapatra, S., Mishra, S.S., Das, S.K., Thatoi, H., 2018. Influence of reactors, microbial carbohydrate uptake, and metabolic pathways on ethanol production from grass biomass: A review. *International Journal of Energy Research* 1615–1646. doi:10.1002/er.4294
- Moraes, B.D.S., Mary, G., Delforno, T.P., Fuess, L.T., José, A., 2018. Enriched microbial

- consortia for dark fermentation of sugarcane vinasse towards value-added short-chain organic acids and alcohol production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* xx. doi:10.1016/j.jbiosc.2018.10.008
- Muyzer, G., Waal, E.C.D.E., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695–700.
- Nazina, T.N., Rozanova, E.P., Belyakova, E. V, Lysenko, A.M., Poltarau, A.B., Tourova, T.P., Osipov, G.A., Belyaev, S.S., 2005. Description of “*Desulfotomaculum nigrificans* subsp. *salinum*” as a New Species, *Desulfotomaculum salinum* sp . nov . *Microbiology* 74, 567–574.
- Noparat, P., Prasertsan, P., O-Thong, S., 2011. Isolation and characterization of high hydrogen-producing strain *Clostridium beijerinckii* PS-3 from fermented oil palm sap. *International Journal of Hydrogen Energy* 36, 14086–14092. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.04.143
- Nübel, U., Engelen, B., Felsre, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W., Backhaus, H., 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology* 178, 5636–5643. doi:10.1128/jb.178.19.5636-5643.1996
- O-thong, S., Prasertsan, P., Karakashev, D., Angelidaki, I., 2008. Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2. *International Journal of Hydrogen Energy* 33, 1204–1214. doi:10.1016/j.ijhydene.2007.12.015
- Onyenwoke, R.U., Wiegel, J., 2009. *Thermoanaerobacterium*, in: Se Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman, W.. (Ed.), *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*. Springer International Publishing, Athenas, GA.
- Packard, H., Taylor, Z.W., Williams, S.L., Guimarães, P.I., Toth, J., Jensen, R. V., Senger, R.S., Kuhn, D.D., Stevens, A.M., 2019. Identification of soil bacteria capable of utilizing a corn ethanol fermentation byproduct. *Plos One* 14, e0212685. doi:10.1371/journal.pone.0212685
- Plugge, C.M., Zoetendal, E.G., Stams, A.J.M., 2000. *Caloramator coolhaasii* sp. nov., a glutamate-degrading, moderately thermophilic anaerobe. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 1155–1162.

- Qiu, C., Wen, J., Jia, X., 2011. Extreme-thermophilic biohydrogen production from lignocellulosic bioethanol distillery wastewater with community analysis of hydrogen-producing microflora. *International Journal of Hydrogen Energy* 36, 8243–8251. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.04.089
- Rabelo, C.A.B.S., Soares, L.A., Sakamoto, I.K., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2018. Optimization of hydrogen and organic acids productions with autochthonous and allochthonous bacteria from sugarcane bagasse in batch reactors. *Journal of Environmental Management* 223, 952–963. doi:10.1016/j.jenvman.2018.07.015
- Ramachandran, U., Wrana, N., Cicek, N., Sparling, R., Levin, D.B., 2011. Isolation and characterization of a hydrogen- and ethanol-producing *Clostridium* sp. strain URNW. *Canadian journal of microbiology* 57, 236–243. doi:10.1139/W11-005
- Ramos, H.C., Hoffmann, T., Marino, M., Nedjari, H., Presecan-siedel, E., Dreesen, O., Glaser, P., Jahn, D., 2000. Fermentative Metabolism of *Bacillus subtilis*: Physiology and Regulation of Gene Expression. *Journal of bacteriology* 182, 3072–3080.
- Ramos, L.R., Silva, E.L., 2017. Continuous Hydrogen Production from Agricultural Wastewaters at Thermophilic and Hyperthermophilic Temperatures. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 182, 846–869. doi:10.1007/s12010-016-2366-3
- Ratti, R.P., Delforno, T.P., Okada, D.Y., Bernadete, M., Varesche, A., 2015a. Bacterial communities in thermophilic H₂-producing reactors investigated using 16S rRNA 454 pyrosequencing. *Microbiological Research* 173, 10–17. doi:10.1016/j.micres.2015.01.010
- Ratti, R.P., Delforno, T.P., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B.A., 2015b. Thermophilic hydrogen production from sugarcane bagasse pretreated by steam explosion and alkaline delignification. *International Journal of Hydrogen Energy* 40, 6296–6306. doi:10.1016/j.ijhydene.2015.03.067
- Reis, C.E.R., Hu, B., 2017. Vinasse from Sugarcane Ethanol Production : Better Treatment or Better Utilization? doi:10.3389/fenrg.2017.00007
- Ren, N., Cao, G., Wang, A., Lee, D., 2008. Dark fermentation of xylose and glucose mix using isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. *International Journal of Hydrogen Energy* 33, 6124–6132. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.07.107
- Ren, N.Q., Zhao, L., Chen, C., Guo, W.Q., Cao, G.L., 2016. A review on bioconversion of lignocellulosic biomass to H₂: Key challenges and new insights. *Bioresource Technology* 215, 92–99. doi:10.1016/j.biortech.2016.03.124
- Roy, S., Vishnuvardhan, M., Das, D., 2013. Improvement of hydrogen production by newly

- isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* IIT BT-ST1. *International Journal of Hydrogen Energy* 39, 7541–7552. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.06.128
- Sander, K., Chung, D., Hyatt, D., Westpheling, J., Klingeman, D.M., Rodriguez, M., Engle, N.L., Tschaplinski, T.J., Davison, B.H., Brown, S.D., 2019. Rex in *Caldicellulosiruptor bescii*: Novel regulon members and its effect on the production of ethanol and overflow metabolites. *MicrobiologyOpen* 8, 1–15. doi:10.1002/mbo3.639
- Santos-Merino, M., Singh, A.K., Ducat, D.C., 2019. New Applications of Synthetic Biology Tools for Cyanobacterial Metabolic Engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 7, 1–24. doi:10.3389/fbioe.2019.00033
- Saripan, A.F., Reungsang, A., 2013. Biohydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* KKU-ED1 : Culture conditions optimization using xylan as the substrate. *International Journal of Hydrogen Energy* 38, 6167–6173. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.12.130
- Sarma, S.J., Pachapur, V., Brar, S.K., Bihan, Y. Le, Buelna, G., 2015. Hydrogen biorefinery : Potential utilization of the liquid waste from fermentative hydrogen production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 50, 942–951. doi:10.1016/j.rser.2015.04.191
- Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O., 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology* 50, 1–17.
- Schmidellm, W., Almeida Lima, U. de, Aquarone, E., Borzani, W., 2001. *Biotechnologia Industrial*.
- Schoenborn, L., Yates, P.S., Grinton, B.E., Hugenholtz, P., Janssen, P.H., 2004. Liquid serial dilution is inferior to solid media for isolation of cultures representative of the phylum-level diversity of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 4363–4366. doi:10.1128/AEM.70.7.4363-4366.2004
- Shang, S., Qian, L., Zhang, X., Li, K., Chagan, I., 2013. *Thermoanaerobacterium calidifontis* sp. nov., a novel anaerobic, thermophilic, ethanol-producing bacterium from hot springs in China. *Arch Microbiol* 195, 439–445. doi:10.1007/s00203-013-0895-5
- Shaw, A.J., Hogsett, D.A., Lynd, L.R., Al, S.E.T., 2010. Natural Competence in *Thermoanaerobacter* and *Thermoanaerobacterium* Species. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 4713–4719. doi:10.1128/AEM.00402-10
- Shaw, A.J., Jenney, F.E., Adams, M.W.W., Lynd, L.R., 2008a. End-product pathways in the xylose fermenting bacterium, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* 42, 453–458. doi:10.1016/j.enzmictec.2008.01.005

- Shaw, A.J., Podkaminer, K.K., Desai, S.G., Bardsley, J.S., Rogers, S.R., Thorne, P.G., Hogsett, D.A., Lynd, L.R., 2008b. Metabolic engineering of a thermophilic bacterium to produce ethanol at high yield. *Applied biological sciences*.
- Shen, N., Zhang, F., Song, X.N., Wang, Y.S., Zeng, R.J., 2013. Why is the ratio of H₂/acetate over 2 in glucose fermentation by *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *International Journal of Hydrogen Energy* 38, 11241–11247. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.06.091
- Sheng, T., Zhao, L., Gao, L.F., Liu, W.Z., Cui, M.H., Guo, Z.C., Ma, X.D., 2016. Biotechnology for Biofuels Lignocellulosic saccharification by a newly isolated bacterium, *Ruminiclostridium thermocellum* M3 and cellular cellulase activities for high ratio of glucose to cellobiose. *Biotechnology for Biofuels* 9, 1–11. doi:10.1186/s13068-016-0585-z
- Sigurbjornsdottir, M.A., Orlygsson, J., 2012. Combined hydrogen and ethanol production from sugars and lignocellulosic biomass by *Thermoanaerobacterium* AK54, isolated from hot spring. *Applied Energy* 97, 785–791. doi:10.1016/j.apenergy.2011.11.035
- Silva, J.L. da, Beluomini, M.A., Sedenho, G.C., Stradiotto, N.R., 2017. Determination of amino acids in sugarcane vinasse by ion chromatographic using nickel nanoparticles on reduced graphene oxide modified electrode. *Microchemical Journal* 134, 374–382. doi:10.1016/j.microc.2017.07.007
- Silva, V., Ratti, R.P., Sakamoto, I.K., Andrade, M.V.F., Varesche, M.B.A., 2018. Biotechnological products in batch reactors obtained from cellulose, glucose and xylose using thermophilic anaerobic consortium. *Renewable Energy* 125, 537–545. doi:10.1016/j.renene.2018.02.124
- Sinha, P., Pandey, A., 2011. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* 36, 7460–7478. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.03.077
- Sitthikitpanya, S., Reungsang, A., Prasertsan, P., Khanal, S.K., 2017. Two-stage thermophilic bio-hydrogen and methane production from oil palm trunk hydrolysate using *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* KCU19. *International Journal of Hydrogen Energy* 42, 28222–28232. doi:10.1016/j.ijhydene.2017.09.136
- Sivagurunathan, P., Kumar, G., 2015. A critical review on issues and overcoming strategies for the enhancement of dark fermentative hydrogen production in continuous systems and Nemesio. *International journal of hydrogen energy* 41, 3820–3836.
- Soares, L.A., Braga, J.K., Motteran, F., Sakamoto, I.K., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2017.

- Design and optimization of hydrogen production from hydrothermally pretreated sugarcane bagasse using response surface methodology. *Water Science and Technology* 76, 95–105. doi:10.2166/wst.2017.183
- Sprenger, G.A., 1996. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a Catabolic Highway With Some Scenic Routes. *FEMS Microbiology Letters* 145, 301–307.
- Sveinsdottir, M., Sigurbjornsdottir, M.A., Orlygsson, J., 2011. Ethanol and Hydrogen Production with thermophilic bacteria from sugars and complex biomass. *Progress in Biomass and Bioenergy Production* 359–394.
- Tarlera, S., Muxí, L., Soubes, M., Stams, A.J.M., 1997. *Caloramator proteoclasticus* sp. nov., a new moderately thermophilic anaerobic proteolytic bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, 651–656. doi:10.1099/00207713-47-3-651
- Tomás, A.F., 2013. Optimization of bioethanol production from carbohydrate rich wastes by extreme thermophilic microorganisms. Technical University of Denmark.
- Tomás, A.F., Karakashev, D., Angelidaki, I., 2013. *Thermoanaerobacter pentosaceus* sp. nov., an anaerobic, extremely thermophilic, high ethanol-yielding bacterium isolated from household waste. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 2396–2404. doi:10.1099/ijms.0.045211-0
- Tsakraklides, V., Shaw, A.J., Miller, B.B., Hogsett, D.A., Herring, C.D., 2012. Carbon catabolite repression in *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. *Biotechnology for Biofuels* 5, 1–7. doi:10.1186/1754-6834-5-85
- Ueki, A., Ohtaki, Y., Kaku, N., Ueki, K., 2016. Descriptions of *Anaerotaenia torta* gen. nov., sp. nov. and *Anaerocolumna cellulositytica* gen. nov., sp. nov. isolated from a methanogenic reactor of cattle waste and reclassification of *Clostridium aminovalericum*, *Clostridium jejuense* and *Clostridium xylanovorans* as *Anaerocolumna* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66, 2936–2943. doi:10.1099/ijsem.0.001123
- Velagapudi, V.R., Wittmann, C., Schneider, K., Heinzle, E., 2007. Metabolic flux screening of *Saccharomyces cerevisiae* single knockout strains on glucose and galactose supports elucidation of gene function. *Journal of Biotechnology* 132, 395–404. doi:10.1016/j.jbiotec.2007.08.043
- Volpini, V., Lovato, G., Albanez, R., Ratusznei, S.M., Rodrigues, J.A.D., 2018. Biomethane generation in an AnSBBR treating effluent from the biohydrogen production from vinasse : Optimization , metabolic pathways modeling and scale-up estimation. *Renewable*

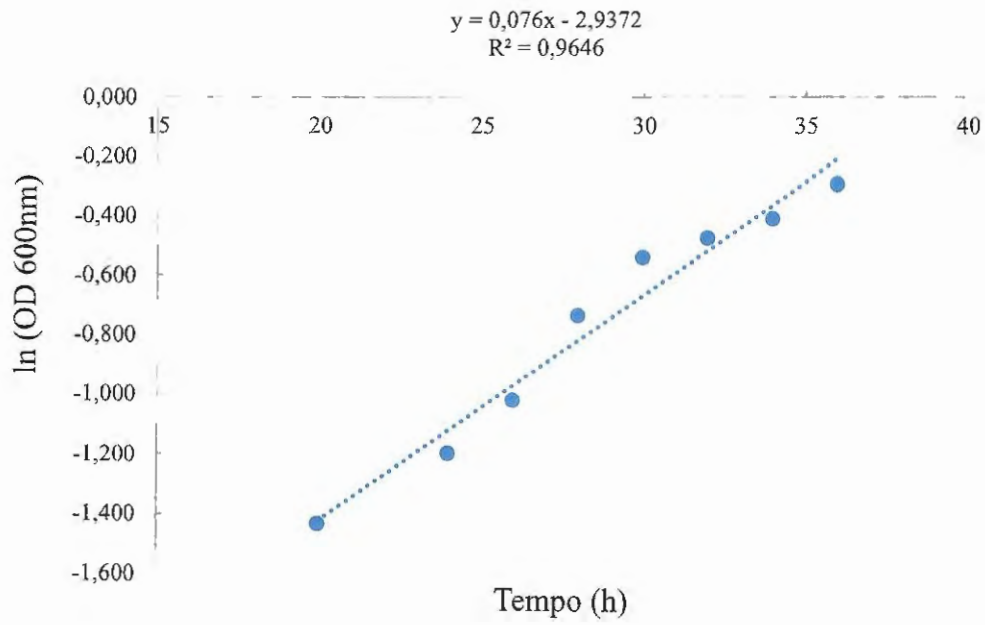
Energy 116, 288–298. doi:10.1016/j.renene.2017.09.004

- Vrije, T. de, Mars, A.E., Budde, M.A.W., Lai, M.H., Dijkema, C., De Waard, P., Claassen, P.A.M., 2007. Glycolytic pathway and hydrogen yield studies of the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74, 1358–1367. doi:10.1007/s00253-006-0783-x
- Wiegel, J., Ljungdahl, L.G., 1981. *Thermoanaerobacter ethanolicus* gen. nov., spec. nov., a New, Extreme Thermophilic, Anaerobic Bacterium. *Archives of microbiology* 1979, 343–348.
- Wilkie, A.C., Riedesel, K.J., Owens, J.M., 2000. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks p. *Biomass and Bioenergy* 19, 63–102.
- Xing, D., Ren, N., Li, Q., Lin, M., Wang, A., Zhao, L., 2006. *Ethanoligenens harbinense* gen. nov., sp. nov., isolated from molasses wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 755–760. doi:10.1099/ijs.0.63926-0
- Yin, Y., Wang, J., 2017. Isolation and characterization of a novel strain *Clostridium butyricum* INET1 for fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* 42, 12173–12180. doi:10.1016/j.ijhydene.2017.02.083
- Yodsang, P., Raksajit, W., Aro, E.M., Mäenpää, P., Incharoensakdi, A., 2018. Factors affecting photobiological hydrogen production in five filamentous cyanobacteria from Thailand. *Photosynthetica* 56, 334–341. doi:10.1007/s11099-018-0789-5
- Zeikus, J.G., Hegge, P.W., Anderson, M.A., 1979. *Thermoanaerobium brockii* gen. nov. and sp. nov., A New Chemoorganotrophic, Caldoactive, Anaerobic Bacterium 48, 41–48.
- Zhan, J., Rong, J., Wang, Q., 2017. Mixotrophic cultivation , a preferable microalgae cultivation mode for biomass / bioenergy production , and bioremediation , advances and prospect. *International Journal of Hydrogen Energy* 42, 8505–8517. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.12.021
- Zhang, K., Cao, G.L., Ren, N.Q., 2019. Bioaugmentation with *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16 to enhance thermophilic hydrogen production using corn stover hydrolysate. *International Journal of Hydrogen Energy* 44, 5821–5829. doi:10.1016/j.ijhydene.2019.01.045
- Zhao, X., Xing, D., Qi, N., Zhao, Y., Hu, X., 2017. Deeply mechanism analysis of hydrogen production enhancement of *Ethanoligenens harbinense* by Fe²⁺ and Mg²⁺: Monitoring at growth and transcription levels. *International Journal of Hydrogen Energy* 42, 19695–

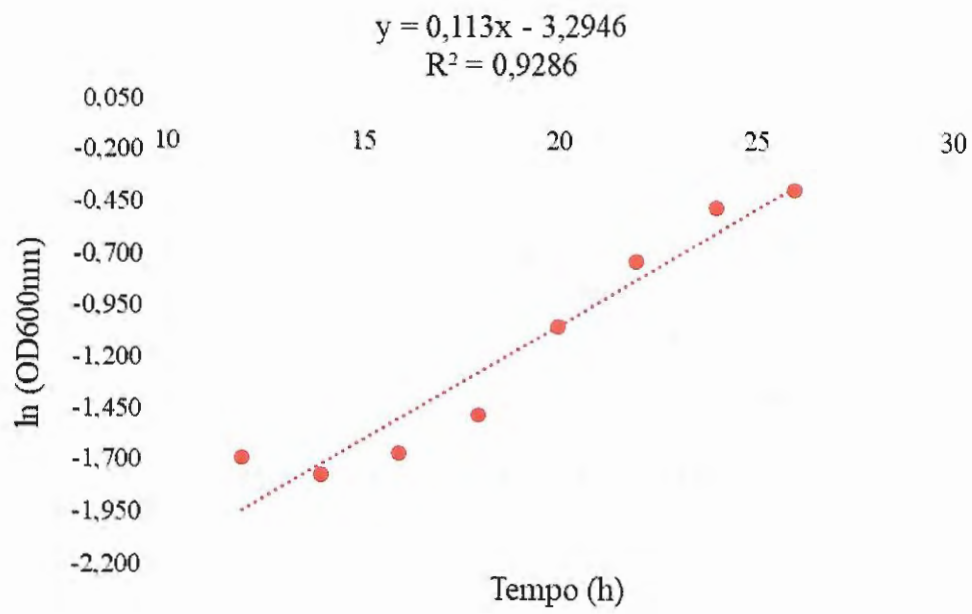
19700. doi:10.1016/j.ijhydene.2017.06.038

Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., van 'T Riet, K., 1990. Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environ. Microbiol* 56, 1875–1888.

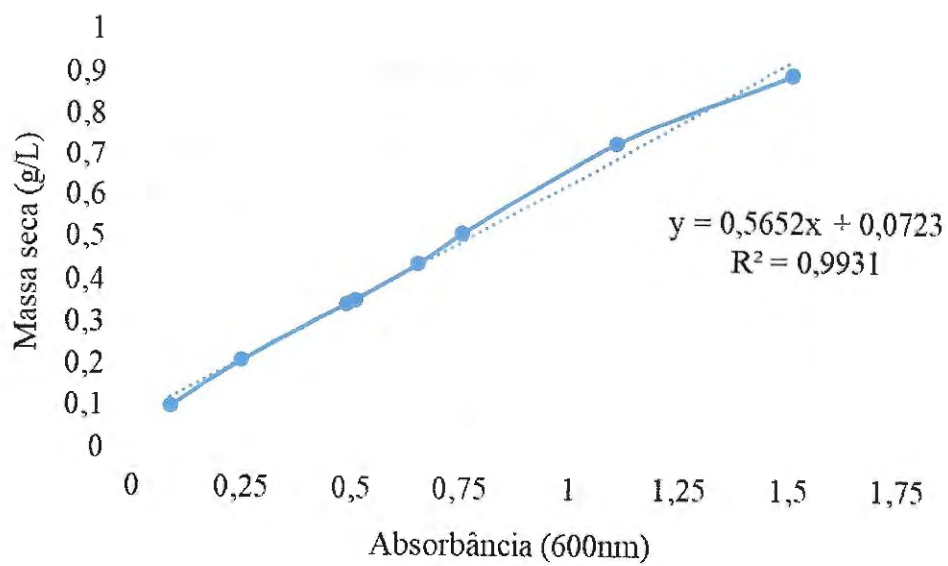
ANEXO A – Equação da fase exponencial de crescimento da cultura isolada VCS1 para cálculo de tempo de geração (tg) e velocidade específica de crescimento (μ)



ANEXO B – Equação da fase exponencial de crescimento da cultura isolada VCS6 para cálculo de tempo de geração (tg) e velocidade específica de crescimento (μ)



ANEXO C – Determinação de crescimento celular por correlação entre absorvância (densidade óptica 600nm) e Massa seca (g/L)



ANEXO D – Limites de detecção por cromatografia gasosa (GC-2010 Shimadzu) com detector de ionização de chama (FID) e com coluna HP INNOWAX de ácidos orgânicos e álcool.

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