



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA



Estudo de diferentes tipos de fonte de carbono como substrato para produção de hidrogênio por meio de fermentação escura e fotofermentação

Felipe Santos Moreira



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA



Estudo de diferentes tipos de fonte de carbono como substrato para produção de hidrogênio por meio de fermentação escura e fotofermentação

Felipe Santos Moreira

Orientadora: **Prof^a. Dr^a. Vicelma Luiz Cardoso**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M838e
2016 Moreira, Felipe Santos, 1990
 Estudo de diferentes tipos de fonte de carbono como substrato para
 produção de hidrogênio por meio de fermentação escura e
 fotofermentação / Felipe Santos Moreira. - 2016.
 76 f. : il.

 Orientadora: Vicelma Luiz Cardoso.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.
 Inclui bibliografia.

 1. Engenharia química - Teses. 2. Fermentacao - Tecnologia quimica
 - Teses. 3. Hidrogênio como combustível - Teses. 4. Resíduos como
 combustível - Teses. I. Cardoso, Vicelma Luiz. II. Universidade Federal
 de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III.
 Título.

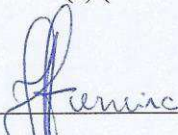
CDU: 66.0

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE FELIPE SANTOS MOREIRA SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 15 DE JULHO DE 2016.

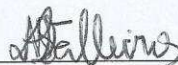
BANCA EXAMINADORA



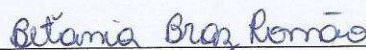
Prof^a. Dr^a. Vicelma Luiz Cardoso
Orientador (a) (PPGEQ/UFU)



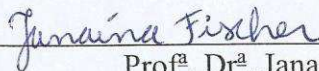
Prof^a. Dr^a. Juliana de Souza Ferreira
Co-Orientador (a) PPGEQ/UFU



Prof^a. Dr^a. Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros
FEQUI/UFU



Dr^a. Betania Braz Romão
FEQUI/UFU



Prof^a. Dr^a. Janáina Fischer
UPF

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas oportunidades concedidas, pelas vitórias conquistadas e pelos bons momentos vividos.

Aos meus pais, José Moreira e Eliene, pelo amor incondicional, incentivo, confiança e educação. Agradeço por estarem ao meu lado em todos os momentos, pela compreensão e dedicação.

Aos meus familiares e amigos, pela paciência, compreensão e por inúmeras vezes ter me ausentado.

Ao Bruno que esteve comigo durante a realização desse trabalho, obrigado pelo carinho, pelo apoio e pela paciência.

A minha orientadora, prof. Dr^a. Vicelma Luiz Cardoso, pela confiança, paciência, por todos os conhecimentos transmitidos, por estar sempre disposta a ajudar, pelo incentivo e motivação para a conclusão deste trabalho.

Em especial a prof. Dr^a. Juliana de Souza Ferreira, por todo apoio, dedicação, paciência e disponibilidade.

A Betânia por todos ensinamentos no início do mestrado, pela paciência, por estar sempre disposta a me ajudar.

A todos os professores da FEQUI que contribuíram direta ou indiretamente em minha formação, contribuindo com informações valiosas para a realização deste estudo.

Em especial às minhas amigas Letícia, Marília e Rafaela pela amizade incondicional, pelo apoio e carinho.

Aos colegas de laboratório, que de forma direta ou indireta contribuíram para o meu crescimento profissional: Bruna, Roseli, Taciana, Larissa, Janaína, Camila, Taís, Natália, Grasielle. Obrigado pelos ensinamentos, ajuda e amizade.

Aos alunos de iniciação científica Fernando, Davi e Gustavo, que tanto ajudaram na realização dos experimentos.

Aos funcionários da FEQUI: Cecília, Ione, Roberta, Humberto e Ulisses pela colaboração.

Ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade concedida.

A Capes, FAPEMIG, CNPq e VALE S.A. pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que colaboraram para o bom desenvolvimento deste trabalho.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
SIMBOLOGIA E ABREVIATURAS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
CAPÍTULO 1	8
INTRODUÇÃO	8
CAPÍTULO 2	10
OBJETIVOS	10
CAPÍTULO 3	11
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1 - Fontes Energéticas	11
3.2 - Produção de Hidrogênio	12
3.3 - Produção Biológica de Hidrogênio	12
3.3.1 - Biofotólise	13
3.3.2 - Produção de hidrogênio por fermentação escura	14
3.3.3 - Produção de hidrogênio por bactérias fotossintéticas	16
3.3.4 - Produção de hidrogênio por sistemas híbridos	18
3.4 - Parâmetros que afetam a produção de hidrogênio	19
3.4.1 - Inóculo	19
3.4.2 - Substrato	20
3.4.3 - pH	21
3.4.4 - Temperatura	22
3.4.5 - Tratamento do inóculo	22
3.4.6 - Configuração do reator e modo de operação	23
CAPÍTULO 4	24

MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1 - Substrato	24
4.2 - Inóculo	24
4.3 - Processo fermentativo em escala reduzida	26
4.3.1 - Ensaio de fermentação escura	27
4.3.2 - Ensaio de fotofermentação	27
4.4 - Processo fermentativo em escala ampliada: Reator anaeróbico de tanque agitado.....	28
4.5 - Métodos analíticos.....	30
4.5.1 - Quantificação do crescimento celular	30
4.5.2 - Quantificação de açúcares e metabólitos formados durante as fermentações	30
4.5.3 - Quantificação de hidrogênio	31
4.6 - Conversão	31
4.7 - Produtividade.....	31
CAPÍTULO 5	32
RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 - Ensaio em escala reduzida	32
5.1.1 - Ensaio de fermentação escura: Pré-tratamentos do inóculo.....	32
5.1.2 - Ensaio fotofermentação: Culturas puras e sistema de co-cultura com meio RCV suplementado com ácido málico e lactose	33
5.1.3 - Ensaio de fotofermentação: Avaliação do consumo dos açúcares presente no melaço de soja em sistema de cultura pura	34
5.2 - Ensaio em escala ampliada: Reator anaeróbico de tanque agitado em batelada alimentada.....	39
5.2.1 - Fermentação escura: utilizando como substrato lactose proveniente do permeado do soro de leite em pó	39
5.2.2 - Fermentação escura: utilizando glicose P.A como substrato.....	43
5.2.3 - Fermentação escura: utilizando glicose e lactose, com adição alternada como substrato.....	47

5.2.4 - Fermentação escura: utilizando glicose e lactose, com adição simultânea, como substrato.....	50
5.2.5 Aspectos gerais dos ensaios de fermentação escura	53
CAPÍTULO 6	56
CONCLUSÕES	56
6.1 - Conclusões.....	56
6.2 - Sugestões para trabalhos futuros	57
CAPÍTULO 7	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
CAPÍTULO 8	65
APÊNCIDE A	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Esquema metabólico de produção de H ₂ através das bactérias fermentativas. (Fonte: adaptado de HALLENBECK e GHOSH, 2009).....	14
Figura 3.2 - Possíveis rotas metabólicas da fermentação escura de carboidratos. (Fonte: adaptado de REN, WANG e HUANG, 1997).....	15
Figura 3.3 - Esquema metabólico de produção de H ₂ através das bactérias fotossintetizantes. (Fonte: adaptado de HALLENBECK e GHOSH, 2009).....	17
Figura 4.1 - a: Permeado do soro de leite em pó; b: Melaço de soja.....	24
Figura 4.2 - Inóculo de cultura mista utilizado para produção de hidrogênio.....	25
Figura 4.3 - Inóculo em meio líquido da cepa <i>R. palustris</i> e <i>R. capsulatus</i>	25
Figura 4.4 - Esquema dos ensaios em escala reduzida (50 mL).....	26
Figura 4.5 - Unidade experimental.....	29
Figura 4.6 - Cromatógrafo utilizado na análise dos metabólitos formados e na quantificação de açúcares.....	30
Figura 4.7 - Cromatógrafo utilizado para análise do biogás formado.....	31
Figura 5.1 - Perfil de produtividade (mmol H ₂ /L·dia) empregando o melaço de soja como substrato na fotofermentação: <i>R. palustris</i> (■); <i>R. capsulatus</i> (○).	34
Figura 5.2 - Perfil de concentração celular (g/L) empregando o melaço de soja como substrato na fotofermentação: <i>R. palustris</i> (■); <i>R. capsulatus</i> (○).....	35
Figura 5.3 - Perfil de pH, empregando o melaço de soja como substrato na fotofermentação: <i>R. palustris</i> (■); <i>R. capsulatus</i> (○).....	35
Figura 5.4 - Perfil de concentração dos ácidos orgânicos, empregando o melaço de soja como substrato na fotofermentação por <i>R. palustris</i> : (ácido lático (■), ácido acético (○), ácido butírico (▽), ácido málico (*)).....	36
Figura 5.5 - Perfil de concentração dos ácidos orgânicos, empregando o melaço de soja como substrato na fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> : (ácido lático (■), ácido acético (○), ácido butírico (▽), ácido málico (*)).....	36
Figura 5.6 - Perfil de concentração dos açúcares que compõem o melaço de soja durante a fotofermentação por <i>R. palustris</i> : (estaquiiose (■), rafinose (○), sacarose (▲), glicose (▽), frutose (◄), açúcar total (*)).....	37
Figura 5.7 - Perfil de concentração dos açúcares que compõem o melaço de soja durante a fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> : (estaquiiose (■), rafinose (○), sacarose (▲), glicose (▽), frutose (◄), açúcar total (*)).....	37

Figura 5.8 - Produtividade (mmol H ₂ /L·dia) (■), conversão (mol H ₂ /mol de hexose consumido (○), durante a fermentação utilizando lactose como substrato.	40
Figura 5.9 - Variação da concentração dos metabólitos formados na fermentação utilizando lactose como substrato: (ácido lático (■), ácido acético (○), ácido propiônico (▲), ácido butírico (▽), etanol (*)).	40
Figura 5.10 - Perfil da concentração de substrato durante a fermentação utilizando lactose como substrato.	41
Figura 5.11 - pH (■), concentração celular (○), durante a fermentação utilizando lactose como substrato.	41
Figura 5.12 - Produtividade (mmol H ₂ /L·dia) (■), conversão (mol H ₂ /mol de hexose consumido (○), durante a fermentação utilizando glicose como substrato.	43
Figura 5.13 - Variação da concentração dos metabólitos formados na fermentação utilizando glicose como substrato: (ácido lático (■), ácido acético (○), ácido propiônico (▲), ácido butírico (▽), etanol (*)).	44
Figura 5.14 - Perfil da concentração de substrato durante a fermentação utilizando glicose (○) como substrato.	44
Figura 5.15 - pH (■), concentração celular (○), durante a fermentação utilizando glicose como substrato.	45
Figura 5.16 - Produtividade (mmol H ₂ /L·dia) (■), conversão (mol H ₂ /mol de hexose consumido (○), durante a fermentação utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato.	47
Figura 5.17 - Variação da concentração dos metabólitos formados na fermentação utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato: (ácido lático (■), ácido acético (○), ácido propiônico (▲), ácido butírico (▽), etanol (*)).	48
Figura 5.18 – Perfil da concentração de substrato durante a fermentação utilizando lactose (■) e glicose (○), com adição alternada como, substrato.	48
Figura 5.19 - pH (■), concentração celular (○), durante a fermentação utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato.	49
Figura 5.20 - Produtividade (mmol H ₂ /L·dia) (■), conversão (mol H ₂ /mol de hexose consumido (○), durante a fermentação utilizando lactose e glicose, alimentados de forma simultânea como substrato.	51
Figura 5.21 - Variação da concentração dos metabólitos formados na fermentação utilizando lactose e glicose, alimentados de forma simultânea como substrato: (ácido lático (■), ácido acético (○), ácido propiônico (▲), ácido butírico (▽), etanol (*)).	51

Figura 5.22 - Perfil da concentração de substrato durante a fermentação utilizando lactose (■) e glicose (○), alimentados de forma simultânea como substrato.....	52
Figura 5.23 - pH (■), concentração celular (○), durante a fermentação utilizando lactose e glicose, alimentados de forma simultânea como substrato.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Componentes do meio RCV.....	26
Tabela 4.2 - Composições da solução de micronutrientes utilizada no meio RCV.....	26
Tabela 5.1 - Composição final da fermentação escura usando a lactose proveniente do permeado do soro de leite em pó como substrato em diferentes pré-tratamentos do inóculo..	32
Tabela 5.2 - Composição final da lactose, etanol e ácidos orgânicos para diferentes culturas em ensaios de fotofermentação.....	33
Tabela 5.3 - Consolidação dos testes realizados de fermentação escura em escala ampliada.	55

SIMBOLOGIA E ABREVIATURAS

Adenosina trifosfato - ATP

Continuous Stirred Tank Reactor - CSTR

Dióxido de carbono - CO₂

Ferredoxina - Fd

Hidrógeno - H₂

Nicotinamida adenina dinucleotídeo - NAD⁺

Nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase - NADH

Pivurato ferredoxina oxidoreductase - PFOR

Pivurato formiato liase - PFL

Potencial hidrogeniônico - pH

Rotações por minuto - rpm

RESUMO

O suprimento para a necessidade energética global, na sua maioria, é dependente dos combustíveis fósseis. O hidrogênio é considerado uma fonte de energia viável visto que é um combustível não poluente e poder ser obtido por recursos renováveis. A produção de hidrogênio pode se dar biologicamente por fermentação a partir de efluentes e resíduos agroindustriais, cuja utilização minimiza seu acúmulo nos processos industriais, se tornando uma alternativa promissora devido aos baixos impactos ambientais. No presente trabalho, o objetivo foi estudar os diferentes tipos de fonte de carbono como substrato para produção de biohidrogênio durante a fermentação escura utilizando um consórcio microbiano e fotofermentação por bactérias púrpuras não sulfurosa. Os substratos utilizados durante os processos fermentativos foram glicose P.A., permeado de soro de leite em pó e melação de soja que é um resíduo agroindustrial. Testes preliminares foram realizados em frascos de penicilina, em batelada, para verificar a produção de biogás com: (i) fermentação escura utilizando culturas mistas em que se avaliou o efeito de pré-tratamentos no inóculo como: choque térmico e ácido; (ii) fotofermentação para as culturas puras de forma isolada e com a co-cultura. Verificou-se, por testes preliminares, que o pré-tratamento com choque térmico garantiu melhores resultados, com uma produtividade de 14,14 mmol H₂/L.dia. Com base nos resultados dos ensaios de fotofermentação das culturas puras e co-cultura, verificou-se que a cepa *Rhodospseudomonas palustris* apresentou resultados melhores comparados aos obtidos pela cepa *Rhodobacter capsulatus* e o sistema de co-cultura exibiu resultados inferiores. Nos ensaios em que se analisou o consumo do melação de soja, observou-se que as duas cepas apresentaram o mesmo potencial para produção de hidrogênio. Após os testes preliminares, foram realizados ensaios em escala ampliada com o propósito de aumentar a produção de H₂, acompanhar o processo em função do tempo e avaliar o modo de operação em batelada alimentada com adição isolada, alternada e simultânea de açúcares para as duas rotas biológicas. A fermentação escura foi realizada em condições anaeróbicas, utilizando o consórcio microbiano que obteve melhores resultados nos testes preliminares com os pré-tratamentos. Observou-se que a fermentação em que a glicose e lactose foi alimentada de forma simultânea ao meio promoveu a maior produtividade de hidrogênio, sendo a máxima igual a 168,27 mmol H₂/L.dia no tempo de 24 horas. No entanto, a alimentação alternada (glicose e lactose, sendo essa proveniente do permeado do soro de leite em pó) possibilitou manter a cultura ativa com potencial para produção de hidrogênio por um período superior a 900 horas. Os principais produtos ao final das fermentações foram ácido láctico e ácido butírico, seguidos de ácido acético, etanol e ácido propiônico.

Palavras-chave: Fermentação escura, fotofermentação, substrato.

ABSTRACT

The supply to the global energetic needs, mostly, is dependent of fossil fuels. The hydrogen is considered a viable energy source for being a not polluting fuel that may be obtained by renewable resources. Besides, it may be produced biologically by fermentation applying agroindustrial residue as substrates that contributes to minimize their accumulation at the industrial processes. Thus, H₂ is a promising alternative due to reduced environmental impacts. In this present study, the objective was study different types of carbon sources for hydrogen production by dark fermentation using a microbial consortium and photofermentation applying non-sulfur purple bacteria. The substrates utilized in the processes were pure glucose, whey permeate and molasses soybean, this is agroindustrial residues. Preliminary tests were performed in penicillin bottles, in batch mode, to verify the production of biogas with: (i) dark fermentation using mixed culture in which it was evaluated the effect of inoculum pre-treatment: heat-shock and acid; (ii) photofermentation of pure culture and co-culture assays. Based on the results of preliminary tests in reduced scale, it was found out that the pretreatment with heat-shock produced ensured best results, with a productivity of 14,14 mmol H₂/L.day. Concerning on the results of photofermentation trials with pure culture and co-culture, it was verified that the results obtained with *Rhodospseudomonas palustris* assays were better than with *Rhodobacter capsulatus* and that co-culture system presented the lowest results. In trials that the consumption of molasses soybean was analyzed, it was observed the two strains had the same potential for the production of H₂. After preliminary tests, experiments in scale-up were conducted with the purpose of increasing hydrogen production and evaluate the process in function of time, in fed batch mode with isolated, alternating and simultaneous addition of sugar for the two biological routes. Dark fermentation was carried out in anaerobic conditions, using a microbial consortium that obtained best results in the preliminary test in pretreatment. It was observed that fermentation with simultaneous addition of glucose and lactose promoted the highest hydrogen maximum productivity of 168,27 mmol H₂/L.day in 24 hours of process. Nevertheless, the alternation fed (glucose and lactose) allowed keeping the culture active with potential to hydrogen production for a period of time superior to 900 hours. At the end of fermentation, the main products were lactic acid and butyric acid, followed by acetic acid, ethanol e propionic acid.

Keywords: Dark fermentation, photofermentation, substrate.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A demanda mundial das necessidades energéticas, o apelo à redução de recursos de energia convencionais, juntamente com os problemas ambientais relacionados ao uso dos combustíveis fósseis que, além de não serem renováveis, são uma grande ameaça para o equilíbrio do planeta por serem muito poluentes fazem com que se explore novos recursos energéticos a partir de fontes renováveis (LAY et al., 2016).

É neste contexto que a produção de hidrogênio surge como alternativa de grande interesse. O hidrogênio pode oferecer estabilidade energética, econômica e benefícios ambientais. Atualmente, 80% da demanda global de energia ainda provém de combustíveis fósseis (BBC, 2016; LV et al., 2014).

O hidrogênio é uma fonte de energia limpa e renovável, uma vez que durante o processo de combustão libera apenas água e não há emissão de compostos responsáveis pelo efeito estufa que são emitidos pela queima dos combustíveis fósseis. O H_2 tem a mais alta energia por unidade de massa quando comparado com qualquer combustível, uma vez que é o elemento mais leve e não tem os pesados átomos de carbono. A energia liberada durante a reação do H_2 é aproximadamente 2,75 vezes o poder de combustão de um hidrocarboneto (HUDSON et al., 2009; ARGUN e KARGI, 2010).

Convencionalmente o hidrogênio é produzido a partir do gás natural por reforma a vapor. Outros métodos industriais são a gaseificação do carvão e eletrólise da água. Os métodos que utilizam fontes de energia não renováveis para produzir hidrogênio, causam impactos ambientais consideráveis, como, aumento do efeito estufa e alterações do clima. Assim, a exploração da produção de hidrogênio através de processos biológicos apresenta-se como uma alternativa atraente para obtenção de energia limpa (ARGUN e KARGI, 2010; DAS e VEZIROGLU, 2001).

A obtenção de hidrogênio por processos biológicos vem ganhando grande destaque devido à possibilidade de utilização de fontes renováveis de energia, bem como o reaproveitamento de materiais residuais, diminuindo assim a quantidade de subprodutos gerados nas indústrias. O hidrogênio biológico pode ser produzido por meio dos seguintes processos: biofotólise direta ou indireta da água, fotofermentação, fermentação anaeróbia e sistemas híbridos.

Um exemplo de sistema híbrido é o sistema constituído de fermentação escura seguido de fotofermentação. Na primeira etapa, o processo fermentativo de compostos orgânicos para

produção de hidrogênio é obtido por bactérias fermentativas em que o hidrogênio é formado pela ação de hidrogenases como meio de eliminar os elétrons gerados durante a degradação de carboidratos (BALAT e KIRTAY, 2010).

A produção de H₂ é acompanhada pela produção de ácidos orgânicos e o efluente resultante pode ser utilizado como substrato na fotofermentação. Desta forma, o processo de fotofermentação aumenta o rendimento global do processo biológico de produção de H₂ convertendo os ácidos orgânicos do efluente de fermentação escura em H₂ e CO₂ (SRIKANTH et al., 2009; UYAR et al., 2009).

Uma grande variedade de materiais ricos em matéria orgânica pode ser utilizada como substrato na produção de H₂. Carboidratos, como sacarose e glicose, são facilmente biodegradáveis pelas bactérias fermentativas, no entanto, fontes puras de carboidratos representam matérias-primas de alto custo para produção de H₂ em grande escala. Neste contexto, destaca-se a utilização de resíduos agroindustriais como substratos em potencial para produção de H₂, em um processo híbrido constituído das etapas de fermentação escura seguida de fotofermentação, por ser considerada bastante atraente dos pontos de vista ambiental e econômico (NTAIKOU, ANTONOPOULOU e LYBERATOS, 2010).

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

O objetivo principal foi o levantamento de subsídios técnico-científicos para permitir o desenvolvimento de um processo de produção de hidrogênio e que pudesse contribuir para sua aplicação de forma competitiva às técnicas atualmente empregadas que utilizam recursos não renováveis. Para alcançar esse objetivo geral, as seguintes etapas (objetivos específicos) foram consideradas:

- 1- Avaliar a necessidade de pré-tratamento das culturas que promovam a inativação de bactérias consumidoras de hidrogênio na fermentação escura;
- 2- Investigar a suplementação do meio de fotofermentação com lactose proveniente do permeado do soro de leite em pó e com o melaço de soja como fontes de carbono, em sistemas de cultura pura e co-cultura formado pelas cepas de *Rhodobacter capsulatus* e *Rhodopseudomonas palustris*;
- 3- Verificar o efeito do tipo da fonte de carbono sobre a produção de hidrogênio por fermentação escura utilizando um consórcio microbiano em um processo em batelada alimentada;
- 4- Estudar o modo de alimentação das fontes de carbono (glicose e a lactose proveniente do permeado do soro de leite em pó) por adição periódica de forma isolada, alternada ou simultânea durante a fermentação escura.

CAPÍTULO 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 - Fontes Energéticas

A crescente preocupação com as questões ambientais contribui para um aumento do interesse mundial por soluções sustentáveis de geração de energia a partir de fontes renováveis e limpas, reduzindo assim, a utilização de combustíveis fósseis que, apesar de apresentarem vantagens, são fontes de energia não renováveis e apresentam um agravante significativo que é a geração de gases que causam o efeito estufa na atmosfera. Destacam-se como principais fontes de energia utilizada pela sociedade: o gás natural, o carvão mineral e o petróleo, correspondendo a 86,7 % do suprimento de energia primária do mundo no ano de 2013 (IEA, 2015).

Portanto, o uso de fontes renováveis de energia é de suma importância no combate ao aquecimento do planeta, que é um causador de fenômenos climáticos severos como seca, enchentes e furacões que causam prejuízos econômicos a milhões de pessoas no mundo. Segundo dados do Ministério das Minas e Energia, cerca de 39,4 % da demanda total de energia no País em 2014 foi renovável, enquanto que a média mundial foi de 13,8 % e nos países desenvolvidos foi de apenas 9,8 % (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2016).

O hidrogênio tem sido considerado uma alternativa de energia limpa quando deriva de matéria-prima renovável, bem como possui uma elevada eficiência de conversão, é reciclável e não poluente (DAS e VEZIROGLU, 2001; MOHAN, MOHANAKRISHNA E SARMA, 2008).

O hidrogênio é aproximadamente quatorze vezes mais leve que o ar, e abundante no Universo, contemplando cerca de três quartos de toda a matéria. Ele é considerado incolor, inodoro, não é tóxico, possui a capacidade de ser armazenado em forma líquida ou gasosa e pode ser encontrado em combinações com outros elementos por ser um elemento de grande instabilidade e bastante reativo. O hidrogênio apresenta massa molecular de 1,0079 g/mol, uma densidade de 0,09 g/cm³ e contém alto valor energético, cerca de 121 kJ/g. A combustão de hidrocarbonetos emite gases nocivos que são prejudiciais ao meio ambiente, possuindo conteúdo energético por unidade de massa inferior, tais como, metano (50,02 kJ/g), propano (45,60 kJ/g), gasolina (44,50 kJ/g), metanol (18,05 kJ/g) entre outros (SILVA et al., 2009).

3.2 - Produção de Hidrogênio

Há vários métodos aplicados industrialmente para a produção de hidrogênio, dentre eles, pode-se citar: a partir dos combustíveis fósseis, a partir da água e da produção biológica (DAS e VERZIROGLU, 2001).

A produção de hidrogênio a partir dos combustíveis fósseis é realizada por craqueamento térmico do gás natural, da oxidação parcial de hidrocarbonetos pesados, da gaseificação do carvão e da reforma catalítica de gás natural. A alternativa de menor custo e eficiente é a partir do gás natural, em que o hidrogênio é obtido através da quebra das moléculas de hidrocarboneto que compõem este combustível. O problema deste processo é a emissão de gás carbônico e outros gases de efeito estufa (DAS e VERZIROGLU, 2001).

O hidrogênio produzido a partir da água pode ser obtido por eletrólise da água, fotólise da água, eletrólise do vapor e decomposição termoquímica da água. Esses métodos baseiam-se na utilização da energia elétrica e térmica, para separar o átomo de hidrogênio e o átomo de oxigênio (DAS e VERZIROGLU, 2001).

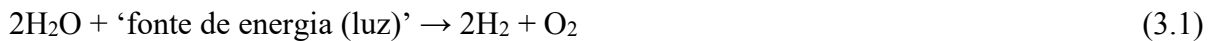
Os processos biológicos de produção de hidrogênio podem ser mais vantajosos, uma vez que são realizados em temperatura e pressão ambiente e, do ponto de vista ambiental, por não gerarem gases poluentes e utilizarem recursos renováveis (DAS e VERZIROGLU, 2001).

3.3 - Produção Biológica de Hidrogênio

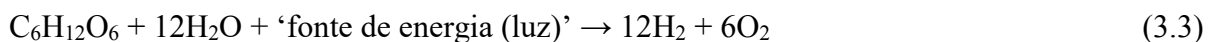
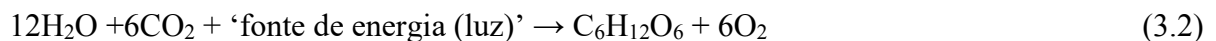
A produção biológica de hidrogênio por microrganismos ocorre por meio de duas vias principais: fotossíntese e fermentação. Existem também os sistemas híbridos, que consistem na combinação de mais de uma rota biológica, sendo que muitos estudos focam no sistema híbrido de processos fotossintéticos e fermentativos com o intuito de aumentar os rendimentos totais, em relação à produção de hidrogênio. Os processos fotossintéticos são dependentes de energia luminosa que incluem a biofotólise da água (algas verdes e cianobactérias) e fotofermentação de compostos orgânicos (bactérias fotossintetizantes). Já o processo de fermentação escura, ocorre por meio da fermentação de compostos (DAS e VERZIROGLU, 2001; NANDI e SENGUPTA, 1998; VARDAR-SCHARA, MAEDA e WOOD, 2008).

3.3.1 - Biofotólise

A produção de hidrogênio por meio da biofotólise direta consiste na produção de hidrogênio por algas verdes, sendo a mais amplamente estudada a *Chlamydomonas reinhardtii*, pois são eficientes na produção de H₂ a partir da água. Neste processo a energia solar é diretamente convertida a hidrogênio através de reações fotossintéticas (Equação 3.1). Após o período de anaerobiose e no escuro, onde ocorre a síntese e ativação da hidrogenase, há a produção de hidrogênio (AMORIM, 2009; MANISH e BANERJEE, 2008).



Já na biofotólise indireta, o hidrogênio é produzido por meio de cianobactérias (como por exemplo, a *Anabaena variabilis*) capazes de produzir H₂ através da biofotólise indireta da água. Os processos de biofotólise indireta envolvem a separação das reações de evolução do H₂ e O₂ em fases distintas, através da fixação/evolução do CO₂. As cianobactérias têm as características de utilização do CO₂ no ar, como fonte de carbono e da luz solar como fonte de energia (Equação 3.2). Após produzirem substâncias celulares, as mesmas são utilizadas para a produção de hidrogênio (Equação 3.3) (AMORIN, 2009; MANISH e BANERJEE, 2008).



Esse processo pode ser considerado econômico e sustentável já que a água é um recurso renovável e o CO₂ é um importante poluente atmosférico. A primeira desvantagem deste método refere-se à inibição da atividade da hidrogenase devido à geração de oxigênio proveniente da hidrólise da água durante a fotossíntese. Portanto, o baixo potencial de produção de hidrogênio aliado à impossibilidade do uso de resíduos, como substratos, são desvantagens desse processo (KAPDAN e KARGI, 2006; MANISH e BANERJEE, 2008).

3.3.2 - Produção de hidrogênio por fermentação escura

A fermentação escura é obtida por bactérias fermentativas em que o hidrogênio é formado pela ação de hidrogenases como meio de eliminar os elétrons gerados durante a degradação de carboidratos. Ela é considerada mais vantajosa para a produção de hidrogênio, quando comparada aos processos baseados na fotossíntese, por ser um processo que não necessita da disponibilidade de luz, dispensando, deste modo, configurações mais complexas de biorreatores e não há a limitação da inibição por oxigênio como no caso da rota por biofotólise. Também há uma ampla variedade de compostos orgânicos, resíduos líquidos e materiais celulósicos que pode ser utilizada como substrato (DAS e VERZIROGLU, 2001; GUO et al., 2014).

A Figura 3.1 apresenta um esquema da rota metabólica desenvolvida pelas bactérias fermentativas.

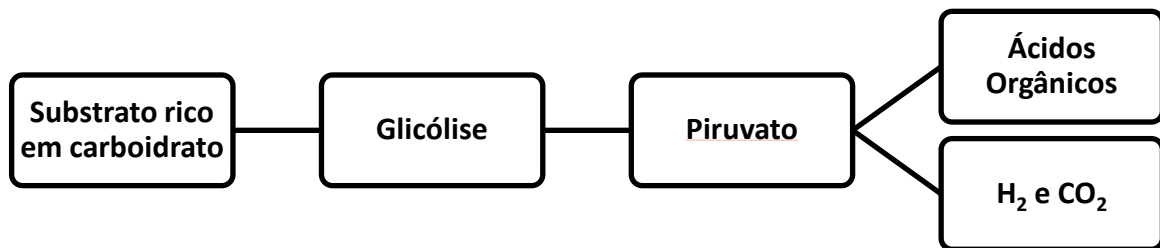
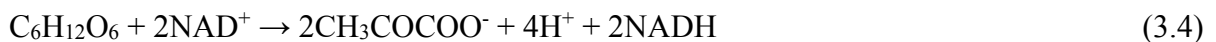


Figura 3.1 - Esquema metabólico de produção de H₂ através das bactérias fermentativas. (Fonte: adaptado de HALLENBECK e GHOSH, 2009).

Os microrganismos produtores de hidrogênio são impulsionados pelo metabolismo anaeróbico do piruvato, formado durante o metabolismo a partir da glicose (Equação 3.4):



Além da formação do piruvato, são formados ATPs e também ocorre a redução de NAD⁺ a NADH que devem ser reoxidados. Nos microrganismos facultativos, têm-se a formação de etanol e, em condições de pH ácido (pH<6), pode ocorrer a formação do lactato. Já nos microrganismos anaeróbicos, a oxidação dos NADHs, proporciona a formação de

etanol, butirato e butanol, algumas rotas podem ser visualizadas na Figura 3.2 (HALLENBECK e GOSH, 2012).

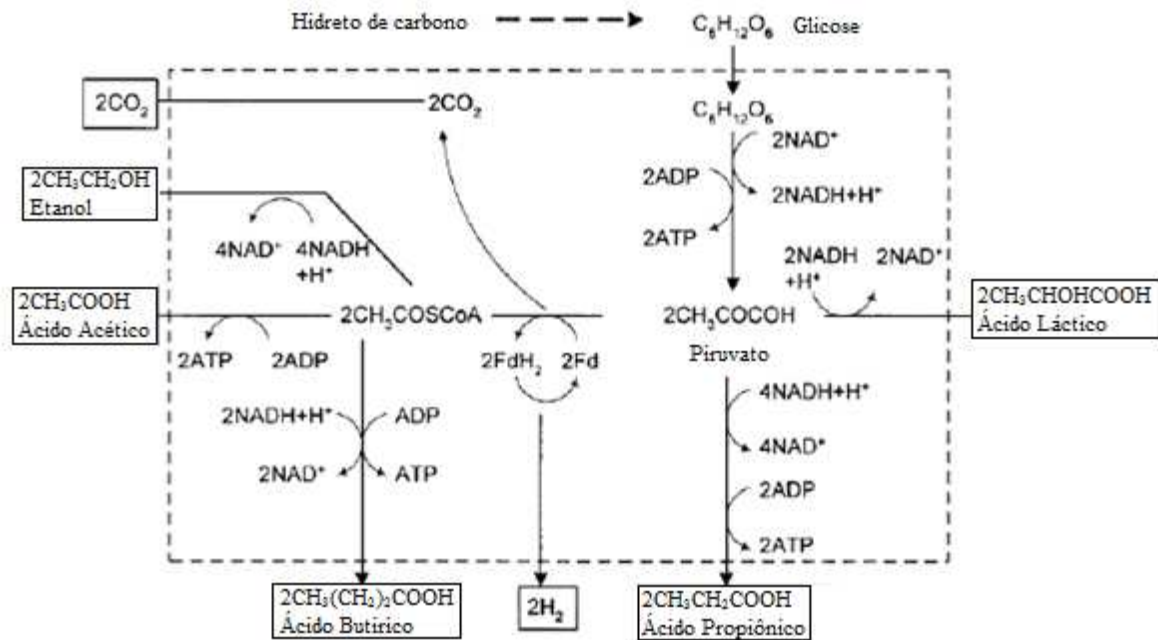


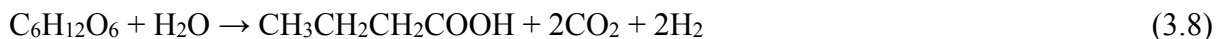
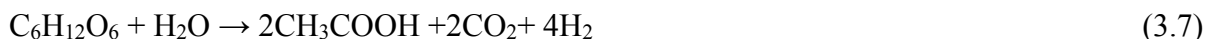
Figura 3.2 - Possíveis rotas metabólicas da fermentação escura de carboidratos. (Fonte: adaptado de REN, WANG e HUANG, 1997).

O acetil-CoA pode ser formado por meio da ação catalítica da piruvato formiato liase (PFL) (Equação 3.5) ou via piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFOR) (Equação 3.6). As rotas dependem da capacidade do microrganismo de realizar as vias metabólicas (HALLENBECK e BENEMANN, 2002).



Os carboidratos são os substratos preferenciais para produzir hidrogênio por fermentação. Além da produção de H_2 ocorre a formação de ácidos orgânicos voláteis (acético, propiônico, láctico, butírico), etanol e butanol.

Segundo Levin, Pitt e Love (2004) os carboidratos são os substratos preferenciais para produção de hidrogênio, sendo a estimativa do rendimento teórico da fermentação a partir do metabolismo da glicose aceitável como referência. Quando o ácido acético é o produto final, o máximo rendimento teórico obtido é 4 mol H_2 /mol glicose (Equação 3.7) e 2 mol H_2 /mol glicose quando o produto final é o butirato (Equação 3.8).



Para uma produção final de etanol + ácido acético, o rendimento é de 2 mol H₂/mol de glicose (Equação 3.9). Obtendo como produto final o ácido propiônico, não há rendimento de hidrogênio, o consumo da glicose juntamente o com o do hidrogênio produz o ácido propiônico (Equação 3.10) (CHONG et al., 2009):



Empregando a lactose, o rendimento da produção de hidrogênio depende da rota fermentativa e dos produtos finais. Na Equação 3.11 e 3.12, pode-se notar que o rendimento teórico de hidrogênio em termos de lactose consumida pode atingir valores de 8 mol H₂/mol lactose e de 4 mol H₂/mol lactose se a rota for de formação do acetato e do butirato, respectivamente (DAVILA-VAZQUEZ et al., 2011).



O uso de substratos simples como glicose e lactose, são preferenciais para a produção de hidrogênio, porém o custo desses substratos torna o processo não tão vantajoso.

3.3.3 - Produção de hidrogênio por bactérias fotossintéticas

A fotofermentação de compostos orgânicos é feita por bactérias fotossintetizantes capazes de degradar a molécula de glicose em CO₂ e H₂ com a utilização de amplo espectro de luz e ausência de oxigênio, sendo as mais estudadas *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodobacter capsulatus* e *Chlorobium vibrioforme*. As nitrogenases são as principais enzimas responsáveis pela fotossíntese nesses microrganismos e os melhores rendimentos de produção de hidrogênio é catalisada em ambiente sem a

presença de nitrogênio. Uma das desvantagens da fotofermentação é que a produção de H₂ pela ação da nitrogenase requer o consumo de ATP, necessitando de uma demanda alta de quantidade de energia para a célula (MATHEWS e WANG, 2009; NI et al. 2006).

O esquema metabólico de produção de H₂ através das bactérias fotossintetizantes está representado na Figura 3.3.

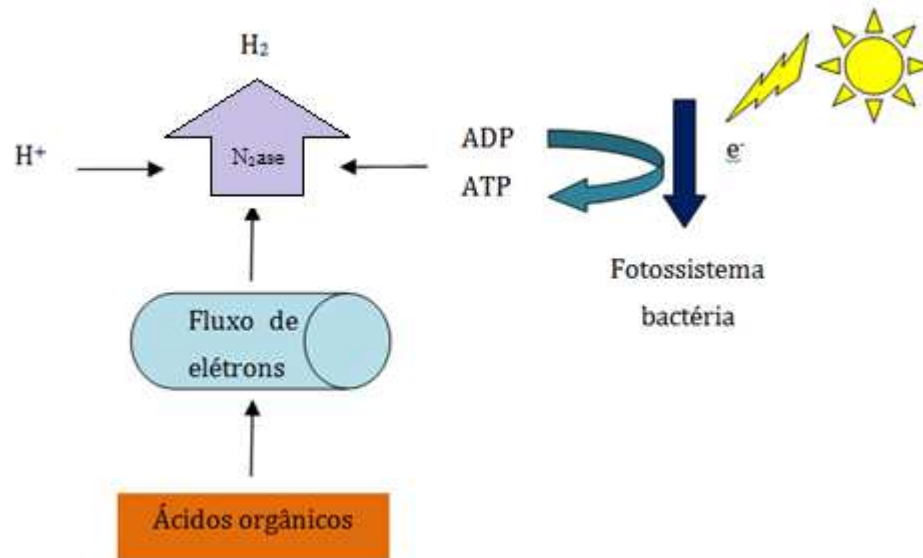


Figura 3.3 - Esquema metabólico de produção de H₂ através das bactérias fotossintetizantes. (Fonte: adaptado de HALLENBECK e GHOSH, 2009).

No processo de produção de H₂ pela fotofermentação destaca-se o uso de ácidos orgânicos como fonte de carbono, sendo assim, uma alternativa para aumentar o rendimento de produção de H₂ é acoplar a fotofermentação como segunda etapa, ao processo de fermentação escura. A fotofermentação tem sido apontada como uma potencial alternativa para aumentar o rendimento da produção de hidrogênio se realizada como etapa posterior à fermentação escura, sendo que os compostos orgânicos produzidos na fermentação com ausência de luz podem ser utilizados como substrato pelas bactérias fotossintetizantes, proporcionando um maior rendimento no final do processo (ARGUN e KARGI, 2011).

Os principais ácidos obtidos na fermentação escura são: ácido acético, láctico, propiônico e butírico. As Equações 3.13 a 3.16 evidenciam a quantidade de mols que são produzidos na conversão total dos ácidos pelas bactérias fotossintéticas.



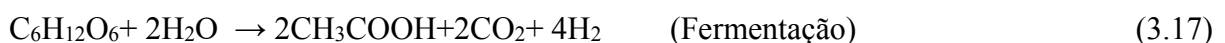


Além dos ácidos orgânicos, as bactérias fotossintéticas têm a capacidade de produzir hidrogênio a partir de açúcares, conforme mostrado em trabalhos que empregaram os açúcares em meios sintéticos ou resíduos agrícolas, como melação de beterraba e em efluentes provenientes da fermentação escura (AFSAR et al., 2011; KESKIN e HALLENBECK, 2012, SILVA et al., 2016; TIAN et al., 2010).

3.3.4 - Produção de hidrogênio por sistemas híbridos

O processo híbrido é um processo que combina fermentação escura e fotofermentação, sendo a associação de bactérias uma opção usada para produção de hidrogênio a partir do consumo de carboidratos. Conforme mencionado anteriormente, a fermentação anaeróbica de resíduos orgânicos produz ácidos orgânicos de baixo peso molecular, que são consumidos pelas bactérias fotossintéticas para a produção de hidrogênio em condição de anaerobiose, com a presença de energia luminosa. Portanto, os sistemas híbridos são constituídos de um sistema de duas fases, um biorreator anaeróbico que gera um efluente para abastecer um fotobiorreator com os subprodutos da digestão anaeróbica (LAZARO, 2009).

Existe dois critérios importantes que são utilizados na avaliação da produção biológica de H_2 a partir de um substrato. O primeiro critério refere-se à velocidade de produção de H_2 , que é obtida com base na concentração de biomassa ou no peso seco bacteriano. O segundo critério, baseia-se na eficiência de conversão do substrato, sendo a razão entre os mols reais de H_2 que foram produzidos, pela quantidade teórica que teria sido obtida se todo o substrato fosse utilizado para produção de H_2 e CO_2 . O rendimento máximo do processo de combinação da fermentação escura e fotofermentação são de 12 mols de H_2 /mol de glicose, conforme indicado pelas Equações 3.17 a 3.19 (DAS e VEZIROGLU, 2008).



Segundo Kim et al. (2006), utilizando *Clostridium butyricum* obteve-se um rendimento de 2,58 mols de H₂/mol de glicose gerando formiato, acetato, propionato e butirato como intermediários. Estes compostos foram então convertidos em hidrogênio pela *R. sphaeroides* resultando em um rendimento total de 8,3 mol de H₂/mol de glicose utilizada.

Já Su et al. (2009) estudaram a produção de H₂ usando um sistema integrado, associando os dois processos. No primeiro estágio, utilizando *C. butyricum* e glicose como substrato, encontrou-se um rendimento de 1,59 mol de H₂/mol de glicose. No segundo estágio, o efluente resultante da digestão anaeróbica, caracterizado principalmente por conter ácido acético e butírico foi inoculado com *R. palustris*, obtendo-se um rendimento total de 4,16 mol H₂/mol glicose.

Em um estudo realizado por Liu et al. (2010) utilizando *C. butyricum* para produção de H₂ usando glicose como substrato e *Rhodopseudomonas faecalis* DLD-53 em um meio cujo substrato foi o efluente da fermentação escura rica em ácido acético e ácido butírico, obteve-se uma produção máxima de H₂ de 122,4 mL H₂ e a velocidade de produção foi de 0,5 mL/mL.dia.

3.4 - Parâmetros que afetam a produção de hidrogênio

Diversos parâmetros podem influenciar a produção biológica de hidrogênio. Dentre esses parâmetros, destaca-se: inóculo, substrato, pH, temperatura, método do tratamento do inóculo e configuração do reator.

3.4.1 - Inóculo

A escolha do inóculo desempenha papel fundamental na seleção de culturas de microrganismos mistas, puras ou co-culturas, para a produção eficiente de hidrogênio.

Diversas culturas puras são usadas na produção biológica de hidrogênio. Em alguns casos a intenção do uso de culturas puras é determinar as características de crescimento, produtos de fermentação e rendimentos de hidrogênio. Uma das principais vantagens de utilização de culturas puras se dá pela possibilidade de manipulação do metabolismo microbiano, por meio do controle das condições de cultivo. As culturas puras são muito sensíveis a contaminações e seu uso demanda aplicação de condições de assepsia. As bactérias fotossintéticas produtoras de hidrogênio mais conhecidas são *R. sphaeroides*,

R. capsulatus, *Rhodobacter sulidophilus*, *Rhodopsuedomonas sphaeroides*, *R. palustris* (NTAIKOU, ANTONOPOULOU e LYBERATOS, 2010).

A utilização de culturas mistas é considerada favorável devido ao controle e à operação do processo que são facilitados pela utilização de meios não estéreis, favorecendo a redução de custo, podendo ser empregadas culturas a partir de fontes naturais, como excreta de solo, lodo de esgoto e de resíduos. A escolha do microrganismo determina a rota metabólica predominante, o que pode afetar fortemente o processo. Existem inúmeros tipos de microrganismos capazes de produzirem hidrogênio em condições anaeróbicas, sendo que as bactérias estritamente anaeróbicas são as mais utilizadas. *Clostridium* são comumente aplicados na fermentação escura, de que destacam-se as espécies *Clostridium acetobutyricum*, *C. butyricum*, *Clostridium tyrobutiricum*, *Clostridium beijerinckii* e *Clostridium thermolacticum* (CHONG et al., 2009).

Outra possibilidade de obtenção de hidrogênio é por meio da utilização de co-culturas como inóculo. Sargsyan et al. (2016) estudaram bactérias fermentativas e fotofermentativas, sendo elas: *Escherichia coli* e *Rhodobacter sphaeroides*, respectivamente e observaram que o rendimento de H₂ da co-cultura nas primeiras 24 horas, foi menor em comparação as culturas puras. Em seguida, a produção de H₂ foi aumentando, obtendo rendimentos maiores que as culturas puras. O rendimento máximo obtido para a co-cultura foi de 5,16 mol de H₂/L.dia.

3.4.2 - Substrato

Diversos substratos têm sido utilizados para a produção fermentativa de hidrogênio, como glicose, sacarose e amido, porém tem um elevado custo, o que não torna o processo viável economicamente. Estudos mais recentes utilizaram resíduos orgânicos como substrato para a produção de hidrogênio. Dentre as matérias-primas destacam-se: resíduos municipais, industriais e agrícolas, como o soro de leite, melaço de cana-de-açúcar, de beterraba e de soja, ricos em açúcares ou ainda outros resíduos ricos em material lignocelulósico, tais como resíduos de destilarias, indústrias de papel e químicas (KOTHARI et al., 2012; SHOW et al., 2012). A produção biológica de hidrogênio empregando esses resíduos, minimiza o acúmulo destes nos processos industriais.

O permeado do soro de leite em pó é um subproduto gerado da produção de queijo e é caracterizado pela sua alta demanda química e biológica de oxigênio, sendo composto de lactose, proteínas solúveis, lipídeos e sais minerais. O melaço de soja é um co-produto, obtido

na extração protéica da soja, com alta concentração de açúcares como: glicose, frutose, sacarose, rafinose, estaquiose e galactose (SIQUEIRA, 2007).

Estudos de Venetsaneas et al. (2009) estudaram a produção de hidrogênio em fermentação escura, utilizando o soro de queijo como substrato em um reator CSTR. A produção obtida pelos autores foi de 1,9 L H₂/L.dia. Avcioglu et al. (2011) avaliaram a produção de hidrogênio em um sistema híbrido, utilizando o efluente de fermentação escura com melão como substrato seguida de fotofermentação por *R. capsulatus*. A produtividade máxima obtida pelos autores foi de 0,50 mmol H₂/L.h. Estudos de produção de hidrogênio utilizando o melão de soja como substrato ainda não foram localizados na literatura.

3.4.3 - pH

O controle do pH é extremamente importante, uma vez que influencia diretamente a velocidade de produção de hidrogênio e a ação dos microrganismos consumidores de hidrogênio. Ao longo das fermentações ocorre queda do pH devido ao aumento da concentração de ácidos orgânicos que são formados durante o processo fermentativo. O valor ótimo de pH possui influência na atividade das bactérias acidogênicas, pois estão diretamente ligadas a ação da enzima hidrogenase e na rota metabólica de degradação da matéria orgânica. A faixa ótima de pH estudada para a enzima hidrogenase é de 5,0 – 6,5. Estudos de Espinoza-Escalante et al. (2009) verificaram que em um reator semi-contínuo o valor ótimo de pH foi de 5,5 para a produção de hidrogênio, estando dentro da faixa, favorecendo a atividade das hidrogenases durante o processo de digestão anaeróbica (FANG e LIU, 2002; LI e FANG, 2007).

Por outro lado, para a produção de hidrogênio por fotofermentação os microrganismos empregados produzem hidrogênio em um processo catalisado pela enzima nitrogenase, sob limitação de nitrogênio. As bactérias púrpuras não sulfurosas (PNS) apresentam elevados rendimentos teóricos de conversão de substrato em hidrogênio e não produzem oxigênio, que é inibidor da nitrogenase. O íon amônio (NH₄⁺) inibe a síntese de nitrogenase, promovendo a formação da glutamina sintetase, responsável pela assimilação de NH₄⁺, inibindo desta forma a síntese de H₂ (SEIFERT, WALIGORSKA e LANIECKI, 2010).

Waligórska et al. (2009) estudaram os efeitos de íons NH₄⁺ na produção de H₂ por *R. sphaeroides* e observaram que o aumento na concentração de 1 para 5 mmol/L de NH₄⁺ resultou em um declínio na produção de H₂.

3.4.4 - Temperatura

A temperatura é um fator que influencia as atividades dos microrganismos produtores de hidrogênio. Diversos trabalhos demonstram que o aumento da temperatura pode conduzir a um aumento da produção de hidrogênio, já as temperaturas mais elevadas podem conduzir a uma diminuição do rendimento das bactérias produtoras de hidrogênio (LOGAN et al., 2002; VAN GINKEL, SUNG e LAY, 2001).

As faixas ótimas de temperatura relatadas na literatura para a produção fermentativa de hidrogênio não tem sido sempre as mesmas, em virtude do inóculo empregado. Segundo os estudos de Wang e Wan (2008) foi verificado que o efeito da temperatura na produção de hidrogênio em processo batelada utilizando um consórcio microbiano e glicose como substrato. Os autores observaram que o aumento da temperatura de 25 a 40 °C afetou positivamente no rendimento de hidrogênio. Já O-Thong et al. (2008) investigaram a produção de hidrogênio utilizando *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* em uma faixa de temperatura estudada de 40 a 80 °C. Estes autores verificaram que a temperatura ótima foi 60 °C. Com relação aos trabalhos de fotofermentação, há maior número de relatos que apontam 30 °C como a temperatura ótima, como no estudo de Sevinc et al. (2012) que avaliaram a produção de H₂ por fotofermentação utilizando *R. capsulatus*, empregando como substrato os ácidos acético e láctico em temperaturas de 20, 30 e 38 °C. Os autores verificaram que a máxima produtividade obtida foi de 0,5 mmol H₂/L.h na temperatura de 30 °C.

3.4.5 - Tratamento do inóculo

No caso específico da fermentação escura usando consórcio microbiano, com o intuito de atingir um alto rendimento de produção de hidrogênio, uma consideração fundamental é impedir o crescimento de microrganismos metanogênicos consumidores de hidrogênio. Os principais métodos para enriquecer as culturas produtoras de hidrogênio são o tratamento térmico, ácido, químico e alcalino que inativam as bactérias não formadoras de esporos, tais como as metanogênicas, favorecendo, deste modo, uma elevação na produção de hidrogênio (LUO et al., 2010).

Os tratamentos térmico e ácido são os mais relatados na literatura por obter melhores resultados na produção de hidrogênio. Oh, Ginkel e Logan (2003), compararam os

tratamentos térmico e ácido para a produção de hidrogênio e foi observado que o tratamento térmico promoveu um maior rendimento de produção de hidrogênio quando comparado ao tratamento ácido do inóculo. Mohammadi et al. (2011) realizou um pré-tratamento térmico no inóculo a 100 °C por 60 min e um pré-tratamento ácido. O pH do inóculo foi ajustado para 3,0 com adição de HCl e mantido a durante 24 horas e, posteriormente, ajustando de volta para pH 5,5 com adição de NaOH. O pré-tratamento térmico demonstrou ser o mais eficaz no aumento da produção de H₂. A produção acumulada de H₂ a partir deste método foi de 8,89 mmol e para o pré-tratamento ácido foi obtido 5,1 mmol.

3.4.6 - Configuração do reator e modo de operação

Com relação ao modo de operação, segundo estudos de Ntaikou, Antonopoulou e Lyberatos (2010) o processo em batelada apresenta maiores rendimentos de H₂ quando comparado ao modo contínuo. Isto pode ser atribuído ao microambiente substancialmente diferente no reator em batelada quando comparado aos reatores contínuos. Lin e Cheng (2006) avaliaram a produção de H₂ a partir de uma cultura mista utilizando xilose como substrato e obtiveram rendimento de 2 mol de H₂/mol de xilose para os testes em batelada e 0,7 mol de H₂/mol de xilose operando em sistema contínuo. Maior rendimento para sistema batelada também foi observado por Lin e Lay (2004), produziram H₂ utilizando sacarose como substrato e obtiveram maiores rendimentos de H₂ para os testes em batelada, 2,66 mol de H₂/mol de sacarose, do que em um reator do tipo CSTR, 1,73 mol de H₂/mol de sacarose. Silva et al. (2016) avaliaram a produção de hidrogênio em processo de batelada alimentada por fotofermentação a partir de *R. capsulatus* usando efluente de fermentação escura como substrato. A produtividade alcançada foi de 208,40 mmol H₂/L.dia.

CAPÍTULO 4

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Substrato

Os substratos empregados nas fermentações foram glicose PA, permeado de soro de leite em pó e melaço de soja. O permeado de soro de leite em pó (Figura 4.1.a) foi adquirido da empresa Sooro Concentrado Indústria de Produtos Lácteos Ltda. O melaço de soja é um resíduo gerado do processo de extração protéica da soja que foi cedido pela empresa de processamento de soja Selecta-Araguari – MG (Figura 4.1.b).

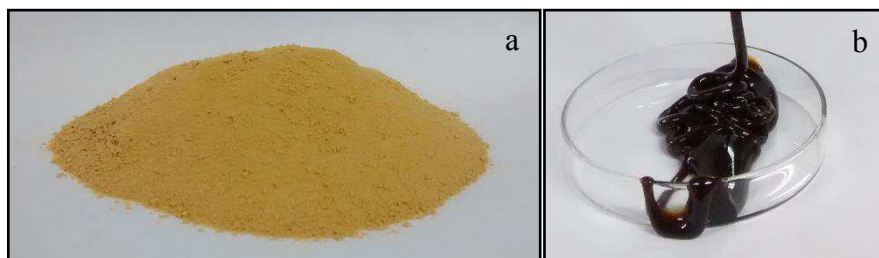


Figura 4.1 - a: Permeado do soro de leite em pó; b: Melaço de soja.

4.2 - Inóculo

Nos ensaios fermentativos utilizou-se uma cultura mista como inóculo. Já nos ensaios fotofermentativos duas culturas de bactérias púrpuras não sulfurosas (PNS) foram utilizadas nos testes que empregam culturas puras ou co-culturas. A cultura mista utilizada foi proveniente do laboratório do Nubio (Núcleo de Processos Biotecnológicos) que consistia em um consórcio microbiano, o qual foi adaptado em um meio sintético com a seguinte composição: 3 g/L de KH_2PO_4 , 7g/L de K_2HPO_4 , 1 g/L de MgSO_4 , 3g/L de extrato de levedura, 1 g/L de extrato de carne, 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 20 g/L de lactose oriunda do permeado do soro de leite em pó. Gás Nitrogênio foi borbulhado por 3 min no inóculo com o objetivo de manter o mesmo em ambiente anaeróbico. O armazenamento do inóculo foi feito em frascos de 500 mL, em temperatura ambiente (Figura 4.2). Através da técnica de isolamento foi possível identificar três gêneros: *Clostridium sp.*, *Lactobacillus sp.* e *Enterobacter sp.* (ROMÃO et al., 2014).



Figura 4.2 - Inóculo de cultura mista utilizado para produção de hidrogênio.

As culturas puras utilizadas foram cepas de bactérias fotossintetizantes liofilizadas *R. palustris* e *R. capsulatus*, adquiridas da DSMZ (*German Collection of Microorganisms and Cell Culture*), coleção alemã de micro-organismos e cultura de células, no qual foram empregadas nos ensaios de fotofermentação.

O cultivo das bactérias fotossintetizantes foi realizado em meio basal RCV (WEAVER; WALL e GEST, 1975), preparado pela dissolução dos itens relacionados nas Tabelas 4.1 e 4.2. Gás Argônio foi borbulhado por 3 min no inóculo com o objetivo de manter o mesmo em ambiente anaeróbico. Os frascos foram mantidos em câmara de germinação a 30 ± 1 °C, sob iluminação de 2200 lux (Figura 4.3). A cada 10 dias, as células foram centrifugadas a 8000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento obtido ressuspenso em novo meio de cultura.

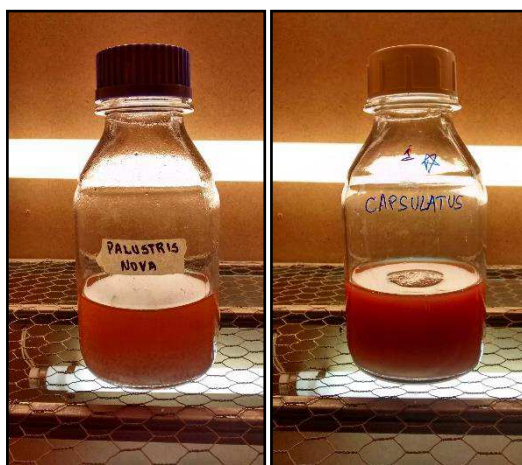


Figura 4.3 - Inóculo em meio líquido da cepa *R. palustris* e *R. capsulatus*.

Tabela 4.1 - Componentes do meio RCV.

Reagente	Concentração (g/L)
Ácido Málico	4,02
KH ₂ PO ₄	0,60
K ₂ HPO ₄	0,90
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,12
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,075
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,02
Micronutrientes	1 mL
Tiamina	0,001
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,00

Tabela 4.2 - Composições da solução de micronutrientes utilizada no meio RCV.

Reagente	Concentração (g/L)
H ₃ BO ₃	2,80
MnSO ₄ H ₂ O	1,59
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0,75
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,24
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,075
CuCl ₂ 2H ₂ O	0,05

4.3 - Processo fermentativo em escala reduzida

Foram realizados testes preliminares para verificar a produção de biogás com a cultura mista após pré-tratamento do inóculo (fermentação escura), com a cultura pura de forma isolada e com a co-cultura (fotofermentação), de acordo com a Figura 4.4.

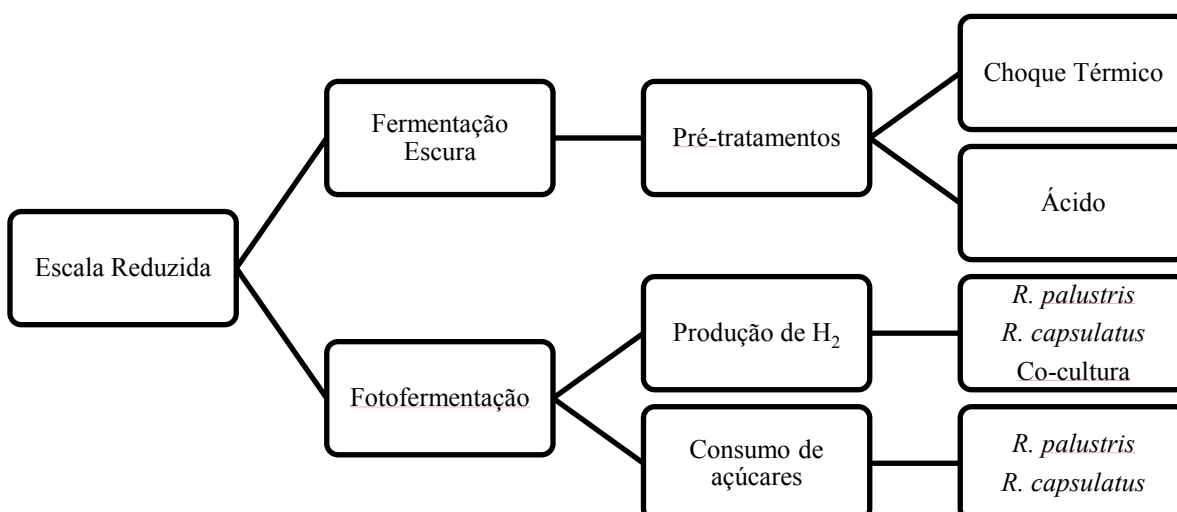


Figura 4.4 - Esquema dos ensaios em escala reduzida (50 mL)

Os testes foram realizados em biorreatores (frascos de penicilina) de 50 mL, volume reacional de 37,5 mL (32,5 mL de meio a ser fermentado e 5 mL de inóculo) e 12,5 mL de *headspace* em triplicata. Os frascos de penicilina foram selados com um septo de borracha butílica e uma espessa cápsula de alumínio. As fermentações foram conduzidas em batelada, à temperatura ambiente, sem controle de pH e em anaerobiose. A fermentação escura ocorreu em um período de cinco dias e na ausência de luz com o pH inicial de 7,0, já a fotofermentação em um período de 3 dias sob intensidade luminosa de 2200 lux e pH inicial de 6,8 (ROMÃO et al., 2014; SILVA et al., 2016).

4.3.1 - Ensaio de fermentação escura

O volume reacional no processo fermentativo constituiu de inóculo e de meio sintético, cuja composição foi a seguinte: 3 g/L de KH_2PO_4 , 7 g/L de K_2HPO_4 , 1 g/L de MgSO_4 , 3 g/L de extrato de levedura, 1 g/L de extrato de carne 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Para manter o sistema anaeróbio, borbulhou-se nitrogênio após a inoculação do meio para a retirada do oxigênio dissolvido.

Nos ensaios 1 e 2 da fermentação escura foram testou-se dois tipos de pré-tratamento do inóculo: ácido e o choque térmico, sendo que as condições usadas foram baseadas nos trabalhos de Chang, Li e Liu (2011). No pré-tratamento ácido, adicionou-se ácido clorídrico (1 M) até pH igual 3,0 e deixou por um período de 24 horas. Em seguida, o pH do meio foi ajustado para 6,8 com NaOH (1 M). O segundo pré-tratamento consistiu no choque térmico, manteve-se o inóculo a 100 °C por 30 min e, posteriormente, colocou-se em banho de gelo. Os dois inóculos tratados foram utilizados nos ensaios de fermentação escura usando a lactose proveniente do permeado do soro de leite em pó como substrato com concentração total de açúcar de 10 g/L. Utilizou-se uma porcentagem de inóculo de 1,6 % v/v.

Ao final do processo fermentativo avaliou-se o crescimento celular e a produção de metabólitos. Durante o processo fermentativo o biogás produzido foi coletado em seringas de 10 mL graduadas e ao final da fermentação, o gás foi transferido para ampolas gasométricas para posterior análise da composição do biogás.

4.3.2 - Ensaio de fotofermentação

Nos ensaios 3, 4 e 5, utilizando as culturas puras, o meio reacional consistia de inóculo e de meio sintético (RCV), cuja composição está apresentada na Tabela 4.1. Após a

inoculação, o frasco foi purgado com gás Argônio durante 3 min para garantir condições de anaerobiose. Frascos de sacrifícios foram utilizados sendo que, em intervalos de tempo definidos, um frasco foi utilizado para análise da composição do meio fermentativo e do biogás.

No ensaio 3 buscou-se verificar a produção de hidrogênio na fotofermentação com as culturas puras de forma isolada e com a co-cultura utilizando o meio sintético e lactose proveniente do permeado do soro de leite em pó como substrato com concentração de 10 g/L.

Os ensaios 4 e 5 foram realizados para verificar o consumo dos açúcares do melaço de soja (5 g/L) durante a fotofermentação com as culturas puras de forma isoladas.

4.4 - Processo fermentativo em escala ampliada: Reator anaeróbico de tanque agitado

Definidas as condições ótimas para produção de biohidrogênio, realizou-se um ensaio em um reator com capacidade de 1,5 L com volume reacional de 700 mL. Neste ensaio avaliou-se a produtividade e a conversão de hidrogênio com o tempo. As melhores condições de fermentação escura determinadas por Romão et al. (2014) foram temperatura de 30 °C e pH inicial do meio igual a 7 e composição com 1,6 % (v/v) de inóculo. A temperatura dos experimentos foi de 30 ± 1 °C, na ausência de luz e com agitação de 130 rpm. Neste estudo, utilizou-se o inóculo pré-tratado termicamente a 100 °C por 30 min, conforme resultados obtidos previamente (Item 5.1.1). Ao longo do ensaio permitiu-se a queda do pH até o valor de 5,5 e este valor foi controlado até o final do processo por adição de solução de NaOH (0,1 M).

O biogás produzido foi quantificado por um medidor de vazão volumétrica MilliGas-Counter da Ritter Tipo MGC-1. De modo a haver volume de biogás suficiente a ser determinado pelo medidor MilliGas-Counter, a tubulação foi bloqueada e, somente após um intervalo de tempo (12 - 14 h) de fermentação, liberou-se a passagem de gás na primeira amostragem. Para as medidas subsequentes, com o intuito de manter a pressão positiva no interior do biorreator, a tubulação foi bloqueada após cada amostragem.

Para os ensaios em escala ampliada, amostras foram retiradas periodicamente, durante o ensaio de fermentação para o acompanhamento do crescimento celular e da produção de metabólitos. Para cada amostra, mediu-se a concentração celular por absorbância e, em seguida, esta amostra foi centrifugada durante 10 min a 8000 rpm. O sobrenadante foi coletado para posterior análise por cromatografia líquida.

As amostras gasosas foram armazenadas em ampolas gasométricas (Construmaq LTDA, Brasil) até a análise da composição do biogás. A Figura 4.5 mostra o Módulo Fermentador Tec-Bio-Flex, Tecnal[®], equipado com agitador mecânico e com controle de temperatura, utilizado nos testes de fotofermentação com o fotoperíodo. Nos testes de fermentação escura, empregou-se o mesmo módulo, retirando-se o sistema de iluminação.



Figura 4.5 - Unidade experimental

Foram realizados testes no biorreator com o propósito de aumentar a escala de produção de biohidrogênio, assim como verificar o comportamento do consumo de açúcares e de produção e consumo de metabólitos no decorrer do processo de fermentação escura. Em todos ensaios, a concentração inicial de açúcares totais foi de 20 g/L, havendo adição periódica para ajustar a concentração para 10 g/L após ser detectado o consumo do açúcar. Desta forma, testaram-se as seguintes condições:

Condição 1: Avaliação da fermentação escura utilizando lactose proveniente do permeado do soro de leite em pó como substrato;

Condição 2: Avaliação da fermentação escura utilizando glicose como substrato;

Condição 3: Avaliação da fermentação escura utilizando como substrato lactose proveniente do permeado do soro de leite em pó e glicose de forma alternada;

Condição 4: Avaliação da fermentação escura utilizando como substrato lactose proveniente do permeado do soro de leite em pó e glicose de forma simultânea;

4.5 - Métodos analíticos

4.5.1 - Quantificação do crescimento celular

A quantificação do crescimento celular foi feita pela análise de absorvância do meio fermentativo no espectrofotômetro modelo Shimadzu UVmini-1240 a um comprimento de onda de 650 nm, sendo convertido em concentração de células (g/L) por meio de uma curva de calibração previamente estabelecida correlacionando a leitura de absorvância com a massa seca de células.

4.5.2 - Quantificação de açúcares e metabólitos formados durante as fermentações

As análises das concentrações dos açúcares e dos metabólitos formados foram realizadas por HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (Figura 4.6), marca Shimadzu modelo LC-20A Prominence, coluna SUPELCOGEL C-610H. Empregou-se como fase móvel ácido fosfórico (0,1 %), com fluxo de 0,5 mL/min, temperatura do forno 32 °C e volume de injeção de 20 µL. As concentrações de açúcares e ácidos foram calculados com auxílio de curvas padrão realizadas previamente.



Figura 4.6 - Cromatógrafo utilizado na análise dos metabólitos formados e na quantificação de açúcares.

4.5.3 - Quantificação de hidrogênio

O gás produzido foi coletado em seringas graduadas e sua composição determinada através de cromatografia gasosa utilizando Cromatógrafo Shimadzu modelo GC 17-A (Figura 4.7), equipado com um detector de condutividade térmica e uma coluna capilar Carboxen 1010 (comprimento 30 m, diâmetro interno de 0,53 mm). O Argônio foi utilizado como gás de arraste. As temperaturas do injetor, da coluna e do detector durante as análises foram 230 °C, 30 °C e 230 °C, respectivamente. Os valores obtidos de hidrogênio foram quantificados com o auxílio da curva de calibração.



Figura 4.7 - Cromatógrafo utilizado para análise do biogás formado.

4.6 - Conversão

O rendimento em mol de hidrogênio por mol de substrato consumido foi calculado segundo a Equação 4.1.

$$\text{Conversão} = \frac{\text{mol H}_2}{\text{mol de substrato consumido}} \quad (4.1)$$

4.7 - Produtividade

O cálculo da produtividade, em relação ao hidrogênio produzido foi feita utilizando-se a Equação 4.2.

$$\text{Produtividade} = \frac{\text{mmol H}_2}{\text{volume reacional} \cdot \text{tempo de fermentação}} \quad (4.2)$$

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Ensaios em escala reduzida

5.1.1 - Ensaios de fermentação escura: Pré-tratamentos do inóculo

Nos ensaios 1 e 2 da fermentação escura o consórcio microbiano foi submetido previamente ao pré-tratamento de choque térmico ou pré-tratamento ácido e, em seguida, a cultura mista foi empregada no ensaio utilizando a lactose proveniente do permeado do soro de leite em pó como substrato com concentração de 10 g/L. Os resultados dos testes estão apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Composição final da fermentação escura usando a lactose proveniente do permeado do soro de leite em pó como substrato em diferentes pré-tratamentos do inóculo

Pré-tratamento	Produtividade (mmol H ₂ /L.dia)	Conversão (mol H ₂ /mol de hexose)	Ácido Lático (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Ácido Propiônico (g/L)	Ácido Butírico (g/L)
Ácido	10,92	0,75	0,31	1,43	0,47	3,29
Choque térmico	14,13	0,99	0,00	1,60	0,39	4,12

Analisando os resultados dos dois primeiros ensaios usando a lactose proveniente do permeado do soro de leite em pó como substrato, observa-se que o melhor resultado foi obtido ao se empregar o inóculo tratado termicamente, com uma produtividade de 14,13 mmol H₂/L.dia e conversão de 0,99 mol H₂/mol de hexose. Para os pré-tratamentos de choque térmico e ácido, o consumo de açúcar na fermentação foi de 98,95% e 99,68%, respectivamente. Independente do tipo de inóculo usado, os principais metabólitos produzidos durante o ensaio foram os ácidos butírico em maior quantidade (superior a 3 g/L) e, em seguida, o acético (cerca de 1,5 g/L), sugerindo deste modo a fermentação predominantemente do tipo butírica para os dois pré-tratamentos. A formação dos ácidos acético e butírico, segundo Saady (2013), ocorrem de acordo com a estequiometria, a partir da lactose, indicada nas Equações 3.7 e 3.8, e deve-se ressaltar que as rotas metabólicas produtoras destes ácidos levam à formação de hidrogênio.

Como pode ser observado na literatura, o pré-tratamento ótimo difere para cada estudo, podendo estar associado a inúmeros fatores, tais como, tipo de inóculo utilizado, condições experimentais durante o pré-tratamento e a fermentação. Na maioria dos estudos, o pré-tratamento de choque térmico garantiu melhores resultados (ARGUN e KARGI, 2009;

GARCÍA-PENÃ et al., 2009; ROSSI et al., 2011). Estes dados corroboram com as informações descritas na literatura referente a trabalhos que também testaram diferentes pré-tratamentos no inóculo com o intuito de inativar microrganismos consumidores de hidrogênio com o intuito de aumentar a sua produção.

Estudos de Ren et al. (2008) testaram os pré-tratamentos térmico, ácido, alcalino e de aeração em cultura mista utilizando glicose como substrato. Os autores observaram que pré-tratamento alcalino não inibiu a atividade metanogênica, ao contrário do que foi observado nos pré-tratamentos térmico, ácido e de aeração. O rendimento máximo de H₂ (1,96 mol de H₂/mol de glicose) foi obtido para o pré-tratamento de aeração. Estudos de Mu, Yu e Wang (2007) testaram os pré-tratamentos térmico, ácido e alcalino para inibição da atividade metanogênica em cultura mista. Os autores observaram que o maior rendimento de H₂ foi obtido para inóculo pré-tratado termicamente, enquanto o menor rendimento foi obtido para o inóculo com pré-tratamento alcalino, 2 mol de H₂/mol de glicose e 0,48 mol de H₂/mol de glicose, respectivamente.

5.1.2 - Ensaio fotofermentação: Culturas puras e sistema de co-cultura com meio RCV suplementado com ácido málico e lactose

No ensaio 3 verificou-se a produção de hidrogênio da fotofermentação com as culturas puras de *R. palustris* e de *R. capsulatus* e o sistema de co-cultura dessas cepas, na presença do ácido málico que é a fonte de carbono do meio RCV, meio em que as cepas são mantidas e como substrato foi utilizado a lactose proveniente do permeado do soro de leite em pó. As concentrações iniciais de ácido málico e lactose foram de 3,54 g/L e 9,65 g/L, respectivamente. Os resultados da composição final de lactose e ácidos orgânicos estão apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Composição final da lactose, etanol e ácidos orgânicos para diferentes culturas em ensaios de fotofermentação.

Cultura	Lactose (g/L)	Ácido Málico (g/L)	Ácido Láctico (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Ácido Propiônico (g/L)	Etanol (g/L)
<i>R. palustris</i>	1,54	1,80	2,02	0,35	0,02	0,68
<i>R. capsulatus</i>	0,56	1,53	2,53	0,42	0,02	0,76
Co-cultura	6,41	1,62	3,80	1,08	0,03	0,40

A análise da Tabela 5.2, mostra que os valores de produtividade encontrados para *R. palustris*, *R. capsulatus* e co-cultura foram de 3,24, 2,60 e 0,31 mmol H₂/L.dia,

respectivamente. Considerando o consumo somente da lactose como fonte de carbono nos cálculos da conversão, os valores determinados foram de 0,80, 0,57 e 0,16 mol H₂/mol de lactose para *R. palustris*, *R. capsulatus* e co-cultura. Sabendo que a concentração média de lactose foi de 9,65 g/L e com as concentrações de lactose finais apresentadas na Tabela 5.2, observa-se que o consumo de lactose para o sistema de co-cultura foi somente de 31 %, enquanto que para a *R. palustris* e *R. capsulatus*, o consumo de lactose foi de 84 e 94 %, respectivamente. Pelos dados de produtividade e conversão, conclui-se que a cepa *R. palustris* apresentou resultados melhores do que a cepa *R. capsulatus* e que o sistema de co-cultura apresentou resultados inferiores.

5.1.3 - Ensaio de fotofermentação: Avaliação do consumo dos açúcares presente no melão de soja em sistema de cultura pura

Os ensaios 4 e 5 foram realizados para verificar o consumo dos açúcares presentes no melão de soja, sendo eles: estaquiose, rafinose, sacarose, glicose e frutose. Na fotofermentação com as culturas puras *R. palustris* e *R. capsulatus*, utilizando o meio RCV, mantendo também presente o ácido málico que é fonte de carbono deste meio. A concentração inicial de açúcares totais provenientes do melão de soja foi de 7,11 g/L.

Os resultados de produtividade de hidrogênio, concentração de células, de metabólitos e de variação de pH são apresentados na Figura 5.1 a 5.7.

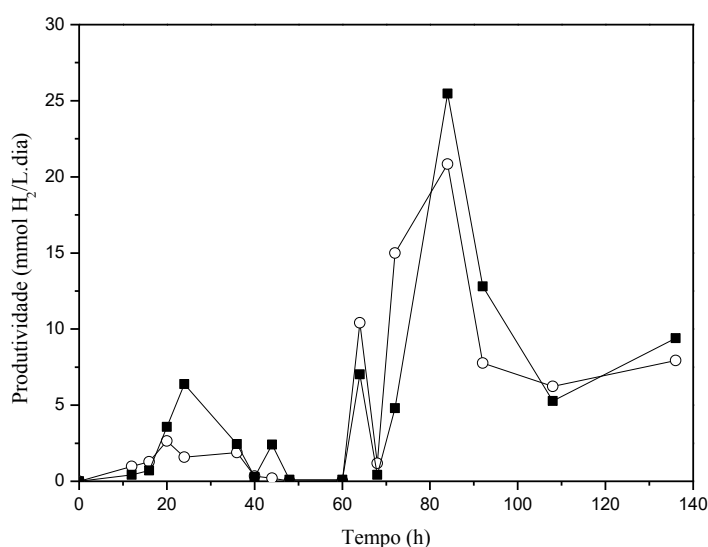


Figura 5.1 - Perfil de produtividade (mmol H₂/L.dia) empregando o melão de soja como substrato na fotofermentação: *R. palustris* (■); *R. capsulatus* (○).

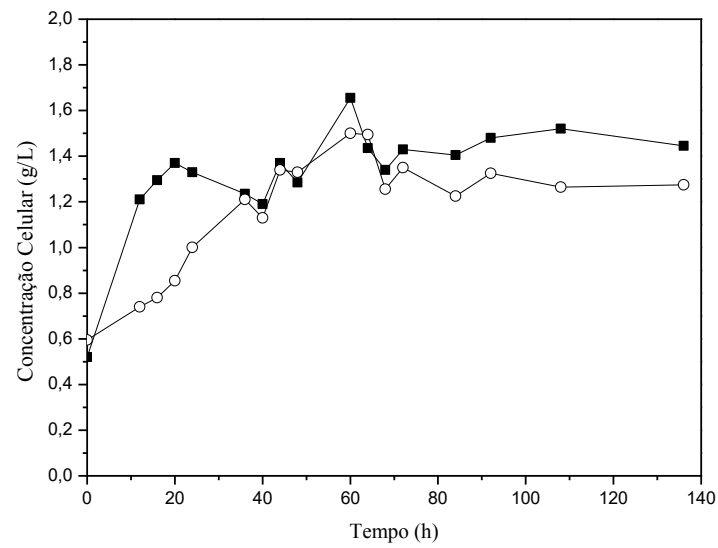


Figura 5.2 - Perfil de concentração celular (g/L) empregando o melão de soja como substrato na fotofermentação: *R. palustris* (■); *R. capsulatus* (○).

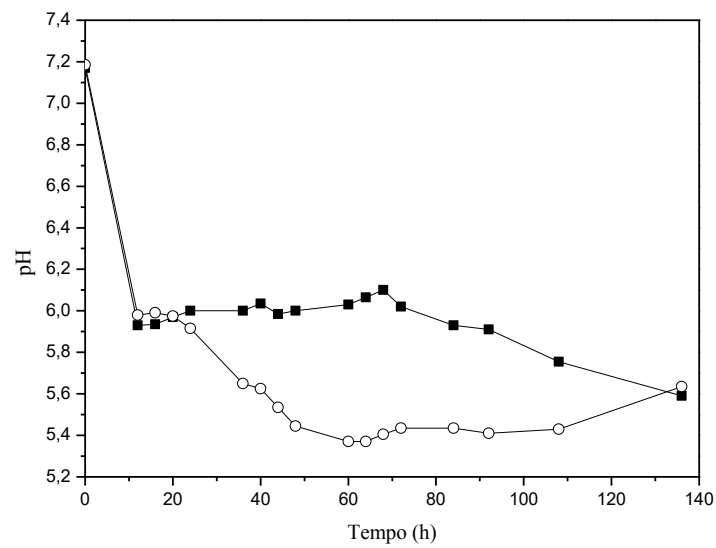


Figura 5.3 - Perfil de pH, empregando o melão de soja como substrato na fotofermentação: *R. palustris* (■); *R. capsulatus* (○).

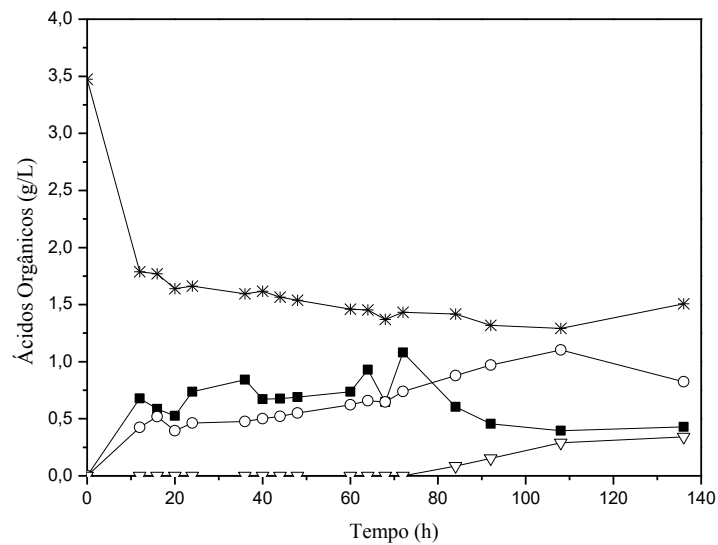


Figura 5.4 - Perfil de concentração dos ácidos orgânicos, empregando o melaço de soja como substrato na fotofermentação por *R. palustris*: (ácido lático (■), ácido acético (○), ácido butírico (▽), ácido málico (*)).

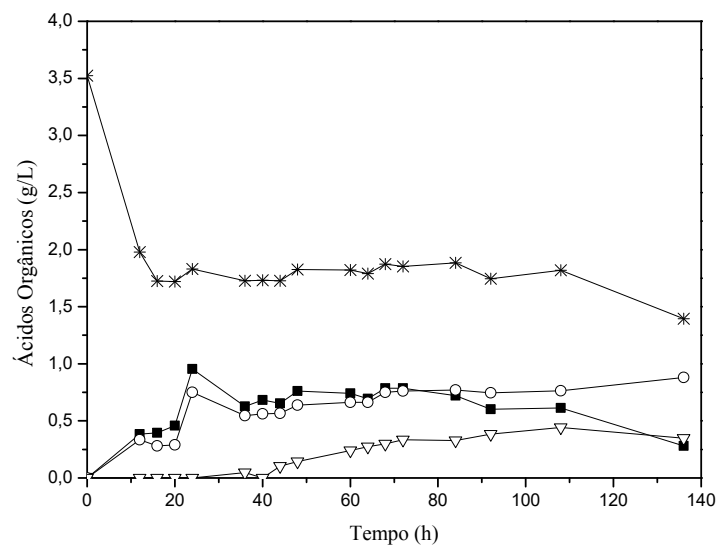


Figura 5.5 - Perfil de concentração dos ácidos orgânicos, empregando o melaço de soja como substrato na fotofermentação por *R. capsulatus*: (ácido lático (■), ácido acético (○), ácido butírico (▽), ácido málico (*)).

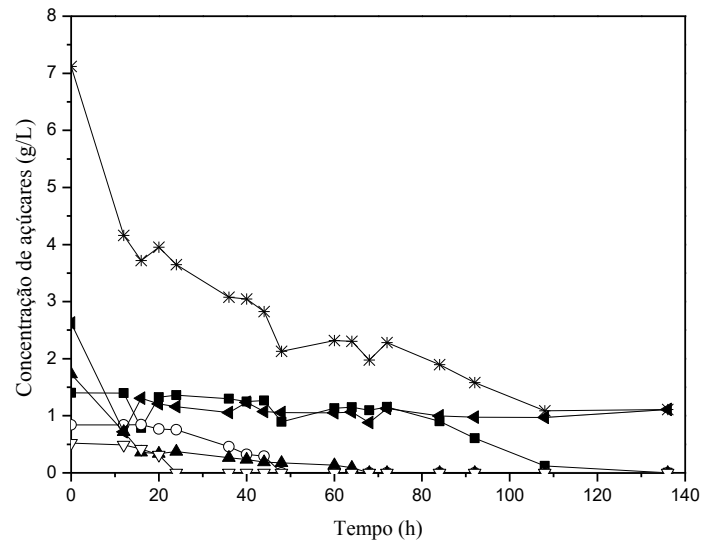


Figura 5.6 - Perfil de concentração dos açúcares que compõem o melaço de soja durante a fotofermentação por *R. palustris*: (estaquiose (■), rafinose (○), sacarose (▲), glicose (▽), frutose (◄), açúcar total (*)).

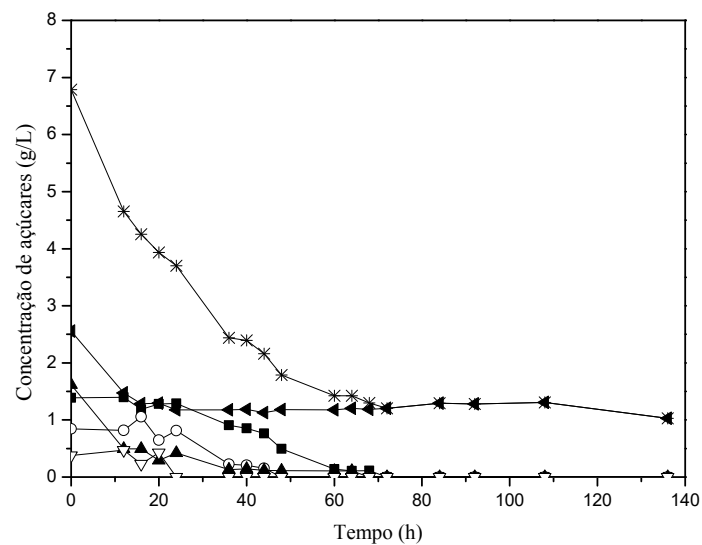


Figura 5.7 - Perfil de concentração dos açúcares que compõem o melaço de soja durante a fotofermentação por *R. capsulatus*: (estaquiose (■), rafinose (○), sacarose (▲), glicose (▽), frutose (◄), açúcar total (*)).

Observa-se pela Figura 5.1, que ambas as cepas possuem o mesmo potencial para produção de hidrogênio por fermentação. As produtividades máximas encontradas foram de 25,46 e 20,83 mmol H₂/L.dia para *R. palustris* e *R. capsulatus*, respectivamente, no tempo

de 84 horas de fotofermentação. Verifica-se que a produção de hidrogênio se iniciou no tempo de 60 horas, podendo ser justificado pela adaptação da cepa aos diferentes tipos de açúcares encontrados no melaço de soja.

Na Figura 5.2 tem-se o perfil da concentração celular durante o ensaio de fotofermentação. Inicialmente a *R. palustris* teve um crescimento maior quando comparado com a *R. capsulatus*. A partir do tempo de 40 horas, as concentrações celulares de ambas cepas permaneceram na mesma faixa, de 1,2 a 1,7 g/L.

Os ensaios foram realizados em frascos de sacrifício (biorreator), sendo que cada um foi analisado em diferentes tempos, porém o pH não foi corrigido. Pela Figura 5.3, nota-se que o pH ao final é de 5,6 e 5,4 para *R. palustris* e *R. capsulatus*, respectivamente. Este fato ocorreu devido a produção de ácidos pelas cepas. Esses valores de pH são inferiores ao pH ótimo da nitrogenase que é de 6,8.

Nas Figuras 5.4 e 5.5 observa-se o perfil da concentração dos metabólitos. A concentração do ácido málico, que já estava presente no meio RCV, variou de 3,52 g/L para 1,39 g/L para *R. palustris*, correspondendo a 60 % de consumo. Para o ensaio com *R. capsulatus* o consumo foi de 63 %, variando de 3,47 g/L para 1,29 g/L. Os resultados mostram que durante a fotofermentação houve a produção de ácidos acético, butírico e láctico.

Observando a Figura 5.4 que corresponde ao ensaio com a cepa *R. palustris*, nota-se que o ácido acético foi produzido até o tempo de 108 horas, após esse tempo ele foi consumido apresentando uma concentração final de 0,82 g/L. Já o ácido láctico foi produzido até o tempo de 72 horas, obtendo uma concentração de 1,08 g/L. Após esse período ele foi consumido, chegando a 0,43 g/L. A produção do ácido butírico foi iniciada no tempo de 84 horas, atingindo uma concentração de 0,34 g/L ao final da fotofermentação.

Na Figura 5.5 observa-se perfil semelhante para a cepa *R. capsulatus*. O ácido acético foi produzido durante todo ensaio, obtendo uma concentração final igual 0,88 g/L. O ácido láctico foi produzido até o tempo de 72 horas, com concentração de 0,79 g/L e até o final do ensaio foi consumido, chegando a 0,28 g/L. O ácido butírico foi produzido a partir do tempo de 44 horas, obtendo ao fim do ensaio uma concentração de 0,35 g/L.

Nas Figuras 5.6 e 5.7 têm-se o perfil de variação do consumo dos açúcares que estão presentes no melaço de soja durante o processo de produção de hidrogênio. Nota-se que o consumo dos açúcares totais foram de 84 e 85 % para *R. palustris* e *R. capsulatus*, respectivamente. A frutose foi o único açúcar a não ser totalmente consumido, havendo um residual de 40 % da concentração inicial deste açúcar.

O resultado próximo de produtividade pode ser justificado pelo comportamento semelhante das duas cepas em relação aos parâmetros analisados (crescimento celular, pH, concentração de metabólitos e consumos de açúcares).

5.2 - Ensaio em escala ampliada: Reator anaeróbico de tanque agitado em batelada alimentada

Nesta etapa do trabalho foi utilizado como substrato os açúcares glicose P.A. e lactose oriunda do permeado do soro de leite em pó porque pretendia-se comparar os resultados obtidos, empregando esses açúcares presentes a maioria dos efluentes. A glicose é um substrato de preferência dos microrganismos fermentativos por carboidratos, o que permite um maior entendimento sobre o processo envolvido na produção de hidrogênio. A utilização do permeado do soro de leite em pó permitiu usar um substrato com a mesma composição em todos os ensaios e possibilita o emprego do soro de leite como substrato o que constitui no ponto de vista da minimização de resíduos para a produção de um combustível baseado em fontes renováveis. Estes açúcares também são consumidos de forma preferencial para a maioria das cepas presentes em uma cultura mista. Além disso, o melaço de soja, por ser constituído por vários açúcares, dificultaria o entendimento dos mecanismos de produção de hidrogênio, uma vez que os microrganismos podem apresentar rotas metabólicas diversas e diferentes taxas de consumo dependendo do açúcar, e este aspecto poderia, o que prejudicaria a análise dos processos estudados que foram a alimentação dos mesmos na forma isolada (alimentação de um único tipo de açúcar), alternada (entre dois açúcares) e simultânea (os dois açúcares combinados).

A seguir são apresentados os resultados da fermentação escura (Itens 5.2.1 a 5.2.4), sendo que o processo operando em batelada alimentada foi avaliado alimentando um único tipo açúcar, alimentando os dois açúcares de forma alternada e os alimentando simultaneamente.

5.2.1 - Fermentação escura: utilizando como substrato lactose proveniente do permeado do soro de leite em pó

Na condição 1 utilizou-se a lactose oriunda do permeado de soro de leite em pó como substrato para a produção de biohidrogênio. A concentração inicial foi de 20 g/L e após o consumo do substrato, foi feita a sua reposição periódica em 10 g/L. Os resultados estão

apresentados no Apêndice A.1 e nas Figuras 5.8 a 5.11 mostrando a produtividade, conversão, formação dos metabólitos, concentração de substrato, pH e concentração celular, respectivamente.

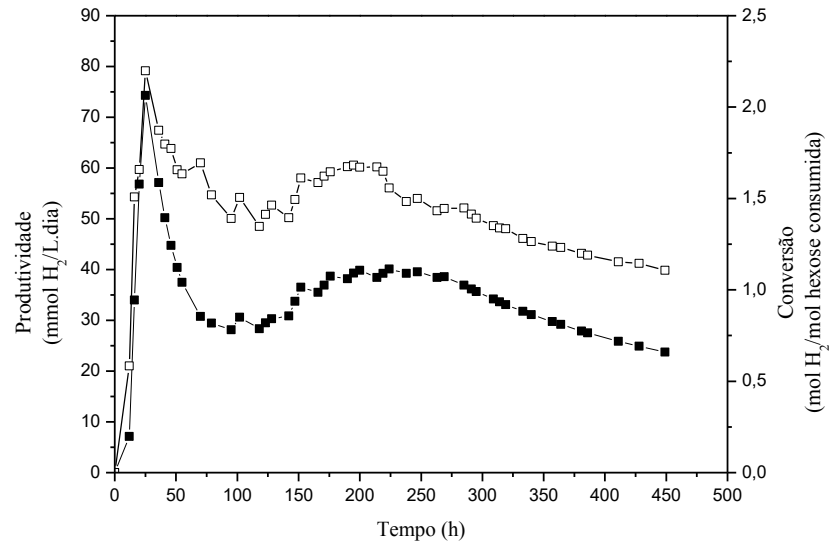


Figura 5.8 - Produtividade (mmol H₂/L.dia) (■), conversão (mol H₂/mol de hexose consumido (○), durante a fermentação utilizando lactose como substrato.

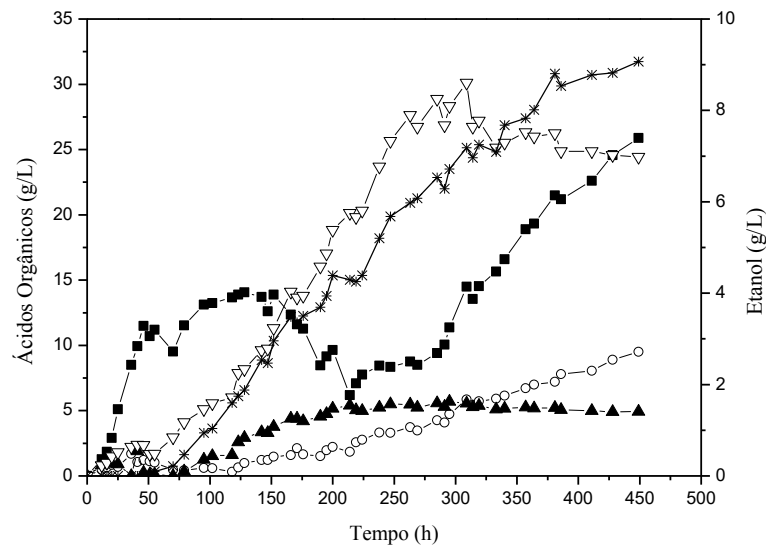


Figura 5.9 - Variação da concentração dos metabólitos formados na fermentação utilizando lactose como substrato: (ácido lático (■), ácido acético (○), ácido propiônico (▲), ácido butírico (▽), etanol (*)).

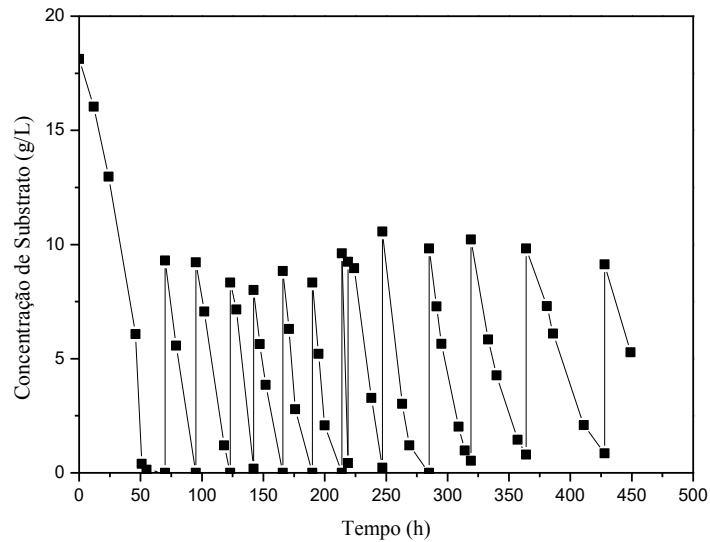


Figura 5.10 - Perfil da concentração de substrato durante a fermentação utilizando lactose como substrato.

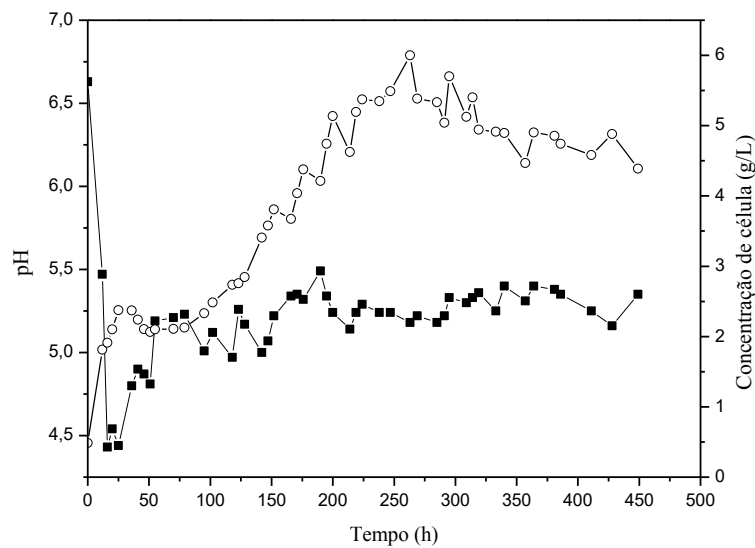


Figura 5.11 - pH (■), concentração celular (○), durante a fermentação utilizando lactose como substrato.

Nota-se na Figura 5.8 que a máxima produtividade obtida foi de 74,30 mmol H₂/L.dia com uma conversão de 2,20 mol de H₂/mol de hexose consumido no tempo de 25 horas. O processo de fermentação durou 449 horas com uma produção de 11,44 L de biogás.

A Figura 5.9 apresenta a formação dos metabólitos. Nota-se o que o ácido láctico é produzido até o tempo de 128 horas, atingindo uma concentração de 14,07 g/L e, em seguida é consumido até 6,20 g/L no tempo de 214 horas. Após esse período ele volta a ser produzido

até o fim da fermentação, atingindo uma concentração de 25,88 g/L. A formação do ácido acético nas primeiras 147 horas de fermentação é pequena, obtendo uma concentração de 1,21 g/L. Após esse período até o fim da fermentação ocorre a produção deste ácido, chegando a uma concentração final de 9,50 g/L. O ácido propiônico é produzido em pequena quantidade desde o início da fermentação, atingindo uma concentração de 4,74 g/L até o tempo de 195 horas. Após esse período a concentração deste ácido é estabilizada, chegando ao fim da fermentação com uma concentração de 4,92 g/L. O ácido butírico é produzido até o tempo de 309 horas, atingindo uma concentração de 30,10 g/L, após esse período apenas 19 % é consumido até o fim da fermentação. O etanol começa a ser sintetizado a partir do tempo de 55 horas, sendo contínua sua produção até o fim do processo fermentativo, obtendo uma concentração final de 9,07 g/L.

Na Figura 5.10, tem-se o perfil da concentração de substrato ao longo da fermentação. Nota-se que a segunda adição do substrato foi realizada no tempo de 70 horas. Após esse período, de 70 horas até 247 horas, as adições de substratos foram realizadas com intervalos em média de 24 horas. Até o fim da fermentação o intervalo das adições mudou-se para uma média de 40 horas de intervalo.

Quanto ao crescimento celular e pH, ambos podem ser observados na Figura 5.11. A concentração celular aumenta de 0,48 g/L para 5,99 g/L em 263 horas de fermentação e decresce continuamente até o fim da fermentação, atingindo 4,39 g/L. O pH inicial foi de 6,8 e ao longo da fermentação foi ajustada para manter este parâmetro em 5,5. A produção e o consumo dos ácidos orgânicos são responsáveis pela oscilação observada ao longo do processo fermentativo.

Comparando com estudos da literatura, o presente estudo teve tempo de duração de 449 horas, mantendo por mais tempo a produção de hidrogênio. Davila-Vazquez et al. (2008) estudaram o processo de produção de hidrogênio com inóculo a partir de lodo anaeróbico granular, com tempo de fermentação de 46 horas, utilizando lactose pura, lactose oriunda do permeado soro de leite e glicose P.A. como substratos. Os maiores rendimentos de hidrogênio foram obtidos de 3,6 e 3,1 mol de H₂/mol de lactose e produtividade de 134 e 194,4 mmol H₂/L.dia, para a lactose pura e para a lactose oriunda do permeado de soro de leite, respectivamente. O rendimento obtido para glicose foi de 1,46 mol de H₂/mol de glicose. Os autores obtiveram a produção de ácido acético e o ácido butírico e em menor quantidade o ácido propiônico.

Collet et al. (2004) avaliaram a produção de hidrogênio utilizando cultura pura de *Clostridium thermolacticum*, utilizando lactose como substrato. O rendimento obtido foi de

2,1 mol de H_2 /mol de lactose, tendo como principais metabólitos ao fim do processo fermentativo o ácido acético, ácido láctico e etanol.

5.2.2 - Fermentação escura: utilizando glicose P.A como substrato

A condição 2 foi avaliar a utilização da glicose P.A. como substrato para a produção de biohidrogênio. A concentração inicial foi de 20 g/L e após o consumo do substrato, o mesmo foi repostado em 10 g/L. Os resultados estão apresentados na Apêndice A.2 e nas Figuras 5.12 a 5.15 mostrando a produtividade, conversão, formação dos metabólitos, concentração de substrato, pH e concentração celular, respectivamente.

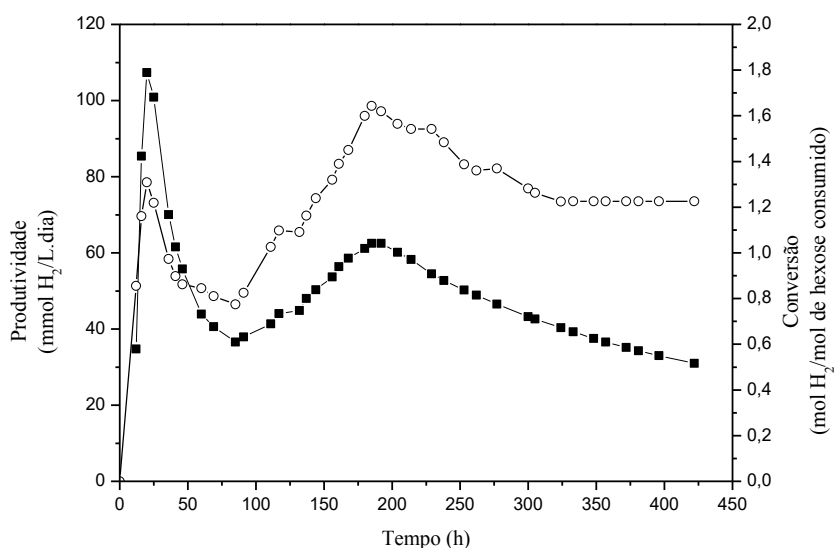


Figura 5.12 - Produtividade (mmol H_2 /L.dia) (■), conversão (mol H_2 /mol de hexose consumido) (○), durante a fermentação utilizando glicose como substrato.

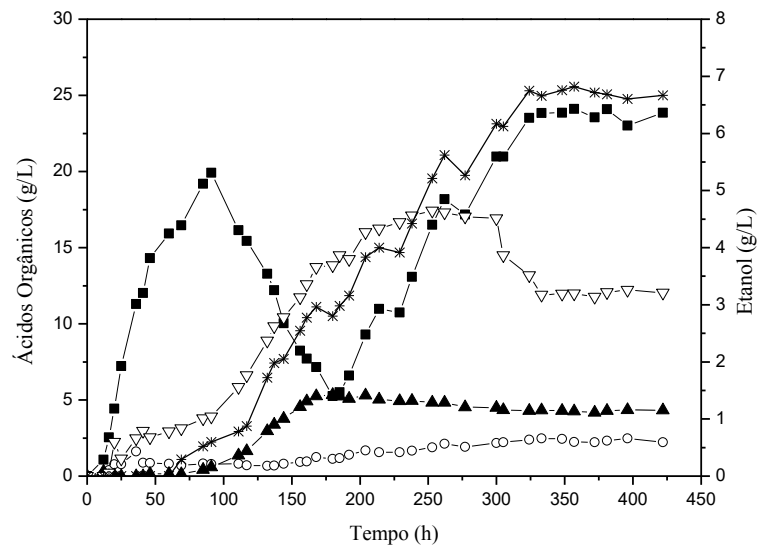


Figura 5.13 - Variação da concentração dos metabólitos formados na fermentação utilizando glicose como substrato: (ácido láctico (■), ácido acético (○), ácido propiônico (▲), ácido butírico (▽), etanol (*)).

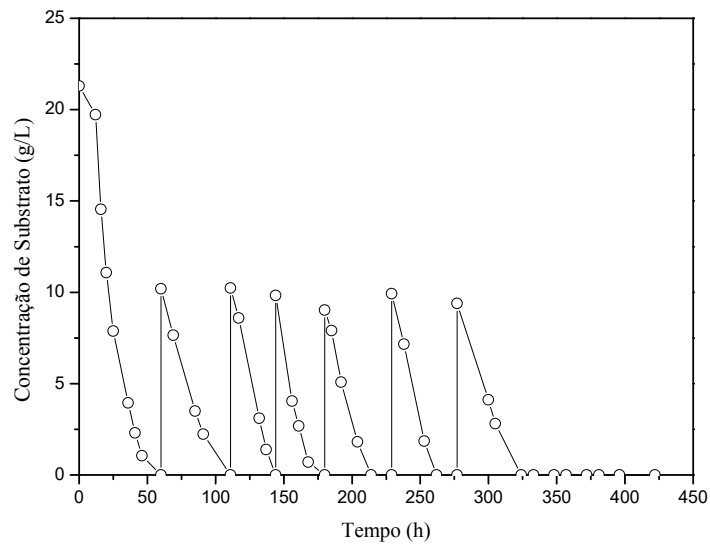


Figura 5.14 - Perfil da concentração de substrato durante a fermentação utilizando glicose (○) como substrato.

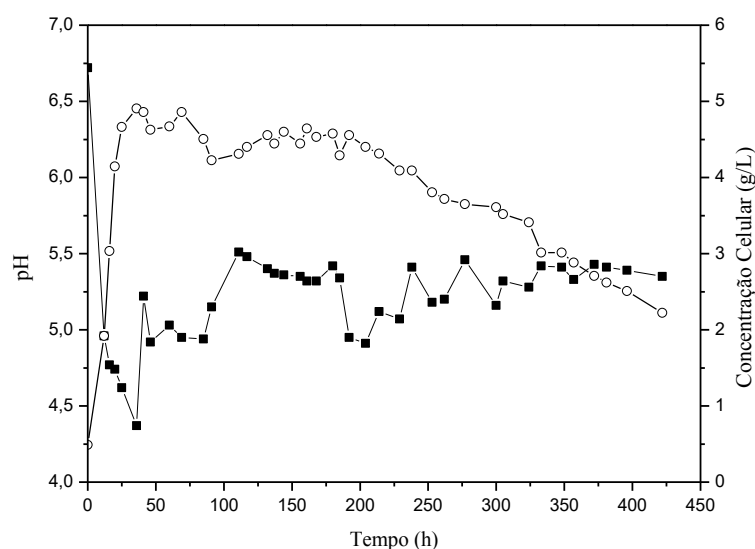


Figura 5.15 - pH (■), concentração celular (○), durante a fermentação utilizando glicose como substrato.

Pela Figura 5.12, observa-se que a máxima produtividade obtida foi 30,77 % maior do que o ensaio anterior. A produtividade encontrada foi de 107,33 mmol H₂/L.dia com uma conversão de 1,31 mol de H₂/mol de hexose consumido no tempo de 20 horas. O volume total de biogás foi de 14,27 L durante o processo fermentativo que durou 422 horas.

Analisando a Figura 5.13 que traz a formação dos metabólitos, observa-se que a formação do ácido láctico e do ácido propiônico se dá de forma semelhante a fermentação anterior. O ácido láctico é formado nas primeiras 91 horas, atingindo uma concentração de 19,91 g/L. Após, ele é consumido até o tempo de 185 horas e volta a ser produzido até o fim da fermentação, com concentração final de 23,85 g/L. Para o ácido propiônico até o tempo de 185 horas ele é formando, após esse período ele sofre pequeno consumo, chegando ao fim da fermentação com concentração de 4,33 g/L. O ácido acético é produzido durante todo processo fermentativo, porém, em pequena quantidade, obtendo uma concentração final de 2,22 g/L cerca de quatro vezes menor do que foi produzido na fermentação anterior. O ácido butírico e o etanol também teve o mesmo comportamento da fermentação anterior, porém em menores quantidades. O ácido butírico chegou a uma produção máxima de 17,42 g/L no tempo de 253 horas e de 12,03 g/L ao fim da fermentação. Já o etanol obteve uma concentração de 6,67 g/L ao final do processo fermentativo.

Verifica-se na Figura 5.14, que a segunda adição de substrato, foi realizada após 60 horas do início da fermentação. Nota-se que nesta fermentação foram feitas menos adições

que a fermentação anterior. O intervalo de tempo entre as adições aumentou em 40 % em relação a fermentação anterior.

Em relação ao crescimento celular observado na Figura 5.15, nota-se que nas primeiras 36 horas há um aumento expressivo de 0,49 g/L para 4,96 g/L. Ao comparar este ensaio com a condição 1, empregando lactose como substrato, observa-se que o crescimento da biomassa usando a glicose foi superior, uma vez que na presença de lactose, a concentração atinge 5,99 g/L (Figura 5.11) em um intervalo superior de 263 horas. Após esse período, a concentração celular se manteve com pouca variação até o tempo de 214 horas. Em seguida, ocorre um decaimento da concentração celular até o fim do processo fermentativo (422 horas), atingindo uma concentração de 2,22 g/L. Essa variação de concentração celular é maior do que a verificada na condição 1, com lactose, sendo que o decréscimo na concentração de biomassa foi de 5,99 g/L para 4,39 g/L no final do processo fermentativo.

A taxa de crescimento elevada da condição 2, pode ser justificada pela produtividade máxima obtida pela glicose ser superior a produtividade da condição 1. Verifica-se também que a produtividade da condição 1 cai mais lentamente do que a condição 2. Observa-se que na condição 1, a conversão é maior que a condição 2 no início do processo fermentativo, visto que um menor consumo de substrato leva a um aumento da conversão, como pode ser observado no início da condição 2, em que a produtividade é superior à da condição 1 no início da fermentação. Para a condição 2, a conversão máxima é no tempo de 185 horas (1,64 mol H₂/mol de hexose consumido), mostrando que o consumo do substrato para a produção de hidrogênio na condição 2 é maior, em tempos maiores, do que a produção de hidrogênio na condição 1 que é no início da fermentação, em que se tem um menor crescimento celular. Uma menor conversão no início da condição 2, pode ser justificada pelo rápido crescimento celular, obtendo assim a produtividade máxima, uma vez que a produção de hidrogênio é maior na fase de crescimento dos microrganismos.

Verifica-se que no início da condição 2 a formação do ácido láctico, atinge uma concentração elevada de 19,90 g/L no tempo de 91 horas, enquanto para a condição 1, o máximo de ácido láctico no início do processo fermentativo é de 13,23 g/L no tempo de 102 horas. Na condição 2, o consumo do ácido láctico é rápido e atinge o mínimo em 185 horas (5,50 g/L), o que coincide com o segundo pico de produtividade e conversão. Na condição 1, ocorre o consumo do ácido láctico no intervalo de 142 a 214 horas, nesta faixa tem um pico menos acentuado de produtividade e conversão. O que mostra o efeito do ácido láctico durante a produção de hidrogênio para as duas condições. Além disso, a produção do ácido butírico e acético foi maior para a condição 1 por um maior tempo de processo.

Wu et al. (2009) investigaram a produção de hidrogênio a partir de uma cultura mista obtida de estrume de porco suplementado com glicose. Rendimentos similares foram obtidos entre 1,18 e 1,63 mol de H₂/mol de glicose. Em estudos de Mu, Zheng e Yua (2009), foi analisada a produção de hidrogênio a partir de uma cultura mista de um lodo anaeróbico. O rendimento obtido foi de 1,75 mol de H₂/mol de glicose.

5.2.3 - Fermentação escura: utilizando glicose e lactose, com adição alternada como substrato

O objetivo da condição 3 foi avaliar alimentação alternada da lactose e glicose como substrato para a produção de biohidrogênio. A concentração inicial foi de 20 g/L lactose e após o consumo do substrato, foi repostado com glicose em 10 g/L. Os resultados estão apresentados no Apêndice A.3 e nas Figuras 5.16 a 5.19 a produtividade, conversão, formação dos metabólitos, concentração de substrato, pH e concentração celular, respectivamente.

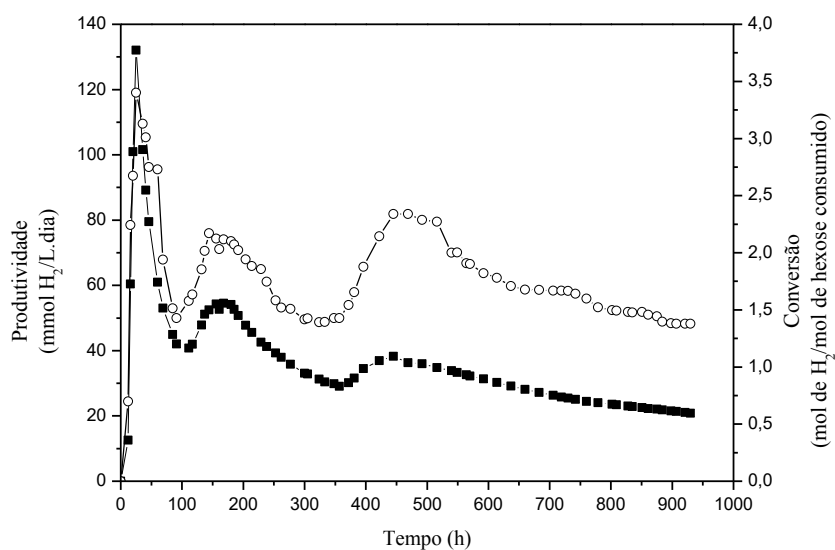


Figura 5.16 - Produtividade (mmol H₂/L.dia) (■), conversão (mol H₂/mol de hexose consumido) (○), durante a fermentação utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato.

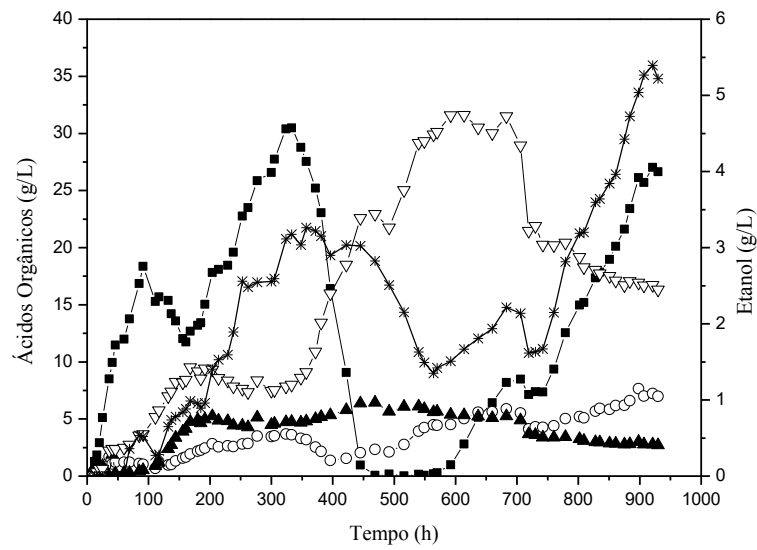


Figura 5.17 - Variação da concentração dos metabólitos formados na fermentação utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato: (ácido láctico (■), ácido acético (○), ácido propiônico (▲), ácido butírico (▽), etanol (*)).

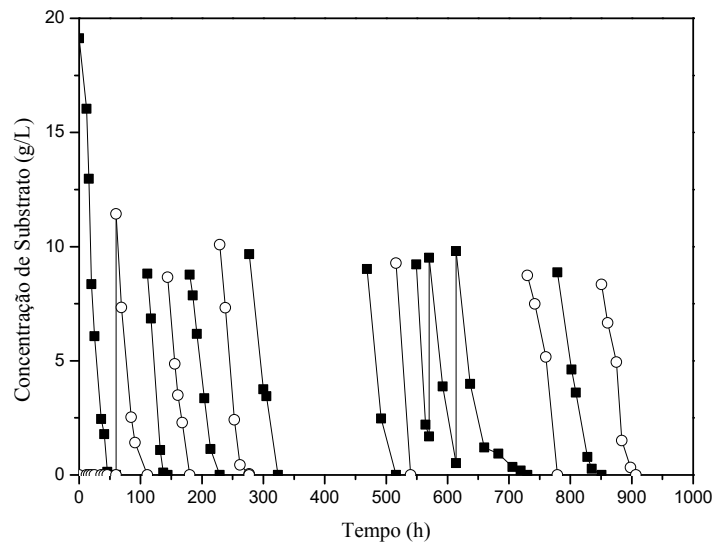


Figura 5.18 - Perfil da concentração de substrato durante a fermentação utilizando lactose (■) e glicose (○), com adição alternada como, substrato.

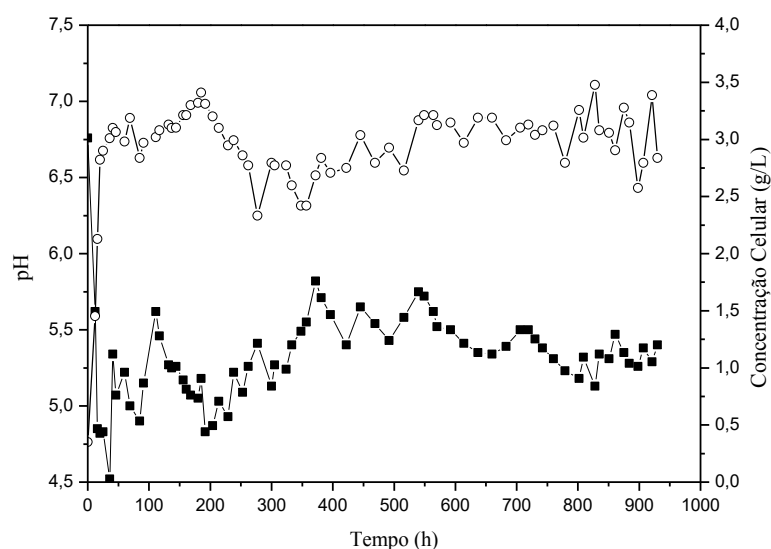


Figura 5.19 - pH (■), concentração celular (○), durante a fermentação utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato.

Observa-se pelos resultados apresentados na Figura 5.16 que a máxima produtividade obtida foi de 132,06 mmol H₂/L.dia com uma conversão de 3,40 mol de H₂/mol de hexose consumido no tempo de 25 horas. O processo fermentativo durou 930 horas com um volume de produção de biogás de 16,08 L.

Pela Figura 5.17 verifica-se que o ácido láctico é amplamente produzido até o tempo de 333 horas, chegando a uma concentração de 30,48 g/L. A alta concentração deste ácido pode inibir a produção de biogás, devido a este fato, a adição de açúcar no intervalo de 333 a 445 horas foi interrompido, a fim de que as bactérias presentes no meio consumissem essa grande quantidade de ácido láctico como substrato. Esse consumo durou cerca de 130 horas. Até o tempo de 760 horas houve pequena formação deste ácido. Em seguida, a produção do mesmo aumentou, chegando ao fim da fermentação com concentração de 26,63 g/L.

Nota-se que o ácido acético apresentou comportamento semelhante as fermentações utilizando a lactose e glicose de forma isoladas. A concentração do ácido acético ao fim do processo fermentativo foi de 6,97 g/L. A produção do ácido propiônico se deu até o tempo de 469 horas com uma concentração de 6,45 g/L. Em seguida, o mesmo foi consumido lentamente até o fim da fermentação, atingindo uma concentração de 2,72 g/L. O ácido butírico teve um comportamento semelhante ao observado nas fermentações utilizando o substrato isolado, chegando a uma concentração máxima de 31,61 g/L no tempo de 614 horas. Em seguida, foi sendo consumido até o fim do processo fermentativo, obtendo uma

concentração no final de 16,32 g/L. O etanol começou a ser sintetizado a partir do tempo de 60 horas, tendo uma produção contínua até o fim do processo fermentativo, alcançando uma concentração final de 5,22 g/L.

O perfil de concentração de substrato alimentado de forma alternada está apresentado na Figura 5.18. A fermentação se iniciou com o substrato lactose, que foi totalmente consumido após 60 horas do início da fermentação. A segunda adição, foi realizada com o substrato glicose e assim, foi realizada a alternância dos substratos ao longo de todo o processo fermentativo.

Pela Figura 5.19, nota-se que a concentração celular se iniciou em 0,35 g/L, atingindo 3,49 g/L em um tempo de 41 horas após o início do processo fermentativo, chegando a uma concentração celular máxima de 3,72 g/L. Durante toda a fermentação a concentração celular permaneceu entre 2,42 a 3,60 g/L. O pH foi mantido entre 5 e 5,5 durante todo o processo. Após o tempo de 348 horas, o pH começa a subir até 5,82 e volta a cair e permanece entorno de 5,5 após 600 horas de processo fermentativo. Este aumento de pH coincide com o tempo em que o ácido láctico foi consumido. Este fato mostra que o ácido láctico influencia bastante no comportamento do pH do meio fermentativo.

Nota-se que no tempo de 156 horas e no intervalo de 333 a 445 horas há o consumo do ácido láctico e ocorre um aumento da produtividade e na conversão de hidrogênio. Verifica-se que, com o consumo do ácido láctico, há a formação do ácido butírico e ácido acético, nestes dois momentos relatados, o que prolongou a produção de hidrogênio, atingindo o tempo de 683 horas. Observa-se que no período em que o ácido láctico foi consumido, o pH do meio fermentativo aumentou. O processo alternado apresenta três picos de produtividade e conversão, diferente das outras fermentações. O primeiro pico foi observado no início da fermentação, quando há alto crescimento celular e alto consumo de substrato. O segundo pico pode ser visto no tempo de 156 horas, com o consumo do ácido láctico e a formação dos ácidos butírico e acético. O terceiro pico está entre 372 e 492 horas, confirmando a hipótese anterior, da influência do consumo do ácido láctico na produção de hidrogênio.

5.2.4 - Fermentação escura: utilizando glicose e lactose, com adição simultânea, como substrato

A condição 4 avaliou a alimentação simultânea da lactose e glicose como substrato para a produção de biohidrogênio. A concentração total de açúcar inicial foi de 20 g/L e após o consumo do substrato, foi repostado em 10 g/L de lactose e glicose. Os resultados estão

apresentados no Apêndice A.4 e nas Figuras 5.20 a 5.23 a produtividade, conversão, formação dos metabólitos, concentração de substrato, pH e concentração celular, respectivamente.

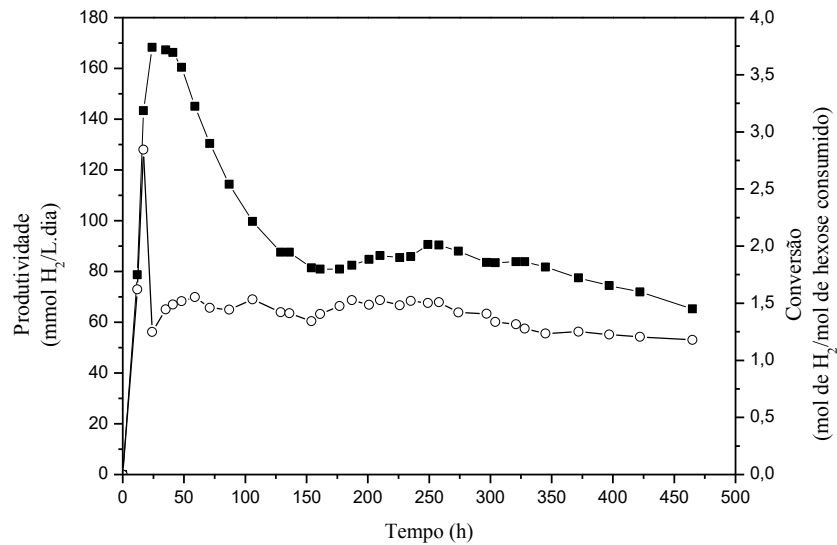


Figura 5.20 - Produtividade (mmol H₂/L.dia) (■), conversão (mol H₂/mol de hexose consumido) (○), durante a fermentação utilizando lactose e glicose, alimentados de forma simultânea como substrato.

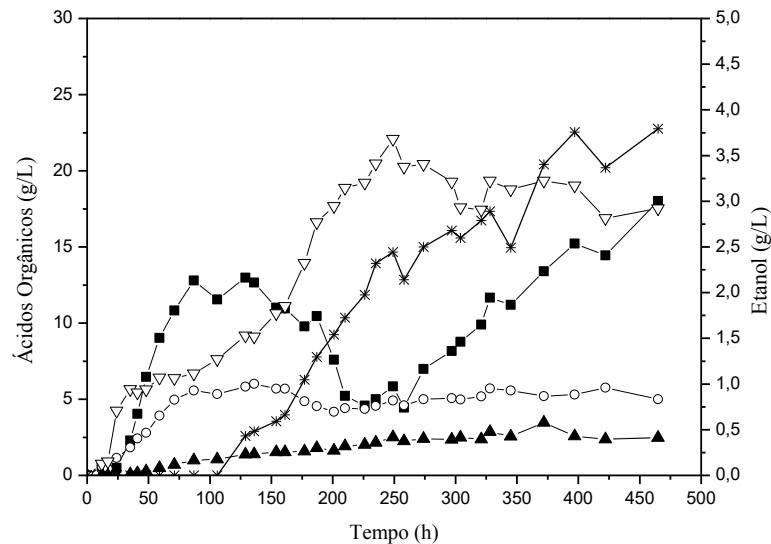


Figura 5.21 - Variação da concentração dos metabólitos formados na fermentação utilizando lactose e glicose, alimentados de forma simultânea como substrato: (ácido láctico (■), ácido acético (○), ácido propiônico (▲), ácido butírico (▽), etanol (*)).

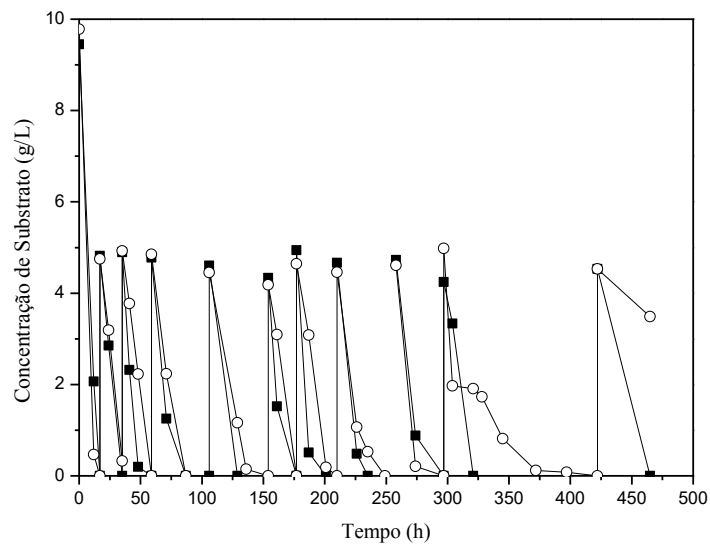


Figura 5.22 - Perfil da concentração de substrato durante a fermentação utilizando lactose (■) e glicose (○), alimentados de forma simultânea como substrato.

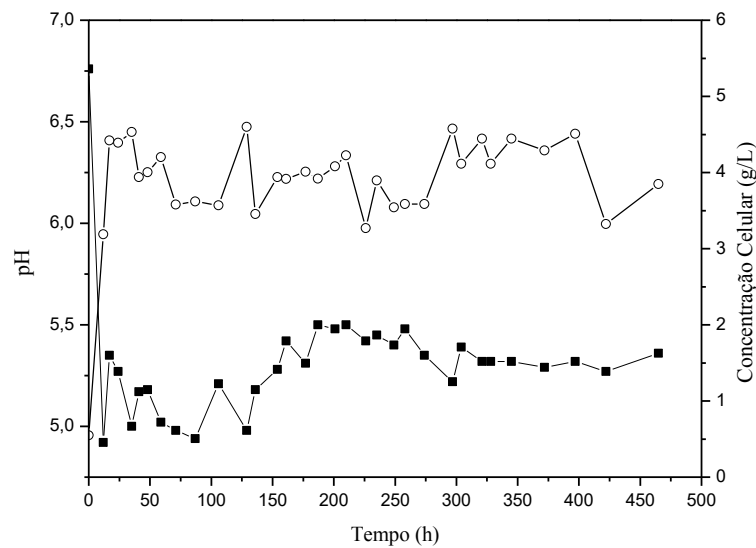


Figura 5.23 - pH (■), concentração celular (○), durante a fermentação utilizando lactose e glicose, alimentados de forma simultânea como substrato.

Nota-se na Figura 5.20 que a máxima produtividade obtida foi de 168,27 mmol H₂/L.dia com uma conversão de 1,25 mol de H₂/mol de hexose consumido no tempo de 24 horas. Verifica-se que esse foi o maior valor de produtividade quando comparados com as três condições anteriores, (batelada alimentada usando glicose ou lactose, de forma isolada ou alternada). O volume total de produção de biogás foi de 32,05 L, com 465 horas de processo fermentativo.

Na Figura 5.21, constata-se que a produção dos metabólitos durante o processo fermentativo, foi semelhante aos ensaios anteriores. Observa-se a produção máxima de ácido láctico no início da fermentação (87 horas), com uma concentração de 12,79 g/L. Em seguida, o ácido láctico é consumido até o tempo de 226 horas. Após esse intervalo, o ácido láctico é formado novamente, obtendo uma concentração final de 18,01 g/L. A produção do ácido acético vai até 136 horas de fermentação, com uma concentração de 6,01 g/L. Em seguida, até o fim da fermentação, o ácido acético sofre pequenas alterações, atingindo uma concentração final de 5,05 g/L. O ácido propiônico começa a ser produzido após 35 horas de fermentação e sua produção é contínua até o término. O ácido butírico foi sintetizado até o tempo de 249 horas, atingindo uma concentração de 22,08 g/L, em seguida apenas cerca de 21 % deste ácido é consumido até o fim da fermentação. O etanol começou a ser produzido a partir de 106 horas, sendo produzido continuamente até o término do processo fermentativo.

A adição de glicose e lactose como substrato foi realizado de forma simultânea conforme pode ser visto pela Figura 5.22. Observa-se que todo o substrato que foi adicionado no início da fermentação, foi consumido em apenas 17 horas. As adições seguintes de substratos foram realizadas com intervalos em médios de 30 horas.

Analisando a Figura 5.23, observa-se que a concentração celular iniciou em 0,55 g/L, atingindo 5,30 g/L após 24 horas do início do processo fermentativo. Durante toda a fermentação a concentração celular permaneceu entre 2,73 a 5,30 g/L. O pH foi mantido entre 5,0 e 5,5 durante todo o processo.

Nota-se que no intervalo de 187 a 258 horas o ácido láctico foi consumido e observou-se um suave aumento da produtividade e conversão. Nas condições 1, 2 e 3, no final do processo fermentativo, nota-se uma queda do ácido butírico, ocasionando decaimento na produtividade e após um tempo aproximadamente de 100 horas, o sistema pára de produzir hidrogênio. Em comparação com a fermentação com alimentação alternada, o tempo de produção de hidrogênio da condição 3 foi maior do que obtido utilizando alimentação simultânea, isto, devido ao maior tempo o ácido butírico aumentou e permaneceu em valores próximo de 30 g/L em relação às outras condições.

5.2.5 Aspectos gerais dos ensaios de fermentação escura

A produção de hidrogênio é usualmente acompanhada pela formação de ácidos orgânicos e pelo crescimento celular. A formação destes metabólitos indica a rota metabólica que é seguida pelos microrganismos que estão envolvidos no processo fermentativo,

permitindo assim um melhor entendimento da produção de hidrogênio. Os diferentes metabólitos que são produzidos ao longo do processo fermentativo, estão associados com os diferentes grupos de microrganismos que estão presentes no consórcio microbiano que foram selecionados durante o pré-tratamento de choque térmico. O pré-tratamento de choque térmico elimina microrganismos não formadores de esporos. A formação de diferentes metabólitos, depende do tipo de espécies que está presente durante o processo fermentativo (HAWKES et al., 2002; VALDEZ-VAZQUEZ e POGGI-VARALDO, 2009).

A produção de hidrogênio pode ser estimada através da produção de ácido acético e ácido butírico formados durante o processo fermentativo. A formação destes metabólitos atribui a maior produção de hidrogênio ao meio fermentativo. Essa atribuição está baseada em estudos da literatura que mostra que o aumento da produção de hidrogênio é acompanhado pela produção dos ácidos acético e butírico, conforme as Equações 3.7 e 3.8, usando glicose como substrato e Equações 3.11 e 3.12, utilizando lactose como substrato (WANG e WAN, 2009; HAFEZ et al., 2010).

Conforme visto nos resultados, a produção do ácido butírico foi predominante em todos os processos fermentativos. Estudos de Chen et al. (2005), também observaram a predominância de ácido butírico no meio fermentativo.

Em todos os casos observou-se que a formação do ácido láctico ocorre no início da fermentação, entre 150 e 250 horas sendo consumido e depois volta a ser produzido. Este fato pode estar relacionado a uma reação dos microrganismos na presença deste ácido, o que leva o consumo do mesmo, mas as cepas responsáveis pela produção desse ácido voltam a agir novamente, elevando a mudança de rota metabólica. Este processo pode estar relacionado a competição das cepas presente na cultura mista.

Na etapa de consumo do ácido láctico, verificou-se a formação predominantemente do ácido butírico (Equação 5.1), seguido do ácido acético (Equação 5.2 e 5.3) e em menor grau, do ácido propiônico (Equação 5.3) (SAADY, 2013).



O estágio em que se observa a volta da formação do ácido láctico com a interrupção da produção de hidrogênio pode estar associado, provavelmente, pela síntese de compostos

tóxicos ao consórcio microbiano, que aumentaram a resistência de microrganismos produtores de ácido láctico e, concomitantemente, inibiram os produtores de hidrogênio. A alta concentração de ácido láctico pode intensificar ainda mais este quadro de competição entre esses dois grupos de microrganismos, apesar de alimentação periódica dos açúcares.

A consolidação dos resultados obtidos nas condições 1 a 4 para a fermentação escura é apresentada na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Consolidação dos testes realizados de fermentação escura em escala ampliada.

Condição	Substrato	Produtividade máxima (mmol H ₂ /L.dia)	Tempo da produtividade máxima (h)	Conversão global (mol H ₂ /mol de hexose consumido)	Tempo de fermentação (h)
1	Lactose	74,30	25	2,20	449
2	Glicose	107,33	20	1,31	422
3	Lac/Gli	132,06	25	3,40	930
4	50% Lac/Gli	168,27	24	1,25	465

O maior valor de produtividade máxima foi na condição 4 utilizando lactose e glicose como substratos de forma simultânea, obtendo o valor de 168,27 mmol H₂/L.dia em 24 horas de processo com conversão de 1,25 mol H₂/mol de hexose consumida. Entretanto, foi na condição 3, de batelada alimentada desses mesmos açúcares de forma alternada que se observou a maior duração do processo de 930 horas, sendo que na condição 4 foi de 465 horas. Na condição 3, também foi observada a maior conversão atingindo o valor de 3,40 mol H₂/mol de hexose consumida.

Não foi localizado na literatura trabalho que avaliou a fermentação escura em batelada alimentada, seja ela de forma isolada (um único tipo de açúcar), de forma alternada (dois açúcares ou mais) ou simultânea. Um dos raros trabalhos que foi usado batelada alimentada, e neste caso de forma alternada (lactose e glicose P.A.) foi o trabalho de Silva et al. (2016) que avaliaram a produção de hidrogênio em processo por fotofermentação a partir de *R. capsulatus* usando efluente de fermentação escura como substrato.

É neste contexto que se destaca a importância deste trabalho e os avanços destacados, como possibilidade de aumentar o tempo em que a cultura se mantém ativa na produção de hidrogênio, obtendo assim, um volume maior de hidrogênio. Além disso, este estudo indica que diversos resíduos agroindustriais que são ricos nos açúcares avaliados, glicose e lactose, possam ser empregados num processo que reduz o acúmulo destes efluentes, vinculando o seu tratamento à formação de hidrogênio que constitui um produto de valor agregado.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

6.1 - Conclusões

Para os ensaios em escala reduzida foi possível observar que:

- Nos ensaios 1 e 2 em que o inóculo foi submetido aos pré-tratamentos, como melhor resultado o tratamento de choque térmico prevaleceu frente ao ácido, com uma produtividade de 14,13 mmol H₂/L.dia e conversão de 0,99 mol H₂/mol de hexose.
- No ensaio 3 em que foram testados as culturas puras e o sistema de co-cultura, a cepa *R. palustris* obteve maiores resultados com valores de produtividade e conversão de 3,24 mmol H₂/L.dia e 0,80 mol H₂/ mol de lactose.
- Nos ensaios 4 e 5 realizados para analisar o consumo do melaço de soja com as culturas puras *R. palustris* e *R. capsulatus*, verificou-se que ambas possuem o mesmo potencial para produção de hidrogênio, os maiores resultados obtidos foram de 25,46 mmol H₂/L.dia para a *R. palustris*. Observou-se a formação dos ácidos láctico, acético e butírico.

Nos ensaios em escala ampliada os resultados obtidos foram:

- Para a condição 1 utilizando a lactose como substrato, a produtividade máxima obtida foi de 74,30 mmol H₂/L.dia e conversão de 2,20 mol de H₂/mol de hexose consumido.
- Para a condição 2 utilizando a glicose, os resultados obtidos foram mais satisfatórios. A produtividade máxima encontrada foi de 107,33 mmol H₂/L.dia, o que correspondendo a cerca de 31 % de aumento da produtividade com relação à fermentação utilizando a lactose.
- Na condição 3 em que foi avaliado a adição de lactose e glicose de forma alternada, a máxima produtividade obtida foi de 132,06 mmol H₂/L.dia com uma conversão de 3,40 mol de H₂/mol de hexose consumido. Nesta condição foi possível manter a cultura ativa com potencial para a produção de hidrogênio por período de até 930 horas.
- A condição 4 em que o substrato foi adicionado de forma simultânea, obteve-se a máxima produtividade de 168,27 mmol H₂/L.dia com uma conversão de 2,78 mol de H₂/mol de hexose consumido. Verifica-se que esse foi o maior valor de produtividade alcançado, quando comparados com as três condições anteriores.

Indicando que a suplementação de forma simultânea do meio durante o processo fermentativo, com lactose e glicose promoveu consideravelmente o aumento da produtividade de hidrogênio.

- Com relação à composição final de metabólitos, os principais ácidos orgânicos foram os ácidos láctico e butírico, seguidos de ácido acético, etanol e ácido propiônico. Os resultados indicaram que os principais metabólitos formados foram o ácido láctico e o ácido butírico, correspondendo a cerca de 70% do total dos metabólitos produzidos.
- Das rotas metabólicas que levam a formação do hidrogênio, observou-se em todos os ensaios o predomínio da fermentação tipo butírica.
- O aumento da produção de hidrogênio também foi influenciado pela alteração da rota metabólica que induziu o consumo de ácido láctico. A rota de síntese deste metabólito não leva à formação de hidrogênio, no entanto, leva a formação dos ácidos butírico e acético, que suas rotas sintetizam o hidrogênio.

6.2 - Sugestões para trabalhos futuros

- Testar o melaço de soja com substrato em escala ampliada, de modo a viabilizar a utilização deste material residual, minimizando o seu acúmulo nos processos industriais;
- Avaliar a produção de hidrogênio em outros tipos de biorreatores e também em regime contínuo a partir das condições de fermentação determinadas.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFSAR, N.; ÖZGÜR, E.; GÜRGAN, M.; AKKÖSE, S.; YÜCEL, M.; GÜNDÜZ, U.; EROGLU, I. Hydrogen productivity of photosynthetic bacteria on dark fermenter effluent of potato steam peels hydrolysate. International Journal of Hydrogen Energy, v. 36, p. 432-438, 2011.

AMORIM, E.L.C. Efeito da concentração de glicose e da alcalinidade na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

ARGUN, H.; KARGI, F. Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview. International Journal of Hydrogen Energy, v. 36, p. 7443-7459, 2011.

ARGUN, H.; KARGI, F. Effects of sludge pre-treatment method on bio-hydrogen production by dark fermentation of waste ground wheat. International Journal of Hydrogen Energy, v.34, p. 8543-8548, 2009.

ARGUN, H.; KARGI, F. Photo-fermentative hydrogen gas production from dark fermentation effluent of ground wheat solution: Effects of light source and light intensity. International Journal of Hydrogen Energy, v.35, p. 1595-1603, 2010.

AVCIOGLU, S.G.; OZGUR, E.; EROGLU, I.; YUCEL, M.; GUNDUZ, U. Biohydrogen production in an outdoor panel photobioreactor on dark fermentation effluent of molasses. International Journal of Hydrogen Energy, v. 36, p. 11360-11368, 2011.

BALAT, H.; KIRTAY, E. Hydrogen from biomass – Present scenario and future prospects. International Journal of Hydrogen Energy, v. 35, p. 7416-7426, 2010.

BBC Brasil – Guia de Energia Global. Disponível em: <http://www.bbc.com/portuguese/especial/1931_energia/page2.shtml>. Acesso em maio de 2016.

CHANG, S.; LI, J.; LIU, F. Evaluation of different pretreatment methods for preparing hydrogen-producing seed inocula from waste activated sludge. Renew Energy, v. 36, p. 1517-1522, 2011.

CHEN, W.M.; TSENG, Z.J.; LEE, K.S.; CHANG, J.S. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. International Journal of Hydrogen Energy, v. 30, p. 1063-1070, 2005.

CHONG, M.; SABARATNAM, V.; SHIRAI, Y.; HASSAN, M.A. Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. International Journal of Hydrogen Energy, v. 34, p. 3277-3287, 2009.

COLLET, C.; ADLER, N.; SCHWITZGUEBEL, J.P.; PERINGER, P. Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. International Journal of Hydrogen Energy, v. 29, p. 1479–1485, 2004.

DAS, D.; VEZIROGLU, T.N. Advances in biological hydrogen production processes. International Journal of Hydrogen Energy, v. 33, p. 6046-6057, 2008.

DAS, D.; VEZIROGLU, T.N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. International Journal of Hydrogen Energy, v. 26, p. 13-28, 2001.

DAVILA-VAZQUEZ, G.; LEÓN-RODRÍGUEZ, A.; ALATRISTE-MONDRAGÓN, F.; RAZO-FLORES, E. The buffer composition impacts the hydrogen production and the microbial community composition in non-axenic cultures. Biomass and Bioenergy, v. 35, p. 3174-3181, 2011.

DAVILA-VAZQUEZ, G.; ALATRISTE-MONDRAGÓN, F.; LEÓN-RODRÍGUEZ, A.; RAZO-FLORES, E. Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. International Journal of Hydrogen Energy, v. 33, p. 4989 - 4997, 2008.

ESPINOZA-ESCALANTE, F.M.; PELAYO-ORTÍZ, C.; NAVARRO-CORONA, J.; GONZÁLEZ-GARCÍA, Y.; BORIES, A.; GUTIÉRREZ-PULIDO, H. Anaerobic digestion of the vinasses from the fermentation of Agave tequilana Weber to tequila: the effect of pH, temperature and hydraulic retention time on the production of hydrogen and methane. Biomass and Bioenergy, v. 33, p. 14-20, 2009.

FANG, H.H.P.; LIU, H. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. Bioresource Technology, v. 82, p. 87-92, 2002.

GARCÍA-PENÁ, E.I.; GUERRERO-BARAJAS, C.; RAMIREZ, D.; ARRIAGA-HURTADO, L.G. Semi-continuous biohydrogen production as an approach to generate electricity. Bioresource Technology, v. 100, p. 6369-6377, 2009.

GUO, L.; ZONG, Y.; LU, M.; ZHANG, J. Effect of different substrate concentrations and salinity on hydrogen production from mariculture organic waste (MOW). International Journal of Hydrogen Energy, v. 39, p. 736-743, 2014.

HAFEZ, H.; NAKLA, G.; NAGGAR, M.H.E.; ELBESHBISHY, E. Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. International Journal of Hydrogen Energy, v. 35, p. 81-92, 2010.

HALLENBECK, P.; BENEMANN, J.R. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. International Journal of Hydrogen Energy, v. 27, p. 1185-1193, 2002.

HALLENBECK, P.C.; GHOSH, D. Improvements in fermentative biological hydrogen production through metabolic engineering. Journal of Environmental Management, v. 95, p. S360-S364, 2012.

HALLENBECK, P.C.; GHOSH, D. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward?. Trends in Biotechnology, v. 27, p. 287-297, 2009.

HAWKES, F.R.; DINSDALE, R.; HAWKES, D.L.; HUSSY, I. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. International Journal of Hydrogen Energy, v. 27, p. 1339-1347, 2002.

HUDSON, M.S.L.; DUBEY, P.K.; PUKAZHSELVAN, D.; PANDEY, S.K. SINGH, R.K.; RAGHUBANSHI, H.; SHAHI, R.R.; SRIVASTAVA, O.N. Hydrogen energy in changing environmental scenario: Indian context. International Journal of Hydrogen Energy, v.34, p. 7358-7367, 2009.

IEA. INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. Key World Energy Statistics 2015. Paris: IEA; 2015.

KAPDAN, I.K.; KARGI, F. Bio-hydrogen production from waste materials. Enzyme and Microbial Technology, v. 38, p. 569-582, 2006.

KESKIN, T., HALLENBECK, P.C. Hydrogen production from sugar industry wastes using single-stage photofermentation. Bioresource Technology, v. 112, p. 131-136, 2012.

KIM, M.S.; BAEK, J.S.; SUYUN, Y.; SIM, S.J.; PARK, S.; KIM, S.C. Hydrogen production from *Chlamydomonas reinhardtii* biomass using a two-step conversion process: Anaerobic conversion and photosynthetic fermentation. International Journal of Hydrogen Energy, v.31, p. 812-816, 2006.

KOTHARI, R.; SINGH, D.P.; TYAGI, V.V. TYAGI, S.K. Fermentative hydrogen production – An alternative clean energy source. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 16, p. 2337-2346, 2012.

LAY, C.H.; HUANG, C.Y.; CHEN, C.C.; LIN, C.Y. Biohydrogen production in an anaerobic baffled stacking reactor: Recirculation strategy and substrate concentration effects. Biochemical Engineering Journal, v. 109, p. 59-64, 2016.

LAZARO, C.Z. Obtenção e Caracterização Filogenética de Consórcio de Bactérias Fototróficas Púrpuras Não-Sulfurosas Consumidoras de Ácidos Orgânicos Visando a Produção de Hidrogênio em Reator Anaeróbico de Batelada. Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia de São Carlos, 2009.

LEVIN, D. B.; PITT, L.; LOVE, M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. International Journal of Hydrogen Energy, v. 29, p. 173-185, 2004.

LI, C.; FANG, H.H.P. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, v. 37, p. 1-39, 2007.

LIN, C.Y.; CHENG, C.H. Fermentative hydrogen production from xylose using anaerobic mixed microflora. International Journal of Hydrogen Energy, v. 31 p. 832-840, 2006.

LIN, C.Y.; LAY, C.H. Effects of carbonate and phosphate concentrations on hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. International Journal of Hydrogen Energy, v. 29, p. 275-281, 2004.

LIU, B.F.; REN, N.Q.; XIE, G.J.; DING, J.; GUO, W.Q.; XING, D.F. Enhanced biohydrogen production by the combination of dark- and photo-fermentation in batch culture. Bioresource Technology, v. 101, p. 5325-5329, 2010.

LOGAN, B. E.; OH, S. E.; KIM, I. S.; VAN GINKEL, S. Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers. Environmental Science Technology, v. 36, p. 2530-2535, 2002.

LUO, G.; XIE, L.; ZOU, Z.; WANG, W.; ZHOU, Q. Evaluation of pretreatment methods on mixed inoculum for both batch and continuous thermophilic biohydrogen production from cassava stillage. Bioresource Technology, v. 101, p. 959-964, 2010.

LV, Z.; LEITE, A.F.; HARMS, H.; RICHNOW, H.H.; LIEBETRAU, J.; M. NIKOLAUSZ, M. Influences of the substrate feeding regime on methanogenic activity in biogas reactors approached by molecular and stable isotope methods. Anaerobe, v. 29, p. 91-99, 2014.

MANISH, S.; BANERJEE, R. Comparison of biohydrogen production processes. International Journal of Hydrogen Energy, v.33, p.279-286, 2008.

MATHEWS, J.; WANG, G. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy, v. 34, p.7404-7416, 2009.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. Acesso <http://www.mme.gov.br/mme>, abril de 2016.

MOHAMMADI, P.; IBRAHIM, S.; ANNUAR, M. S. M.; LAW, S. Effects of different pretreatment methods on anaerobic mixed microflora for hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent. Journal of Cleaner Production, v. 19, p. 1654-1658, 2011.

MOHAN, S.V.; MOHANAKRISHNA, G.; SARMA, P.N. Integration of acidogenic and methanogenic processes for simultaneous production of biohydrogen and methane from wastewater treatment. International Journal of Hydrogen Energy, v. 33, p. 2156-2166, 2008.

MU, Y.; YU, H-Q.; WANG, G. Evaluation of three methods for enriching H₂-producing cultures from anaerobic sludge. Enzyme and Microbial Technology, v. 40, p. 947-953, 2007.

MU, Y.; ZHENG, X-J.; YUA, H-Q. Determining optimum conditions for hydrogen production from glucose by an anaerobic culture using response surface methodology (RSM). International Journal of Hydrogen Energy, v. 34, p. 7959-7963, 2009

NANDI, R.; SENGUPTA, S. Microbial production of hydrogen: an overview. Critical Reviews in Microbiology, v. 24, p. 61-84, 1998.

NI, M.; LEUNG, D.Y.C.; LEUNG, M.K.H.; SUMATHY, K. An overview of hydrogen production from biomass. Fuel Processing Technology, v. 87, p. 461-472, 2006.

NTAIKOU, I.; ANTONOPOULOU, G.; LYBERATOS, G. Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: a review. Waste and Biomass Valorization, v. 1, p. 21-39, 2010.

OH, S-E.; GINKEL, S.V.; LOGAN, B.E. The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. Environmental Science Technology, v. 37, p. 5186-5190, 2003.

O-THONG, S; PRASERTAN, P; INTRASUNGKGA, N.; DHAMWICHUKORN, S.; BIRKELAND, N. Optimization of simultaneous thermophilic fermentative hydrogen production and COD reduction from pal oil mil effluente by *Thermoanaerobacterium*-rich sludge. International Journal of Hydrogen Energy, v. 33, p. 1221-1231, 2008.

REN, N.; WANG, B.; HUANG, J. C. Ethanol-Type Fermentation from Carbohydrate in High Rate Acidogenic Reactor. Biotechnology and Bioengineering, v. 54, p. 428–433, 1997.

REN, N-Q.; GUO, W-Q.; WANG, X-J.; XIANG, W-S.; LIU, B-F.; WANG, X-Z.; DING, J.; CHEN, Z-B. Effects of different pretreatments methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy, v. 33, p. 4318-4324, 2008.

ROMÃO, B.B.; BATISTA, F.R.X.; FERREIRA, J.S.; COSTA, H.C.B.; RESENDE, M.M.; CARDOSO, V.L. Biohydrogen production through dark fermentation by a microbial consortium using whey permeate as substrate. Applied Biochemistry Biotechnology, v. 172, p. 3670-3685, 2014.

ROSSI, D.M.; COSTA, J.B.; SOUZA, E.A.; PERALBA, M.C.R.; SAMIOS, D.; AYUB, M.A.Z. Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. International Journal of Hydrogen Energy, v. 36, p. 4814-4819, 2011.

SAADY, N.M.C. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. International Journal of Hydrogen Energy, v. 38, p. 13172 – 13191, 2013.

SARGSYAN, H.; TRCHOUNIAN, K.; GABRIELIAN, L.; TRCHOUNIAN, A. Novel approach of ethanol waste utilization: Biohydrogen production by mixed cultures of dark and photo-fermentative bacteria using distillers grains. International Journal of Hydrogen Energy, v. 41, p. 2377-2382, 2016.

SEIFERT, K.; WALIGORSKA, M.; LANIECKI, M. Brewery wastewaters in photobiological hydrogen generation in presence of *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. International Journal of Hydrogen Energy, v. 35, p. 4085-4091, 2010.

SEVINC, P.; GÜNDÜZ, U.; EROGLU, I.; YUCEL, M. Kinetic analysis of photosynthetic growth, hydrogen production and dual substrate utilization by *Rhodobacter capsulatus*. International Journal of Hydrogen Energy, v.37, p. 16430-16436, 2012.

SHOW, K.Y.; LEE, D.J.; TAY, J.H.; LIN, C.Y.; CHANG, J.S. Biohydrogen production: Current perspectives and the way forward. International Journal of Hydrogen Energy, v. 37, p. 15616-15631, 2012.

SILVA, F.T.M.; MOREIRA, L.R.; FERREIRA, J.S.; BATISTA, F.R.X.; CARDOSO, V.L. Replacemente of sugars to hydrogen production by *Rhodobacter capsulatus* using dark fermentation effluent as substrate. Bioresource Technology, v. 200, p. 72-80, 2016.

SILVA, G. M.; SILVA, L. G. M.; OIKNINE, L.; DASSOLER, T. S. Produção biotecnológica de hidrogênio. Universidade Federal de Santa Catarina - Departamento de Engenharia Química e Alimentos. Florianópolis, 2009.

SIQUEIRA, P.F. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação de Mestrado em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

SRIKANTH, S.; MOHAN, S.V.; DEVI, M.P.; PERI, D.; SARMA, P.N. Acetate and butyrate as substrates for hydrogen production through photo-fermentation: Process optimization and combined performance evaluation. International Journal of Hydrogen Energy, v.34, p.7513-7522, 2009.

SU, H.; CHENG, J.; ZHO, J.; SONG, W.; CEN, K. Combination of dark and photo-fermentation to enhance hydrogen production and energy conversion efficiency. International Journal of Hydrogen Energy, v. 34, p. 8846-8853, 2009.

TIAN. X.; LIAO. Q.; ZHU. X.; WANG. Y., ZHANG. P.; LI. J.; WANG. H. Characteristics of a biofilm photobioreactor as applied to photo-hydrogen production. Bioresource Technology, v. 101, p. 977–983, 2010.

UYAR, B.; SCHUMACHER, M.; GEBICKI, J.; MODIGELL, M. Photoproduction of hydrogen by *Rhodobacter capsulatus* from thermophilic fermentation effluent. Bioprocess Biosystems Engineering, v. 32, p.603–606, 2009.

VALDEZ-VAZQUEZ, I.; POGGI-VARALDO, H.M. Hydrogen production by fermentative consortia. Renewable and Sustainable Reviews, v. 13, p. 1000-1013, 2009.

VAN GINKEL, S. SUNG, S.; LAY, J.J. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. Environmental Science & Technology, v. 35, p. 4726-4730, 2001.

VARDAR-SCHARA, G.; MAEDA T.; WOOD, T. K. Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via fermentation. Microbial Biotechnology, v. 1, n. 2, p. 107-125, 2008.

VENETSANEAS, N.; ANTONOPOULOU, G.; STAMATELATOU, K.; KORNAROS, M.; LYBERATOS, G. Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. Bioresource Technology, v. 100, p. 3713-3717, 2009.

WALIGÓRSKA, M.; SEIFERT, K.; GÓRECKI, K.; MORITZ, M.; LANIECKI, M.I. Kinetic model of hydrogen generation by *Rhodobacter sphaeroides* in the presence of NH_4^+ ions. Journal of Applied Microbiology, v. 107, p. 1308–1318, 2009.

WANG, J.; WAN, W. Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. International Journal of Hydrogen Energy, v. 33, p. 53-92, 2008.

WANG, J.; WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. International Journal of Hydrogen Energy, v. 34, p. 799-811, 2009.

WEAVER, P. F.; WALL, J. D.; GEST, H. Characterization of *Rhodopseudomonas capsulate*. Archives of Microbiology, v. 105, p. 207-216, 1975.

WU, X.; ZHU, J.; DONG, C.; MILLER, C.; LI, Y.; WANG, L.; YAO, W. Continuous biohydrogen production from liquid swine manure supplemented with glucose using an anaerobic sequencing batch reactor. International Journal of Hydrogen Energy, v. 34, p. 6636-6645, 2009.

CAPÍTULO 8

APÊNCIDE A

A.1 - Avaliação da produtividade e da conversão de hidrogênio com o tempo na fermentação utilizando lactose como substrato.

Tempo (h)	Mol de H ₂ acumulado	Produtividade (mmol H ₂ /L.dia)	Conversão (mol H ₂ /mol hexose consumida)
0	0	0	0
12	2,49E-03	7,11	0,58
16	1,59E-02	34,00	1,51
20	3,31E-02	56,80	1,66
25	5,42E-02	74,30	2,20
36	6,00E-02	57,14	1,87
41	6,00E-02	50,20	1,80
46	6,01E-02	44,77	1,77
51	6,01E-02	40,40	1,66
55	6,01E-02	37,48	1,63
70	6,28E-02	30,77	1,70
79	6,79E-02	29,46	1,52
95	7,79E-02	28,13	1,39
102	9,10E-02	30,59	1,50
118	9,76E-02	28,36	1,35
123	1,06E-01	29,50	1,41
128	1,13E-01	30,32	1,46
142	1,28E-01	30,86	1,40
147	1,45E-01	33,74	1,49
152	1,62E-01	36,52	1,61
166	1,72E-01	35,49	1,59
171	1,84E-01	36,91	1,62
176	1,99E-01	38,70	1,65
190	2,12E-01	38,17	1,67
195	2,23E-01	39,28	1,68
200	2,33E-01	39,87	1,67
214	2,40E-01	38,44	1,67
219	2,51E-01	39,24	1,65
224	2,62E-01	40,09	1,56
238	2,72E-01	39,22	1,48
247	2,85E-01	39,53	1,50
263	2,95E-01	38,43	1,43
269	3,03E-01	38,57	1,44
285	3,07E-01	36,92	1,45
291	3,07E-01	36,16	1,41
295	3,07E-01	35,68	1,39

309	3,08E-01	34,17	1,35
314	3,08E-01	33,63	1,34
319	3,08E-01	33,10	1,33
333	3,09E-01	31,77	1,28
340	3,09E-01	31,12	1,26
357	3,10E-01	29,74	1,24
364	3,10E-01	29,17	1,23
381	3,10E-01	27,87	1,20
386	3,10E-01	27,54	1,19
411	3,10E-01	25,87	1,15
428	3,11E-01	24,89	1,15
449	3,11E-01	23,75	1,11

A.2 - Avaliação da produtividade e da conversão de hidrogênio com o tempo na fermentação utilizando glicose como substrato.

Tempo (h)	Mol de H ₂ acumulado	Produtividade (mmol H ₂ /L.dia)	Conversão (mol H ₂ /mol hexose consumida)
0	0	0	0
12	1,22E-02	34,74	0,86
16	3,99E-02	85,41	1,16
20	6,26E-02	107,33	1,31
25	7,35E-02	100,85	1,22
36	7,36E-02	70,06	0,97
41	7,36E-02	61,54	0,90
46	7,49E-02	55,79	0,86
60	7,68E-02	43,89	0,84
69	8,17E-02	40,59	0,81
85	9,06E-02	36,53	0,77
91	1,01E-01	37,89	0,83
111	1,34E-01	41,36	1,03
117	1,50E-01	44,07	1,10
132	1,73E-01	44,83	1,09
137	1,92E-01	48,02	1,16
144	2,11E-01	50,27	1,24
156	2,44E-01	53,70	1,32
161	2,65E-01	56,35	1,39
168	2,87E-01	58,59	1,45
180	3,21E-01	61,15	1,60
185	3,37E-01	62,47	1,64
192	3,50E-01	62,51	1,62
204	3,58E-01	60,15	1,56
214	3,64E-01	58,26	1,54
229	3,64E-01	54,45	1,54
238	3,66E-01	52,74	1,48
253	3,71E-01	50,23	1,39

262	3,73E-01	48,87	1,36
277	3,76E-01	46,51	1,37
300	3,78E-01	43,21	1,28
305	3,79E-01	42,61	1,26
324	3,81E-01	40,31	1,22
333	3,81E-01	39,23	1,23
348	3,81E-01	37,54	1,23
357	3,81E-01	36,60	1,23
372	3,81E-01	35,12	1,23
381	3,81E-01	34,30	1,23
396	3,81E-01	33,00	1,23
422	3,81E-01	30,97	1,23

A.3 - Avaliação da produtividade e da conversão de hidrogênio com o tempo na fermentação utilizando lactose e glicose alternados como substrato.

Tempo (h)	Mol de H ₂ acumulado	Produtividade (mmol H ₂ /L.dia)	Conversão (mol H ₂ /mol hexose consumida)
0	0	0	0
12	4,40E-03	12,58	0,70
16	2,82E-02	60,39	2,24
20	5,89E-02	100,94	2,67
25	9,63E-02	132,06	3,40
36	1,07E-01	101,56	3,13
41	1,07E-01	89,20	3,01
46	1,07E-01	79,53	2,75
60	1,07E-01	60,99	2,73
69	1,07E-01	53,05	1,94
85	1,11E-01	44,95	1,51
91	1,11E-01	42,00	1,43
111	1,32E-01	40,74	1,58
117	1,43E-01	41,92	1,63
132	1,84E-01	47,84	1,85
137	2,04E-01	51,13	2,02
144	2,21E-01	52,51	2,17
156	2,47E-01	54,32	2,12
161	2,47E-01	52,64	2,03
168	2,67E-01	54,56	2,12
180	2,84E-01	54,12	2,10
185	2,84E-01	52,66	2,07
192	2,84E-01	50,75	2,02
204	2,84E-01	47,77	1,94
214	2,84E-01	45,54	1,88
229	2,84E-01	42,56	1,86
238	2,86E-01	41,23	1,75
253	2,90E-01	39,25	1,58

262	2,90E-01	37,91	1,52
277	2,90E-01	35,86	1,51
300	2,90E-01	33,11	1,42
305	2,92E-01	32,87	1,43
324	2,95E-01	31,27	1,39
333	2,96E-01	30,43	1,39
348	3,03E-01	29,82	1,43
357	3,03E-01	29,07	1,43
372	3,27E-01	30,14	1,54
381	3,51E-01	31,58	1,65
396	3,98E-01	34,47	1,88
422	4,55E-01	36,94	2,14
445	4,96E-01	38,22	2,34
469	4,96E-01	36,27	2,34
492	5,16E-01	35,95	2,29
516	5,24E-01	34,79	2,27
540	5,34E-01	33,88	2,00
549	5,34E-01	33,33	2,00
564	5,36E-01	32,58	1,91
570	5,36E-01	32,24	1,90
592	5,41E-01	31,33	1,82
614	5,41E-01	30,21	1,78
637	5,41E-01	29,12	1,71
660	5,41E-01	28,11	1,68
683	5,41E-01	27,16	1,67
706	5,41E-01	26,28	1,67
719	5,41E-01	25,81	1,67
730	5,41E-01	25,42	1,67
742	5,42E-01	25,03	1,64
760	5,42E-01	24,43	1,60
779	5,46E-01	24,04	1,52
802	5,51E-01	23,54	1,50
809	5,52E-01	23,39	1,49
828	5,56E-01	23,04	1,48
835	5,56E-01	22,85	1,48
851	5,59E-01	22,52	1,48
861	5,59E-01	22,26	1,46
875	5,63E-01	22,07	1,44
884	5,63E-01	21,84	1,40
898	5,65E-01	21,56	1,38
907	5,65E-01	21,34	1,38
921	5,65E-01	21,02	1,38
930	5,65E-01	20,82	1,38

A.4 - Avaliação da produtividade e da conversão de hidrogênio com o tempo na fermentação utilizando lactose e glicose de forma simultânea como substrato.

Tempo (h)	Mol de H ₂ acumulado	Produtividade (mmol H ₂ /L.dia)	Conversão (mol H ₂ /mol hexose consumida)
0	0	0	0
12	2,75E-02	78,68	1,62
17	7,11E-02	143,38	2,84
24	1,18E-01	168,27	1,25
35	1,71E-01	167,31	1,45
41	1,99E-01	166,26	1,49
48	2,25E-01	160,42	1,52
59	2,50E-01	145,09	1,55
71	2,70E-01	130,42	1,46
87	2,90E-01	114,35	1,44
106	3,08E-01	99,65	1,53
129	3,29E-01	87,55	1,42
136	3,47E-01	87,57	1,41
154	3,66E-01	81,38	1,34
161	3,80E-01	80,92	1,41
177	4,18E-01	80,92	1,47
187	4,50E-01	82,47	1,53
201	4,97E-01	84,70	1,49
210	5,29E-01	86,30	1,53
226	5,63E-01	85,45	1,48
235	5,89E-01	85,87	1,52
249	6,58E-01	90,62	1,50
258	6,80E-01	90,37	1,51
274	7,03E-01	88,02	1,42
297	7,24E-01	83,58	1,41
304	7,40E-01	83,48	1,34
321	7,85E-01	83,84	1,31
328	8,02E-01	83,88	1,28
345	8,22E-01	81,68	1,23
372	8,40E-01	77,46	1,25
397	8,63E-01	74,49	1,23
422	8,85E-01	71,88	1,20
465	8,85E-01	65,23	1,18