



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



**Otimização das variáveis que influenciam a produção de hidrogênio por
fermentação escura**

Betânia Braz Romão

UBERLÂNDIA - MG
2015



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



**Otimização das variáveis que influenciam a produção de hidrogênio por
fermentação escura**

Betânia Braz Romão

Orientadora:

Dra. Vicelma Luiz Cardoso

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos

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

R766o Romão, Betânia Braz, 1984-
2015 Otimização das variáveis que influenciam a produção de hidrogênio
por fermentação escura / Betânia Braz Romão. - 2015.
110 f. : il.

Orientadoras: Vicelma Luiz Cardoso, Fabiana R. Xavier Batista e
Juliana de Souza Ferreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Engenharia Química.

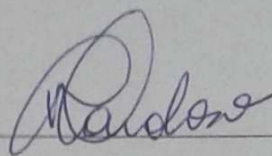
Inclui bibliografia.

1. Engenharia química - Teses. 2. Biohidrogênio - Teses. 3. Soro do
leite - Teses. 4. Fermentação - Teses. I. Cardoso, Vicelma Luiz. II.
Batista, Fabiana R. Xavier. III. Ferreira, Juliana de Souza. IV.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química. IV. Título.

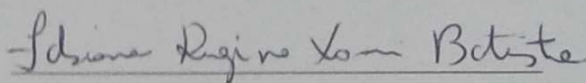
CDU: 66.0

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISISTOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ENGENHARIA QUÍMICA EM 17/04/2015

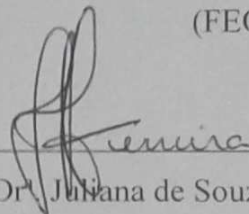
BANCA EXAMINADORA:



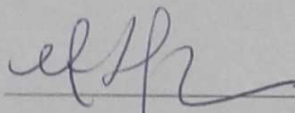
Prof.^a, Dr.^a, Vicelma Luiz Cardoso
Orientadora (FEQUI/UFU)



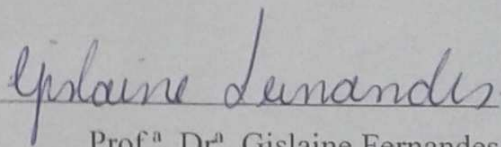
Prof.^a, Dr.^a, Fabiana R. Xavier Batista
(FEQUI/UFU)



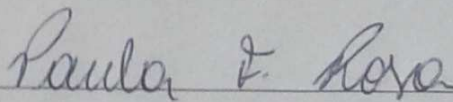
Prof.^a, Dr.^a, Juliana de Souza Ferreira
(FEQUI/UFU)



Prof.^a, Dr.^a, Miria H. Miranda Reis
(FEQUI/UFU)



Prof.^a, Dr.^a, Gislaine Fernandes
(IFTM/Campus Uberaba)



Prof.^a, Dr.^a, Paula R. Rosa
(DEQ/UFSCar)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pelos dons que me concedeu os quais possibilitaram que eu chegasse até aqui.

Agradeço aos meus pais João Batista e Neiva pelos ensinamentos, pela dedicação, pelo amor incondicional e por todo o esforço que fizeram para que eu me tornasse o que sou e chegasse onde cheguei. Essa conquista é para vocês. Ao meu irmão e a todos os familiares que de alguma forma contribuíram e torceram para que tudo desse certo.

Ao meu namorado que esteve comigo durante a realização desse trabalho me ajudando em todos os momentos de dificuldades, obrigada pelo carinho, pelo apoio, pelos ensinamentos e pela paciência. Você foi fundamental para que esse sonho tornasse realidade.

À Prof^a Vicelma pela confiança depositada em mim para o desenvolvimento deste trabalho, por todos os ensinamentos passados durante esses quatro anos, os quais me ajudaram a evoluir profissionalmente e pessoalmente.

Às Prof^{as} Fabiana e Juliana pela paciência, pela amizade e por toda a colaboração que deram para o desenvolvimento desse trabalho. A vocês meu muito obrigada!

Ao colega de pesquisa e amigo Felipe que foi meu braço direito no laboratório, ajudou-me com a parte experimental no momento em que mais precisei. Você também faz parte dessa conquista. Obrigada pelas horas que se dedicou para que esse trabalho continuasse evoluindo.

Às minhas amigas que sempre me estenderam a mão nos momentos que mais precisei, em especial aquelas que me acolheram em suas casas possibilitando assim que eu continuasse a pesquisa. Não tenho palavras para agradecer por tudo o que vocês fizeram por mim, pelas horas que passamos trocando confidências, pelos conselhos, pelas palavras amigas que me deram força nos momentos que achava que não daria conta de chegar ao fim, pelas brincadeiras e pelos sorrisos amigos. Serei eternamente grata a vocês.

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

Aos colegas de laboratório, que de forma direta ou indireta contribuíram para o meu crescimento profissional. Obrigada pelos ensinamentos, ajuda e amizade.

Aos funcionários da FEQUI pela colaboração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade concedida e a capes e a Vale S/A pelo suporte financeiro.

Aos meus pais, ao meu irmão e ao meu namorado.

“Não há problema que não possa ser solucionado pela paciência”

(Chico Xavier)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE SÍMBOLOS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2- OBJETIVOS.....	3
2.1- Geral	3
2.2- Específicos.....	3
CAPÍTULO 3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1- Matriz energética atual	4
3.2- Fontes de energia renováveis.....	6
3.3- Produção química de hidrogênio	8
3.4- Produção biológica de hidrogênio	10
3.5- Processo fermentativo	13
3.5.1- Fatores que afetam a produção de hidrogênio na fermentação escura.....	15
3.5.1.1- Inóculo	15
3.5.1.1.1- Pré-tratamentos aplicados ao inóculo da fermentação escura.....	18
3.5.1.2- Influência da fonte e da concentração do substrato	20
3.5.1.3- Efeito do pH	22
3.5.1.4- Efeito da temperatura	23
3.5.1.5- Macro e micro nutrientes	24
3.6- Permeado do soro de queijo.....	25
CAPÍTULO 4- MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1- Substrato	28
4.2- Inóculo	29
4.3- Testes preliminares	29
4.4- Estudo da concentração de sulfato ferroso, sulfato de amônio e pH na produção de hidrogênio	31

4.5- Avaliação da fermentação ao longo do tempo.....	35
4.6- Efeito das variáveis concentração de sulfato de magnésio e temperatura na produção de hidrogênio.	35
4.7- Processo fermentativo em escala ampliada	37
4.8- Fermentação com controle do pH.....	37
4.9- Fermentações em batelada sequencial.....	38
4.10- Tratamento térmico no inóculo	39
4.10.1-Primeiro tratamento.....	39
4.10.2- Segundo tratamento.....	39
4.11- Métodos analíticos.....	40
4.11.1- Quantificação de hidrogênio	40
4.11.2- Quantificação de açúcar e metabólitos formados na fermentação	40
4.11.3- Ferro dissolvido e ferro celular	41
4.11.4- Quantificação do crescimento celular	42
4.12- Rendimento.....	42
4.13- Produtividade.....	42
CAPÍTULO 5- RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1- Testes preliminares	43
5.1.1- Avaliação da concentração do inóculo.....	43
5.1.2- Avaliação da concentração do substrato	44
5.2- Avaliação do efeito das variáveis ferro, pH e amônio na fermentação escura.....	46
5.2.1- Avaliação do efeito do pH na produção de hidrogênio.....	55
5.2.2- Efeito da concentração de sulfato ferroso na produção de hidrogênio	57
5.2.3- Efeito da concentração de sulfato de amônio na produção de hidrogênio.	58
5.3- Avaliação da fermentação ao longo do tempo.....	60
5.3.1- Rotas metabólicas na produção de hidrogênio.....	63
5.4- Avaliação da influência das variáveis temperatura e magnésio no processo fermentativo	65
5.5- Processo fermentativo em escala ampliada	71
5.6- Fermentação com controle de pH.....	73
5.7- Fermentação em batelada sequencial	75
5.8- Pré-tratamento térmico	83
6.1 - Conclusões.....	89
6.2 - Sugestões para trabalhos futuros	90
CAPÍTULO 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

CAPÍTULO 8- APÊNDICE A 103

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – a) Suprimento de energia primária global de 1971 a 2011. b) Percentual do suprimento de energia para diferentes fontes de energia no ano de 2011(IEA, 2013).....	5
Figura 3.2 – Digestão anaeróbia (GUO et al., 2010).....	16
Figura 4.1 – Permeado do soro de queijo utilizado como substrato na fermentação.	28
Figura 4.2 – Inóculo utilizado para produção de hidrogênio.....	29
Figura 4.3 – Reator utilizado para a produção de hidrogênio.	30
Figura 4.4 – Ampolas gasométricas utilizadas para armazenar o biogás produzido.....	30
Figura 4.5 – Unidade experimental.	37
Figura 4.6 – Cromatógrafo utilizado para análise do biogás formado.	40
Figura 4.7 – Cromatógrafo utilizado na análise dos metabolitos formados e na quantificação do substrato.....	41
Figura 4.8 – Espectro de absorção atômica utilizado para realizar a quantificação do íon ferro.	41
Figura 5.1 – Diagrama de Pareto com variáveis estudadas para as respostas conversão (a) e produtividade (b) de hidrogênio.	48
Figura 5.2 – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta conversão de hidrogênio em função (a) pH e FeSO_4 (g/L); (b) pH e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L); e (c) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e FeSO_4 (g/L). Todos os ensaios ocorreram em condições anaeróbias, no escuro e com temperatura ambiente.	49
Figura 5.3 – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta produtividade de hidrogênio em função (a) pH e FeSO_4 (g/L); (b) pH e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L); e (c) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e FeSO_4 (g/L). Todos os ensaios ocorreram em condições anaeróbias, no escuro e com temperatura ambiente.	50
Figura 5.4 – Diagrama de Pareto com variáveis estudadas para as respostas conversão e produtividade de hidrogênio.....	52
Figura 5.5 – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta conversão de hidrogênio em função (a) pH e FeSO_4 (g/L); (b) pH e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L); e (c) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e FeSO_4 (g/L). Todos os ensaios ocorreram em condições anaeróbias, no escuro e com temperatura ambiente.	53
Figura 5.6 – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta produtividade de hidrogênio em função (a) pH e FeSO_4 (g/L); (b) pH e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L); e (c) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e	

FeSO ₄ (g/L). Todos os ensaios ocorreram em condições anaeróbias, no escuro e com temperatura ambiente.	54
Figura 5.7 – Produtividade (mmolH ₂ /L·dia) (□), conversão (molH ₂ /mol substrato consumida) (▲) e pH(■) durante o processo fermentativo a condição inicial ótima (pH = 7.0, C _{FeSO₄} = 0.6 g/L, C _{(NH₄)₂SO₄} = 1.5 g/L).....	61
Figura 5.8 – Variação da concentração de ferro dissolvido (mg/L) (●), concentração de célula (g/L) (★) e variação da concentração de ferro celular (mg/L) (○) durante o processo fermentativo a condição inicial ótima (pH = 7.0, C _{FeSO₄} = 0.6 g/L, C _{(NH₄)₂SO₄} = 1.5 g/L).	62
Figura 5.9 – Variação da concentração dos metabólitos formados (ácido acético (☆), ácido butírico (■), ácido propiônico (▲), ácido láctico (○), etanol (●)) durante os ensaios da fermentação escura utilizando cultura mista anaeróbica nas condições ótimas iniciais ((pH de 7.0, C _{FeSO₄} de 0.6 g/L, C _{(NH₄)₂SO₄} de 1.5 g/L).	63
Figura 5.10 – Diagrama de Pareto com variáveis significativas para as respostas conversão (a) e produtividade de hidrogênio (b).	66
Figura 5.11 – Superfície de resposta e curva de contorno para a (a) conversão e (b) produtividade de hidrogênio em relação às variáveis sulfato de magnésio e temperatura.....	68
Figura 5.12 – Produtividade e conversão (a) e metabolitos (b) obtidos do processo fermentativo nas condições otimizadas sem controle de pH.....	72
Figura 5.13 – Produtividade e conversão (a) e metabolitos (b) obtidos do processo fermentativo nas condições otimizadas e com pH controlado em 6,5.....	73
Figura 5.14 – Produtividade e conversão (a) e metabolitos (b) obtidos do processo fermentativo nas condições otimizadas e com pH controlado em 5,5.....	74
Figura 5.15 – Produtividade, conversão (a) e metabólitos (b) obtidos do processo fermentativo nas condições otimizadas com retirada de 233 mL de meio durante o processo e com pH controlado em 5,5 com reposição de nutrientes.	76
Figura 5.16 – Produtividade, conversão (a), metabolitos (b) e crescimento celular (c) obtidos do processo fermentativo nas condições otimizadas com retirada e de 466 mL de meio durante o processo e com pH controlado em 5,5.....	78
Figura 5.17 – Produtividade e conversão (a), metabólitos (b) e crescimento celular (c) obtidos do processo fermentativo nas condições otimizadas com retirada e de 466 mL de meio durante o processo com cortes de 24 h e com pH controlado em 5,5.	81

Figura 5.18 – Produtividade e conversão (a), metabólitos (b) e crescimento celular (c) obtidos do processo fermentativo nas condições otimizadas com retirada total de meio durante o processo e com pH controlado em 5,5.....	83
Figura 5.19 – Produtividade, conversão (a) e metabólitos (b) obtidos na fermentação a 30 °C utilizando como inóculo bactérias tratadas a 93 °C por 15 min.	84
Figura 5.20 - Produtividade, conversão (a) e metabólitos (b) obtidos na fermentação a 50 °C utilizando como inóculo bactérias tratadas a 93 °C por 15 min.	85
Figura 5.21 – Produtividade, conversão (a) e metabólitos (b) obtidos na fermentação a 70 °C utilizando como inóculo bactérias tratadas a 93 °C por 15 min.	86
Figura 5.22 – Produtividade, conversão (a) e metabólitos (b) obtidos na fermentação a 30°C utilizando como inóculo bactérias tratadas a 50 °C por 15 dias.	87
Figura 5.23 – Produtividade, conversão (a) e metabólitos (b) obtidos na fermentação a 50 °C utilizando como inóculo bactérias tratadas a 50 °C por 15 dias.	87
Figura 5.24 – Produtividade, conversão (a) e metabólitos (b) obtidos na fermentação a 70 °C utilizando como inóculo bactérias tratadas a 50 °C por 15 dias.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Consumo de energia no Brasil em toneladas equivalentes de petróleo (tep) por fonte (MME, 2013).....	6
Tabela 4.1 – Características do substrato utilizado na fermentação realizado pela empresa Sooro Concentrado.	28
Tabela 4.2 – Níveis adotados para as variáveis do planejamento composto central $2^{(3)}$	32
Tabela 4.3 – Matriz do planejamento composto central 2^3 com os valores codificados e originais das variáveis.	32
Tabela 4.4 – Níveis adotados para as variáveis do segundo planejamento composto central $2^{(3)}$	34
Tabela 4.5 – Matriz do planejamento composto central 2^3 com os valores codificados e originais das variáveis.	34
Tabela 4.6 – Níveis adotados para as variáveis do planejamento composto central $2^{(2)}$	36
Tabela 4.7 – Matriz do planejamento composto central 2^2 com os valores codificados e originais das variáveis.	36
Tabela 5.1 – Resultados do processo fermentativo variando o volume de inóculo.....	44
Tabela 5.2 – Resultados do processo fermentativo variando a concentração lactose	45
Tabela 5.3 – Resultado do PCC para as variáveis pH, concentração de sulfato ferroso e sulfato de amônio no processo fermentativo	47
Tabela 5.4 – Resultado do PCC para as variáveis pH, concentração de sulfato ferroso e sulfato de amônio no processo fermentativo.	51
Tabela 5.5 – Resultados de trabalhos que o uso de soro de queijo para produção de hidrogênio.....	55
Tabela 5.6 – Resultados dos modelos e dos experimentos na condição otimizada.....	63
Tabela 5.7 – Resultado do PCC para as variáveis temperatura e concentração de sulfato de magnésio no processo fermentativo.	65
Tabela 5.8- Avaliação da produtividade e da conversão de hidrogênio com o tempo em ampliação de escala.	72
Tabela 5.9- Resultados obtidos nos ensaios fermentativos com e sem controle de pH.	74
Tabela 5.10 – Resultados da fermentação em batelada sequencial sendo o volume do corte de 223 mL.....	75

Tabela 5.11 – Resultados da fermentação em batelada sequencial sendo o volume do corte de 466 mL.....	77
Tabela 5.12 – Resultados da fermentação em batelada sequencial sendo o volume do corte de 466 mL e o tempo do corte de 24 e 12 h.	80
Tabela 5.13 – Resultados da fermentação em batelada com retirado de todo meio fermentado e reciclo das células sendo o tempo do corte de 28 h.	82

LISTA DE SÍMBOLOS

PCC - Planejamento composto central

R^2 - Coeficiente de determinação

rpm - Rotações por minuto

X_{+1} - Valor da variável no nível superior

X_0 - Valor da variável no ponto central

X_{-1} - Valor da variável no nível inferior

X_n - valor codificado da variável ($n = 1, 2, \dots$)

X_1 - pH e temperatura;

X_2 - concentração de sulfato ferroso e concentração de sulfato de magnésio

X_3 - concentração de sulfato de amônio

K_1 e K_2 - constante de equilíbrio de uma reação

ΔH° - Entalpia padrão de uma reação

T_1 e T_2 - Temperatura de uma reação

ΔG° - Energia livre de Gibbs

RESUMO

No presente trabalho, estudou-se o aproveitamento do permeado do soro de queijo para produção de biohidrogênio durante a fermentação escura utilizando um consórcio microbiano em processo batelada. Avaliou-se a influência da porcentagem de inóculo e da concentração do substrato no processo fermentativo, sendo a faixa estudada de 0,8 a 13,3 % (v/v) e 10 a 80 g/L de lactose, respectivamente. Em seguida, três planejamentos composto central (PCC) foram realizados para verificar a influência de algumas condições de fermentação. Os resultados dos PCC's mostraram que os valores que apresentaram maior produtividade e conversão dentre as faixas estudadas foram: pH inicial igual a 7,0; 0,6 g/L de sulfato ferroso, 1,5 g/L de sulfato de amônio, temperatura de 30 °C e 1,28 g/L de sulfato de magnésio apresentando uma produtividade de 127,8 mmol H₂/L dia e uma conversão de 4,84 mol H₂/mol de substrato consumido. Após os testes preliminares, fermentações com ampliação de escala foram realizadas para verificar o comportamento da produção em função do tempo. Fermentações com controle de pH a 5,5 e 6,5 também foram estudadas sendo que o 5,5 favoreceu as rotas metabólicas de produção dos ácidos butírico (3,5 g/L) e acético (2,5 g/L) que levam à formação de hidrogênio. Além disso, o processo em batelada sequencial foi utilizado com intuito de prolongar a produção de biogás por um maior tempo. Nessa etapa, testou-se a renovação do meio variando o volume de meio novo, denominado corte e a frequência com que o corte foi realizado. O maior tempo de produção de H₂ por fermentação foi de 84 h, quando se empregou o corte de 466 mL de meio a cada 24 h nas primeiras 48 h de processo e, posteriormente, a cada 12 h. Dois pré-tratamentos térmicos (93 °C/15 min e 50 °C/15 dias) também foram aplicados ao inóculo com intuito de selecionar as bactérias produtoras de hidrogênio. Após o pré-tratamento realizaram-se fermentações a 30, 50 e 70 °C. Os melhores resultados foram alcançados quando a fermentação ocorreu a 30 °C com o inóculo tratado a 93 °C por 15 min, resultando numa produtividade de 128,8 mmol H₂/L dia.

Palavras-chave: Hidrogênio, fermentação escura, permeado do soro de queijo.

ABSTRACT

In this present study, the use of cheese whey permeate was studied aiming hydrogen production during dark fermentation using a microbial consortium in batch processes. Inoculum volume and substrate concentration were evaluated in the fermentative process in the range of 0.8 to 13.3 (v/v) and 10 to 80 g/L of lactose, respectively. Thereafter, three Central Composite Designs (CCD) were conducted in order to verify the influence of some conditions of fermentation. The results of the CCD's showed that the values that presented higher productivity and yield within the studied ranges were: pH equal to 7.0, 0.6 g/L of ferrous iron sulfate, 1.5 g/L of ammonium sulfate, 30°C and 1.28 g/L of magnesium sulfate, given a productivity of 127.8 mmol H₂/L.day and a yield of 4.84 mol H₂/mol of consumed substrate. Fermentations in scale-up were performed after the preliminary tests in order to verify the hydrogen production behavior in relation to time. Fermentations with pH control were also studied at pH values of 5.5 and 6.5. The fermentation at pH in 5.5 favored the metabolic routes of butyric acid production (3.5 g/L) and acetic acid (2.5 g/L) that lead to hydrogen synthesis. Moreover, sequential batch processes were tested aiming to obtain higher hydrogen production for longer time. In this study, the volume of withdrawn medium with addition of new medium and the time of medium removal were evaluated. The highest time of production, which was 84 h, was observed when 466 mL of medium were withdrawn in each 24 h in the first 48 h of fermentation, and subsequently, in each 12 h. Two different thermal pretreatments (93 °C/15 min and 50 °C/15 days) were also applied to the inoculum aiming to select hydrogen producing bacteria. After the pretreatment, fermentations were conducted at 30, 50 and 70 °C. The best results were achieved when fermentation occurred at 30 °C with the inoculum treated at 93 °C/15 min, resulting in productivity of 128.8 mmol H₂/L day.

Keywords: hydrogen, dark-fermentation, cheese whey permeate.

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO

A crise energética e a degradação ambiental são atualmente duas questões vitais para o desenvolvimento sustentável global. A energia proveniente de combustíveis fósseis, que representa 80 % do consumo contribui não só para a mudança do clima e do aquecimento global, mas também para um rápido esgotamento das fontes de energia naturais (GUO et al., 2010).

Isso tem despertado no mundo um interesse em busca de energia nova, limpa e renovável. Atualmente uma fonte de energia promissora que vem despertando o interesse global é o hidrogênio (H_2). O hidrogênio é um combustível altamente energético (286 kJ/mol) e limpo, uma vez que apenas água é produzida na sua combustão, não havendo liberação de monóxido de carbono que é o principal agente responsável pelo efeito estufa. Além disso, este combustível pode ser obtido de fontes renováveis (BAO; SU; TAN, 2012).

O hidrogênio é o elemento químico mais abundante no universo e quando resfriado, este combustível de baixo peso molecular ocupa um espaço equivalente a 1/700 do que ocuparia no estado gasoso. Esta é uma das razões pela qual H_2 é utilizado como combustível para propulsão de foguetes (GOMES NETO, 2005). Além da aplicação como combustível, o gás H_2 tem sido empregado na indústria química como reagente na hidrogenação de compostos de baixa massa molecular, sequestrador de oxigênio para prevenir oxidação e corrosão e também é usado na produção da amônia e metanol (ROSTRUP-NIELSEN, 2005).

O hidrogênio pode ser obtido de diversas formas, mas atualmente as mais utilizadas são a reforma a vapor do gás natural e a gaseificação de carvão. No entanto, estes processos são altamente dispendiosos e utilizam combustíveis fósseis que produzem gases do efeito estufa. Diante dessas perspectivas, a produção de hidrogênio através de rota biológica assume primordial importância como alternativa atraente para a obtenção de energia limpa (SINHA e PANDEY, 2011).

Em geral, a produção de biohidrogênio ocorre através da redução do íon de hidrogênio catalisado por enzimas como a hidrogenase e nitrogenase. A produção biológica compreende as biofotólises direta e indireta, a produção fotossintética e a fermentação no escuro. A fermentação no escuro apresenta a vantagem de ter alta velocidade de produção em comparação com a fotofermentação efetuada por bactérias fotossintética ou a biofotólise de microalgas (DAS e VERZIROGLU, 2001).

Outra vantagem associada à obtenção de hidrogênio por rota biológica é a de que o processo ocorre em condições mais brandas de operação e as bactérias que fermentam no escuro utilizam diversos compostos como substratos, como por exemplo: glicose, amido, celulose e lactose, possibilitando a utilização de resíduos orgânicos como substratos, visto que estes são abundantes, de baixo custo e renováveis (DAS e VERZIROGLU, 2001).

As características da produção de hidrogênio por rota fermentativa o tornam um processo vantajoso quanto aos aspectos econômicos e ambientais (GUO et al., 2010). É importante salientar, contudo, que o rendimento de hidrogênio pode ser afetado por vários parâmetros, tais como a preparação do inóculo, a concentração de substrato, a temperatura, o pH, a presença de metais, o tipo de reator, dentre outros. Nesse sentido, várias pesquisas têm investigado a influência destes parâmetros na produção H_2 (SINHA e PANDEY, 2011; AVCIOGLU et al., 2011; AMORIM et al., 2009).

Com relação ao emprego de águas residuárias como matéria-prima, pode-se citar o uso do soro de queijo, que apresenta em sua composição a maior parte da lactose do leite é uma opção economicamente viável para a produção de hidrogênio por processos fermentativos (PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012). Processos de fermentação anaeróbios empregando o soro de queijo têm sido estudados por diversos autores (VENETSANEAS et al., 2009; CASTELLÓ et al., 2009; FERCHICHI et al., 2005). O soro em pó e o permeado também são empregados no processo de obtenção de hidrogênio (DAVILA-VAZQUEZ et al., 2008, 2009; ROSALES-COLUNGA et al., 2010; YANG et al., 2007), uma vez que este procedimento conduz a um rendimento teórico de 8 mol de hidrogênio por mol de lactose.

O aproveitamento do soro de queijo como substrato no processo de fermentação escura mostra-se como uma estratégia adequada, visto que este substrato apresenta uma composição nutricional apropriada para o metabolismo dos micro-organismos. Além disso, o uso do soro de queijo para a produção de hidrogênio representa uma forma alternativa de tratamento desta água residuária que possui alta carga orgânica (RICHARDS, 2002).

CAPÍTULO 2- OBJETIVOS

2.1- Geral

Este trabalho possui como objetivo geral estudar a produção de biohidrogênio por fermentação escura utilizando como substrato o permeado do soro de queijo e como inóculo um consórcio microbiano.

2.2- Específicos

- Selecionar a concentração de inóculo e de substrato que promoverem o aumento da produção de H_2 por fermentação escura;
- Otimizar as concentrações de sulfato ferroso, sulfato de amônio, sulfato de magnésio, além dos valores do pH e de temperatura empregada no bioprocessos;
- Estudar a cinética do processo de fermentação anaeróbia para a produção de hidrogênio em condição previamente determinada;
- Verificar a influência do controle de pH na produção de hidrogênio;
- Avaliar a fermentação em batelada sequencial;
- Avaliar a produção de hidrogênio após a execução de tratamentos térmicos no inóculo;

CAPÍTULO 3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1- Matriz energética atual

Desde os primórdios da vida humana, o homem tem buscado combustíveis para atender as necessidades energéticas do seu cotidiano. A evolução humana também foi acompanhada ao longo da história pela evolução da matriz energética em fontes de energia mais eficientes. O avanço industrial iniciado no século XVIII e que persiste até os dias atuais aumentou a necessidade de fontes com elevado potencial energético e que pudessem ser produzidas e comercializadas em larga escala. Esta necessidade fez com que o gás natural, o carvão mineral e o petróleo se tornassem os principais combustíveis utilizados pela sociedade moderna.

Dados estatísticos da Agência Internacional de Energia (IEA, 2013) apontam o domínio absoluto destas três fontes de energia mencionadas anteriormente desde a década de 1970, quando os dados começaram a ser divulgados pela organização (ver Figura 3.1). Juntos, petróleo, carvão mineral e gás natural corresponderam a 81,6 % do suprimento de energia primária do mundo no ano de 2011 (IEA, 2013).

Embora o uso destes combustíveis apresente vantagens em diversos aspectos, estas fontes de energia são de origem fóssil e portanto, não são renováveis. Além disto, a queima do petróleo, do gás natural e do carvão, tem elevado significativamente a concentração de gases do efeito estufa na atmosfera. Isto por sua vez, tem sido apontado como a principal causa de mudanças climáticas extremas no planeta, além de ser um risco ao aumento do nível dos oceanos, o que poderia provocar a inundação de cidades litorâneas. Somente para o ano de 2011, a IEA estimou que mais de 31 bilhões de toneladas de gás carbônico se acumularam na atmosfera devido à queima de combustíveis, sendo que o petróleo, o carvão mineral e o gás natural são juntos, responsáveis por 99,5 % deste acúmulo (IEA, 2013). Além destes problemas, a elevada dependência dos países em relação ao petróleo, aliada aos conflitos geopolíticos envolvendo os principais produtores, fazem com que o preço desta fonte energética oscile muito no mercado.

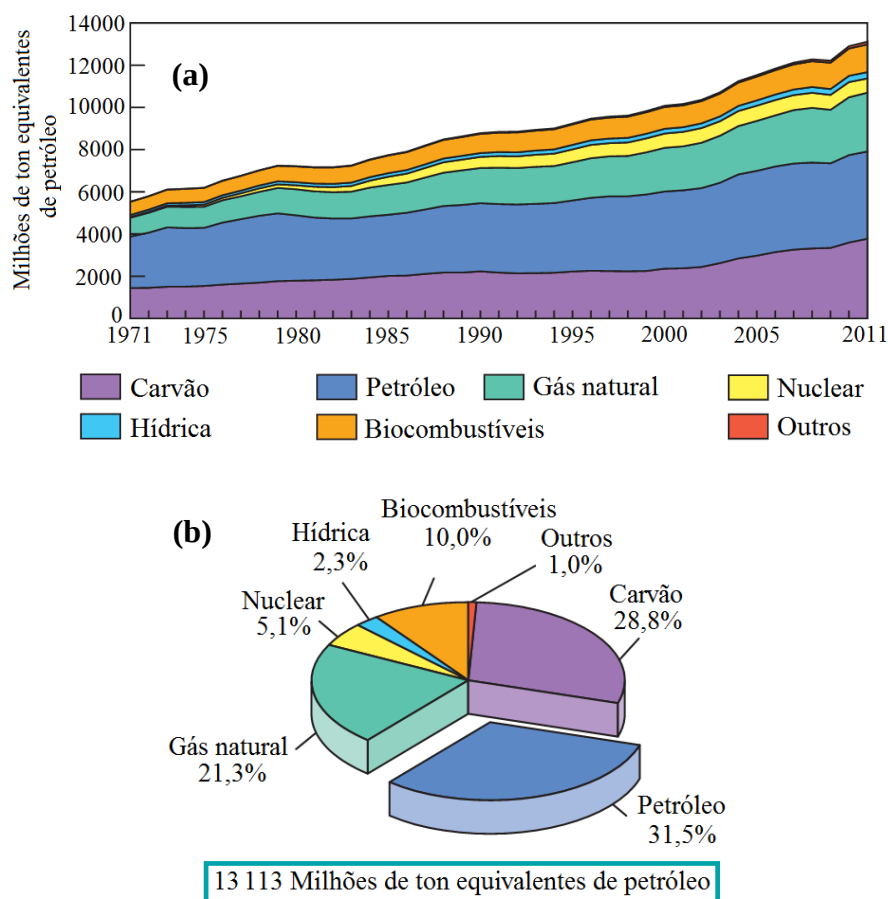


Figura 3.1 – a) Suprimento de energia primária global de 1971 a 2011. b) Percentual do suprimento de energia para diferentes fontes de energia no ano de 2011(IEA, 2013).

Todos estes fatores, associados à redução das reservas de energia de origem fóssil e ao aumento da demanda energética mundial têm incentivado à busca por novas fontes de energia, que sejam renováveis, ambientalmente limpas e de menor custo.

O Brasil é um país na vanguarda da utilização de energia limpa, sendo boa parte da sua matriz energética proveniente da biomassa e dos recursos hídricos. A oferta de energia do Brasil no ano de 2013 ultrapassou 296,2 milhões de toneladas equivalentes de petróleo, representando 2,1 % da oferta de energia mundial. O Brasil supera com grande vantagem a participação relativa das fontes de energia renováveis, cuja oferta representou 41,0 % do total de oferta de energia no ano de 2013 contra apenas 13,4 % da média mundial. Quando comparado aos países membros da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), a qual é constituída majoritariamente por países ricos, a vantagem é ainda maior: apenas 9,4 % da energia ofertada foram provenientes de fontes renováveis (MME, 2014).

Em relação à energia proveniente da biomassa, a oferta no país em 2013 foi de 84,5 milhões de toneladas equivalentes de petróleo, o que correspondeu a 28,5 % da matriz energética brasileira. Desta energia, os produtos da cana-de-açúcar (bagaço e etanol) corresponderam por 57,3 % e foram seguidos da lenha, com 29,6 %. Outras biomassas (resíduos da madeira e da agroindústria, biodiesel e lixo) corresponderam por 14,0 % (MME, 2014).

Conforme apresentado na Tabela 3.1, é possível verificar que apesar dos esforços do país na obtenção de uma matriz energética mais limpa, o petróleo é ainda o principal combustível que alimenta a economia do Brasil, correspondendo a 44,4 % do consumo energético em 2013. Juntamente com o carvão mineral e o gás natural, estas fontes não renováveis corresponderam ao consumo de 147,1 milhões de toneladas equivalentes de petróleo neste mesmo ano. Apesar disto, o consumo de bioenergia foi o que apresentou maior crescimento (4,3%) do ano de 2012 a 2013 (MME, 2013).

Tabela 3.1 – Consumo de energia no Brasil em toneladas equivalentes de petróleo (tep) por fonte (MME, 2013).

Mil tep			
Fonte	2012	2013	13/12 %
Derivados de	112.793	115.481	2,4
Petróleo			
Gás Natural	18.247	18.592	1,9
Carvão Mineral	13.234	13.034	-1,5
Eleticidade	42.861	44.404	3,6
Biomassa	65.902	68.738	4,3
Total	253.037	260.249	2,9

3.2- Fontes de energia renováveis

Um dos maiores desafios econômicos desde as últimas décadas é a obtenção de fontes de energia renováveis que causem pouco impacto ambiental e permitam a substituição dos combustíveis fósseis. Fontes convencionais de energia estão amplamente disponíveis e são relativamente de baixo custo, porém são caracterizadas por alta emissão de dióxido de carbono por quantidade de energia gerada. Comparadas às fontes de energia limpa, os combustíveis convencionais geralmente apresentam baixo custo econômico, mas isto não se

reflete nas questões sociais e ambientais. Por outro lado, os combustíveis renováveis têm baixo custo sócio-ambiental, porém, apresentam na maioria dos casos, maior custo econômico, o que muitas vezes inviabiliza sua utilização (STIGKA; PARAVANTIS; MIHALAKAKOU, 2014). Neste contexto, diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de viabilizar o uso das fontes energéticas sustentáveis.

Dentre os diversos combustíveis sustentáveis utilizados atualmente e/ou que apresentem potencial futuro, o etanol representa números significativos do mercado brasileiro desde a década de 1970, quando o governo, incentivado pela crise do petróleo, criou o Programa Nacional do Álcool (Pró-Alcool). Este programa viabilizou a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar e sua utilização em motores de automóveis leves, substituindo grande parte a demanda por gasolina. Ao longo de todos estes anos, estudos intensivos foram essenciais para fazer com que o etanol ocupasse uma posição competitiva no mercado. Todo o esforço fez com que o Brasil assumisse uma posição muito favorável em relação à característica de sua matriz energética (SOCCOL et al., 2010).

Desde o início dos anos 2000 o biodiesel produzido a partir de óleos vegetais também assumiu um papel de destaque no mercado, apresentando um crescimento exponencial na última década, onde a produção mundial saltou de menos de 1 milhão de toneladas em 2000 para mais de 16 milhões em 2010 (AJANOVIC e HAAS, 2014).

No Brasil, a criação do Programa Nacional de Produção e Utilização do Biodiesel em dezembro de 2004 objetivou a inclusão deste biocombustível na matriz energética brasileira, com enfoque na inclusão social e no desenvolvimento regional. A mistura do biodiesel ao óleo diesel de origem fóssil teve início em caráter autorizativo, porém em janeiro de 2008, entrou em vigor a mistura legalmente obrigatória de 2 % em todo o território nacional. Com o desenvolvimento do mercado brasileiro, o Conselho Nacional de Política Energética decidiu ampliar esse percentual sucessivamente até atingir 5% em janeiro de 2010, antecipando em três anos a meta previamente estabelecida (BRASIL, 2005).

Já em 2010 a produção nacional de biodiesel alcançou cerca de 2,11 milhões de toneladas, o que representou 13 % do volume mundial. A União Europeia é a principal produtora, e forneceu neste mesmo ano, 58 % do biodiesel produzido no mundo (AJANOVIC e HAAS, 2014).

Embora a produção de biocombustíveis de primeira geração, tais como o etanol e o biodiesel produzido a partir de oleaginosas, esteja aumentando nestes últimos anos, o uso destas fontes de energia apresenta alguns aspectos negativos. Dentre estes aspectos, destaca-se

principalmente a utilização de áreas de plantação que anteriormente seriam destinadas a produção de alimentos para produção de combustíveis, o que por sua vez pode comprometer o abastecimento do mercado alimentício levando ao aumento dos preços dos alimentos (AJANOVIC e HAAS, 2014; MITTAL e DECKER, 2013; SOCCOL et al., 2010).

Devido à estas limitações, diversas pesquisas tem se desenvolvido no objetivo de produzir biocombustíveis obtidos a partir de resíduos, tais como resíduos agroindustriais e materiais lignocelulósicos. Dentre estes biocombustíveis, destaca-se a produção de etanol de segunda geração, e também de biohidrogênio (MITTAL e DECKER, 2013; MARKOWSKI et al., 2014; CHOI e ANH, 2014).

É importante salientar que o hidrogênio tem despertado grande interesse como fonte de energia pelo fato da sua combustão não liberar nenhum gás tóxico ou causador do efeito estufa. A água é o único produto da reação com o oxigênio e portanto, é considerado um combustível ambientalmente limpo. Além disto, o hidrogênio apresenta maior densidade energética do que qualquer outro combustível conhecido e pode ser produzido por diversos métodos, que podem ser classificados em dois grandes grupos: processos químicos e processos biológicos.

Esses atrativos fizeram que as empresas Petrobrás, a cervejaria Sapporo e a Ergostech investissem na construção de uma planta piloto em Campinas São Paulo, para estudar produção de biohidrogênio. As três empresas pretendem dar espaço a produção de um tipo de combustível mais limpo e reduzir os custos de produção de biohidrogênio. O biohidrogênio tem um custo muito próximo ao da gasolina. Com o projeto, esse combustível seria produzido a 40 centavos de dólar por metro cúbico a menos que o custo atual. O barateamento possibilitaria a comercialização de combustível para automóveis por um preço reduzido, além de ser útil para outros setores da indústria. A utilização desse tipo recurso atrai cada vez mais a atenção da indústria de energia porque permite a redução dos gases causadores do efeito estufa, gerando energia através de produtos não-alimentícios (BRASILAGRO, 2009).

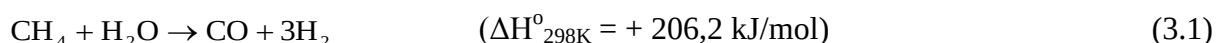
3.3- Produção química de hidrogênio

O hidrogênio é o elemento mais comum presente na crosta terrestre, porém não é encontrado em quantidades significativas na forma gasosa. Este elemento está presente na água, na biomassa e em diversos hidrocarbonetos fósseis.

Atualmente, a maior parte do hidrogênio produzido é utilizada na produção de amônia, que é a principal matéria-prima dos fertilizantes, além da fabricação de produtos de limpeza domésticos. As refinarias também são grandes consumidoras, pois necessitam do gás hidrogênio em processos químicos para remoção de enxofre da gasolina e na conversão de hidrocarbonetos em gasolina, metanol, etanol ou óleo diesel (NAVARRO; PEÑA; FIERRO, 2007).

A indústria de alimentos de óleos comestíveis também representa uma parcela do mercado de consumo, uma vez que o H_2 é um dos reagentes utilizados nas reações de hidrogenação catalítica de óleos comestíveis. Além destas atuais aplicações, este gás apresenta um grande potencial futuro de utilização como combustível (NAVARRO; PEÑA; FIERRO, 2007; HOLLADAY et al., 2009).

Atualmente, a produção de hidrogênio se restringe quase que exclusivamente aos processos químicos, como por exemplo, a reforma de hidrocarbonetos, a oxidação parcial e a decomposição não oxidativa. Dentre os métodos químicos, a reforma a vapor de hidrocarbonetos é o mais utilizado. Neste processo, o hidrocarboneto reage com o vapor de água em elevadas temperaturas para formar o gás de síntese, que é composto de monóxido de carbono e hidrogênio. Inúmeras matérias-primas, a maioria de origem fóssil, podem ser utilizadas, porém, o gás natural, que contém em sua maioria o gás metano, é a principal fonte de hidrogênio utilizada nesta reação (Equação 3.1) (HOLLADAY et al., 2009).

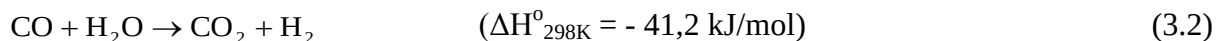


A maior limitação da reforma a vapor é a termodinâmica do processo, uma vez que a reação do hidrocarboneto com a água é altamente endotérmica. A alta conversão de hidrogênio só é possível em temperaturas acima de 900°C e pressões de aproximadamente de 30 bar. Por isto, necessita-se de fontes combustíveis para que a temperatura da reação seja alcançada e muitas vezes, utiliza-se a própria matéria-prima ou gases residuais como combustíveis para fornecer calor à reação (NAVARRO; PEÑA; FIERRO, 2007).

O gás de síntese produzido pode ser utilizado não apenas para produção de hidrogênio, mas também é uma matéria-prima importante na indústria petroquímica para a produção de diversos componentes, como por exemplo, alcoóis, éteres, cetonas, oleofinas, querosene, diesel, gasolina, lubrificantes, etc. (SILVA, 2008). No entanto, na fabricação de H_2 , uma

segunda etapa, conhecida como reação de deslocamento de água (“water gas shiftig”, WGS) é necessária para aumentar o rendimento final do processo.

A reação de deslocamento de água consiste na conversão do monóxido de carbono formado na primeira etapa da reforma em dióxido de carbono e hidrogênio (Equação 3.2).



O processo global, que envolve a etapa de reforma a vapor seguida da reação de deslocamento de água é capaz de produzir rendimentos de hidrogênio da ordem de 70 a 80% (MURATA et al., 2004).

Apesar da reforma por vapor ser o processo atualmente mais economicamente viável e portanto, mais utilizado industrialmente, este apresenta algumas desvantagens. A iniciativa de se produzir hidrogênio como combustível surgiu como uma alternativa de se obter energia limpa, livre das emissões de gases do efeito estufa. No entanto, a combustão do H_2 proveniente da reforma a vapor gera por sua vez, ainda que de forma indireta, gases CO e CO_2 , prejudicando a sustentabilidade do meio ambiente e indo contra o apelo do uso de energia limpa do hidrogênio. Além disto, as matérias-primas utilizadas no processo de reforma (hidrocarbonetos, alcoóis, óleos) são, na maioria das vezes, de natureza fóssil, não renovável. Como se não bastasse, estas matérias-primas se utilizadas para combustão direta são fontes de energia mais baratas do que o hidrogênio (SHEN et al., 2007; SUELVES et al., 2005).

3.4- Produção biológica de hidrogênio

Atualmente, a produção de hidrogênio por processos biológicos representa cerca de 1 % de toda produção. Porém, a utilização de micro-organismos ao invés de processos químicos convencionais tem despertado grande interesse principalmente por dois motivos: a utilização de fontes de energia renováveis e a operação em temperatura ambiente e pressão atmosférica (SINHA e PANDEY, 2011).

O crescente interesse do uso de hidrogênio como combustível do futuro ocorre principalmente pelo fato de que sua combustão não produz gases do efeito estufa, sendo portanto, um combustível ambientalmente limpo. Contudo, os métodos químicos convencionais de sua produção geram quantidades significativas destes gases. Além disto,

estes são processos energeticamente caros e utilizam matérias-primas de origem fóssil, não renováveis. Desta forma, o hidrogênio obtido por estes processos não pode ser considerado limpo. Neste contexto, a produção biológica de hidrogênio é vantajosa tanto do ponto de vista energético como da redução de gases do efeito estufa.

A formação de hidrogênio por ação dos micro-organismos ocorre pela catálise enzimática conforme a seguinte reação (Equação 3.3):



Existem três tipos de enzimas conhecidas que são responsáveis pela redução dos prótons de hidrogênio: nitrogenase, [Fe-Fe]-hidrogenase e [Ni-Fe]-hidrogenase. A eficiência de cada uma destas enzimas varia, sendo que as [Fe-Fe]-hidrogenases podem apresentar eficiência até 1000 vezes superior que as nitrogenases e cerca de 10 a 100 vezes maior do que as [Ni-Fe]-hidrogenases (MATHEWS e WANG, 2009).

Existem diferentes métodos de produção biológica de hidrogênio sendo os principais: a fotólise direta, a fotofermentação e a fermentação escura.

A fotólise direta é o método biológico mais estudado de produção de hidrogênio sendo realizado pela ação fotossintética de algas verdes ou cianobactérias (MATHEWS e WANG, 2009). Neste processo, a água é quebrada no fotossistema II (PSII) pela luz, produzindo prótons H^+ , O_2 e elétrons. Os elétrons passam por uma série de transportadores até a ferredoxina (fd) presente no fotossistema I (PSI), que por sua vez transfere-os para o carreador NADP, o qual assume a forma reduzida NAPH. Então, o NAPH leva os elétrons para o ciclo de Calvin, onde por uma série de reações, o CO_2 é reduzido em carboidratos, os quais são utilizados na respiração celular. Sob condições anaeróbias ou quando a energia é capturada em grandes quantidades, o excesso de elétrons produzidos é utilizado pela hidrogenase para produzir hidrogênio a partir da redução dos prótons H^+ . A vantagem desta tecnologia é que a água, um recurso barato e amplamente disponível, é utilizada como alimentação primária. Atualmente, este processo requer grandes áreas superficiais para absorção de energia luminosa suficiente (MATHEWS e WANG, 2009; HOLLADAY et al., 2009).

Um dos principais obstáculos da produção de hidrogênio por rota biológica é que as enzimas hidrogenases são extremamente sensíveis à presença de oxigênio. Como este gás é um dos produtos da fotólise direta, a eficiência do processo é comprometida, levando a baixos

rendimentos em hidrogênio. Por isto, novas pesquisas têm sido desenvolvidas para identificar ou modificar micro-organismos menos sensíveis ao oxigênio e/ou mudar a proporção da fotossíntese/respiração com o intuito de prevenir altas concentrações de oxigênio (MATHEWS e WANG, 2009; HOLLADAY et al., 2009).

Na fotofermentação, bactérias púrpuras não sulfurosas e bactérias verdes sulfurosas tais como *Rhodobacter spheroides* e *Chlorobium vibrioforme*, respectivamente, têm a capacidade de produzirem hidrogênio utilizando luz e ácidos orgânicos ou biomassa como substratos em condições anaeróbias. O sistema fotossintético destas bactérias difere de sistemas fotossintéticos comumente presentes na natureza pela incapacidade de oxidarem a água e a necessidade de substratos reduzidos. As nitrogenases são as principais enzimas responsáveis pela fotossíntese nestes micro-organismos e a produção de hidrogênio é catalisada em ambiente deficiente de nitrogênio. As bactérias púrpuras não sulfurosas são capazes de metabolizarem diversos tipos de ácidos orgânicos, o que é uma vantagem quando comparadas às bactérias verdes sulfurosas, que preferem utilizar H_2S , enxofre ou tiosulfato como substratos. O substrato é oxidado através do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e os elétrons então produzidos, são carregados até a ferredoxina, que os transfere para a nitrogenase, que por sua vez utiliza-os para produzir H_2 pela redução dos prótons H^+ (MATHEWS e WANG, 2009).

A fotofermentação apresenta algumas desvantagens quando comparados a outros métodos biológicos. A produção de H_2 pela nitrogenase requer o consumo de ATP e por isto este processo demanda alta quantidade de energia para a célula. Além disto, as taxas de reação da nitrogenase são menores do que aquelas obtidas pelas hidrogenases e a eficiência de conversão da energia luminosa é baixa, o que demanda grandes áreas para construção de fotobiorreatores anaeróbios (NI et al., 2006).

Apesar das desvantagens, a fotofermentação tem sido apontada como uma potencial alternativa para aumentar o rendimento da produção de biohidrogênio se realizada como etapa posterior à fermentação escura. Desta forma, os compostos orgânicos (principalmente ácido acético e butírico) produzidos pela fermentação anaeróbia na ausência de luz podem ser utilizados como substrato pelas bactérias fotofermentativas, levando à completa oxidação da matéria orgânica com consequente produção de H_2 e CO_2 , o que por sua vez, proporciona maior rendimento final do processo (ARGUN e KARGI, 2011).

Os processos fermentativos apresentam alta taxa de produção e são mais simples de serem operados quando comparados aos métodos fotossintéticos. A produção de hidrogênio

por fermentação também permite utilizar uma ampla variedade de compostos orgânicos como substrato. Além do uso de glicose e carboidratos simples ou polímeros como amido e celulose, a fermentação escura tem despertado grande interesse devido à possibilidade de se utilizar resíduos orgânicos para produção de biohidrogênio (SINHA e PANDEY, 2011). Muitos pesquisadores têm estudado o uso de resíduos agroindustriais provenientes de diversas matrizes como substrato para o processo de fermentação escura (CHOI e ANH, 2014; GUO et al., 2010; KOTSOPOULOS et al., 2009; FAN et al., 2006; VIJAYARAGHAVAN e AHMAD, 2006). Considerando que tais resíduos são abundantes, baratos, renováveis e biodegradáveis, a produção de H_2 por fermentação escura utilizando estas matérias-primas torna-se um processo amplamente vantajoso tanto em aspectos econômicos e ambientais (GUO et al., 2010).

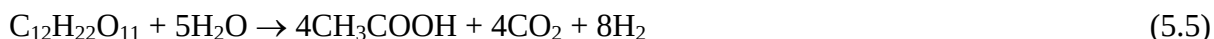
3.5- Processo fermentativo

A fermentação escura (*dark fermentation*) ou processo fermentativo é um método muito eficaz, pois pode ser operado de forma contínua para produção de hidrogênio e sem a necessidade de luz. Quando comparado com a produção através da biofotólise, a produção de hidrogênio por fermentação apresenta uma maior estabilidade e eficiência. Em escala industrial, o processo de fermentação é mais apropriado devido ao uso de um sistema simples de controle, de modo que os custos operacionais necessários são minimizados (AZWAR; HUSSAIN; ABDUL-WAHAB, 2014).

Outra vantagem é a possibilidade do uso de uma variedade de resíduos orgânicos como substrato, desempenhando assim um duplo papel: de redução de resíduos e produção de energia. Assim, a produção de hidrogênio por processo fermentativo tem recebido bastante atenção dos pesquisadores e cientistas nos últimos anos (AZWAR; HUSSAIN; ABDUL-WAHAB, 2014).

Na fermentação escura, o hidrogênio molecular é formado para manter o equilíbrio de elétrons, sendo que os prótons servem como receptores de elétrons possibilitando assim a oxidação dos transportadores de elétrons. Essa oxidação é importante, pois permite que os mesmos retornem para capturar mais elétrons liberados na oxidação do substrato. Este processo é geralmente associado a uma proteína intracelular ferro-enxofre chamada ferredoxina, que é carreadora de elétrons. A transferência de elétrons da ferredoxina para H^+ é catalisada pela enzima hidrogenase (CHEN et al., 2006).

Na fermentação escura, além da produção H_2 ocorre a formação de ácidos orgânicos. O rendimento final de hidrogênio depende da rota metabólica e dos produtos finais do processo. Com base na Equação 3.4, pode-se notar que, se não há produção de etanol, o rendimento teórico de hidrogênio em lactose pode atingir 8 mol H_2 /mol lactose (DAVILA-VAZQUEZ et al., 2011).

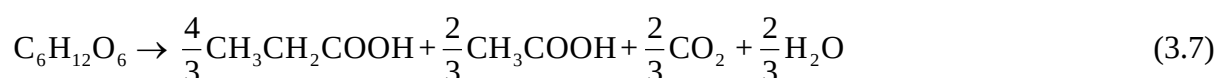


Embora diferentes substâncias orgânicas possam, em princípio, ser utilizadas como substrato, a estimativa do rendimento teórico da fermentação a partir do metabolismo da glicose é amplamente aceitável como referência (NTAIKOU et al., 2010). A produção de hidrogênio está diretamente relacionada com a razão dos produtos da reação butirato/acetato. Quando o ácido acético é o produto final, o rendimento máximo teórico obtido é de quatro mols de hidrogênio por mol de glicose (Equação 3.5). Para o ácido butírico, são produzidos dois mols de hidrogênio por mol de glicose (Equação 3.6) (CHONG et al., 2009):



Portanto, o maior rendimento teórico em H_2 está associado com a produção de acetato. Na prática, rendimentos maiores são obtidos para fermentações com a produção dos ácidos acético e butírico. Em culturas mistas, razão butirato/acetato de 3/2 é geralmente observada, resultando em uma produção média de hidrogênio de 2,5 mol H_2 /mol glicose. Quando ocorre a produção de ácido propiônico e compostos reduzidos, tais como alcoóis e ácido láctico, o rendimento é menor. A conversão de glicose em propionato (Equação 3.7) em etanol e ácido láctico (Equações 3.8 e 3.9) tem um balanço nulo na produção de H_2 .

A fim de maximizar o rendimento, o metabolismo microbiano deve ser direcionado para formação de ácidos graxos voláteis e evitar a formação de alcoóis e ácidos reduzidos (LEVIN; PITT; LOVE, 2004; GUO et al., 2010).





3.5.1- Fatores que afetam a produção de hidrogênio na fermentação escura

O rendimento em hidrogênio depende intimamente das condições de fermentação, e por isso, diversos fatores influenciam a produção deste gás na fermentação escura. Dentre estes fatores, pode-se destacar: condições do inóculo, pH, temperatura, presença de sais no meio reacional, tipo de substrato e configuração do reator (WONG; WU; JUANJ, 2014).

3.5.1.1- Inóculo

Durante a digestão anaeróbia, substratos orgânicos reduzidos são degradados e convertidos em diversos produtos, como metano, hidrogênio, dióxido de carbono, ácidos orgânicos e alcoóis por uma série de reações bioquímicas. Os principais estágios da degradação anaeróbia da matéria orgânica são hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Geralmente, estas etapas ocorrem sinergeticamente e de modo sucessivo, de forma que o produto de uma reação se torna substrato para a reação seguinte (Figura 3.2). Neste processo, bactérias hidrolíticas e fermentativas (acidogênicas) hidrolisam os substratos orgânicos reduzidos como polissacarídeos, proteínas e lipídeos e fermentam o hidrolisado com produção de ácidos orgânicos voláteis e alcoóis. Nesta etapa poderá ocorrer produção ou consumo de H_2 . As bactérias acetogênicas convertem os ácidos voláteis em acetato e hidrogênio, que por sua vez podem ser consumidos por bactérias metanogênicas para produção de metano e dióxido de carbono. A produção de acetato também pode ocorrer pela presença de bactérias homoacetogênicas, mas ao contrário das bactérias acetogênicas, que são produtoras de H_2 , as primeiras são consumidoras de hidrogênio, e utilizam-no para reduzir o CO_2 em acetato por metabolismo autotrófico (SAADY, 2013).

Portanto, se o objetivo é a produção de hidrogênio, é importante que a cultura responsável pela digestão anaeróbia atue de forma sinérgica, mas deve-se evitar a presença de bactérias consumidoras de H_2 , tais como bactérias metanogênicas e homoacetogênicas, as quais diminuem o rendimento do processo.

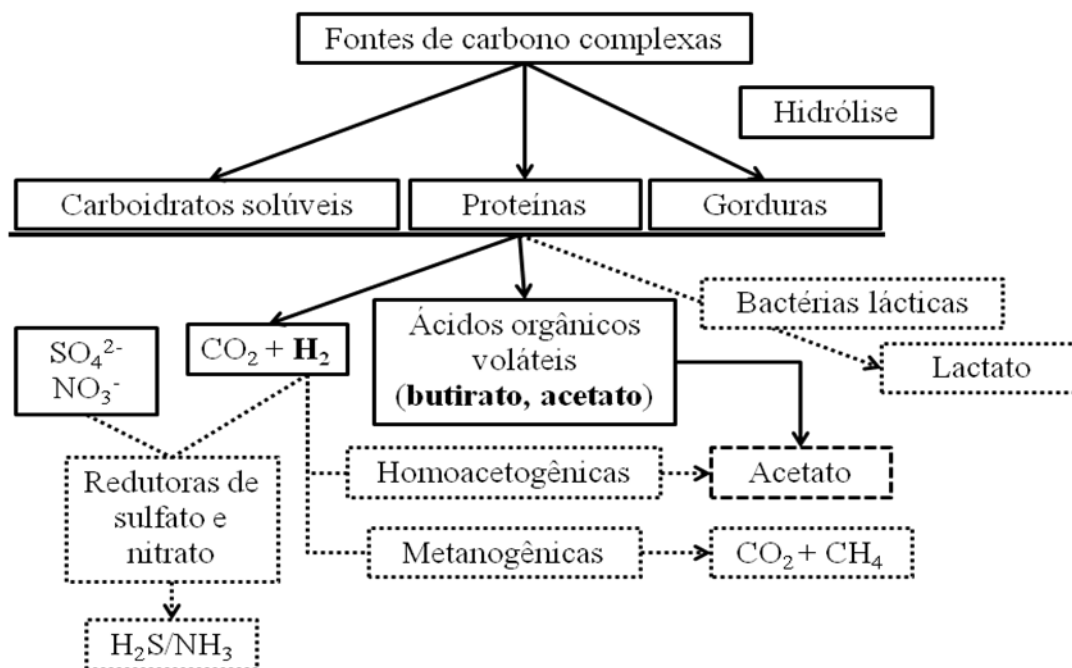


Figura 3.2 – Digestão anaeróbia (GUO et al., 2010)

Outros grupos de micro-organismos também podem consumir o hidrogênio produzido na fermentação escura. As bactérias redutoras de sulfato e nitrato utilizam o hidrogênio como substrato mesmo em concentrações abaixo de 0,02 ppm. Alguns resíduos, especialmente das indústrias de papel e celulose, frutos do mar, destilarias, óleos e gorduras e moinhos de milho contém altas concentrações de sulfato, o que prejudica a digestão anaeróbia e proporciona a produção de sulfeto de hidrogênio, o qual é prejudicial para o desempenho das células combustíveis (GUO et al., 2010).

Existem inúmeros tipos de micro-organismos capazes de produzirem hidrogênio em condições anaeróbias, sendo que as bactérias estritamente anaeróbias são as mais utilizadas. Bactérias do gênero *Clostridium* são comumente aplicadas na fermentação escura, dentre as quais encontram-se as espécies *C. acetobutyricum*, *C. butyricum*, *C. tyrobutiricum*, *C. beijerinckii* e *C. thermolacticum* (CHONG et al., 2009).

Clostridium acetobutyricum é uma bactéria de grande interesse comercial devido à sua capacidade de fermentar diversos substratos em produtos de alto valor, tais como acetona, butanol e etanol. A fermentação por este microrganismo apresenta duas fases distintas: a primeira, que é caracterizada por um rápido crescimento exponencial, é acompanhada de alta produção de hidrogênio e formação de ácidos, como os ácidos acético e butírico; e a segunda, que ocorre na fase estacionária de crescimento, caracteriza-se pela baixa produção de hidrogênio e alta produção de solvente. Estas fases são conhecidas como acidogênicas e solventogênicas, respectivamente e a determinação de qual rota metabólica será utilizada

depende dos níveis de ATP e NADH na célula. Portanto, é importante manter a fase acidogênica de crescimento para que a fermentação resulte em maior produção de H_2 (MATHEWS e WANG, 2009; CHONG et al., 2009).

Lin et al. (2007) verificaram que as espécies *C. acetobutyricum*, *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum* e *C. beijerinckii* apresentaram rendimentos em hidrogênio de 1,47 a 2,81 mol H_2 /mol glicose em testes conduzidos em batelada, o que representou um percentual de 36,7 a 70,2 % do máximo rendimento teórico obtido pela rota metabólica de produção de ácido acético. A realimentação do meio fermentado com glicose proporcionou maior produção significativa de H_2 quando *C. tyrobutyricum* e *C. beijerinckii* foram utilizados no meio enquanto que o mesmo não ocorreu para as espécies *C. butyricum* e *C. acetobutyricum*.

Bactérias anaeróbias facultativas realizam respiração aeróbia na presença de oxigênio, mas também apresentam metabolismo anaeróbio quando o meio está limitado em O_2 . A presença destas bactérias no meio de fermentação pode ser vantajosa, uma vez que, ao contrário das bactérias anaeróbias estritas, as facultativas não são inibidas pela presença de oxigênio. Dentre as bactérias anaeróbias facultativas produtoras de hidrogênio, as mais comuns são as *Enterobacter sp* (CHONG et al., 2009). Estudos indicam que existem duas rotas metabólicas de produção de H_2 em *E. aerogenes*: a rota de produção de ácido fórmico e a rota do NADH. No entanto, em micro-organismos facultativos, o maior rendimento em H_2 está associado geralmente à produção do ácido fórmico, este ácido é rapidamente convertido a H_2 pela ação da enzima formato hidrogênio liase (FHL) (LU et al., 2009; ZHANG; MA; XING, 2009; KUROKAWA e TANISHO, 2005).

Bactérias termófilas têm um grande potencial de aplicação, uma vez que o metabolismo em altas temperaturas favorece a cinética da reação e evita a contaminação do meio por bactérias consumidoras de H_2 . *Thermoanaerobacterium sp.* tem sido considerada uma bactéria eficiente no processo de produção de hidrogênio. Alguns trabalhos também têm sido realizados com bactérias do gênero *Thermotoga sp.* (CHONG et al., 2009).

Existem estudos em que o cultivo de uma cultura mista de micro-organismos apresentou melhores resultados do que a utilização de uma cultura pura (KOTAY e DAS, 2010; LIU et al., 2008; WANG et al., 2008). A utilização de dois ou mais micro-organismos no inóculo pode favorecer a produção de hidrogênio pela hidrólise de carboidratos e outros compostos orgânicos por um ou mais micro-organismos, enquanto que outros poderão então, metabolizar os compostos hidrolisados mais rapidamente. Isto faz também com que a inibição direta da atividade microbiana por metabólitos intermediários seja reduzida e

consequentemente o rendimento do processo aumenta. (SYDNEY et al., 2014; LI e LIU, 2012).

Apesar de bactérias estritamente anaeróbias apresentarem maiores rendimentos em hidrogênio, apresentam a desvantagem de serem inibidas mesmo em baixas concentrações de oxigênio. A suplementação do meio com agentes redutores, tais como a L-cisteína, é uma alternativa para manter o ambiente anaeróbio. Porém, isto leva ao aumento do custo de produção. O co-cultivo de micro-organismos estritamente anaeróbios com anaeróbios facultativos é uma alternativa eficiente para manter o meio livre de oxigênio, uma vez que este é rapidamente consumido pelas bactérias facultativas (CHONG et al., 2009).

Apesar das vantagens, o uso de culturas mistas no processo fermentativo pode trazer alguns problemas, como por exemplo, a presença de bactérias não-produtoras e/ou consumidoras de hidrogênio. Diversos tipos de pré-tratamentos têm sido aplicados ao inóculo da fermentação escura com objetivo de eliminar ou reduzir a carga destes micro-organismos indesejáveis ao processo (NTAIKOU et al., 2010).

3.5.1.1.1- Pré-tratamentos aplicados ao inóculo da fermentação escura

A eliminação de bactérias consumidoras ou não produtoras de hidrogênio (BCH) é importante para que ocorra maior conversão do substrato disponível no meio fermentativo para produção de H_2 . As bactérias produtoras de hidrogênio (BPH) geralmente apresentam capacidade de esporular-se e, portanto, são estáveis em ambientes adversos. Desta forma, os métodos aplicados ao inóculo para eliminação de bactérias indesejáveis são tratamentos drásticos que eliminam bactérias na forma vegetativa, na sua maioria, aquelas que não produzem ou consomem H_2 , e permite a germinação dos esporos das BPH que sobrevivem ao processo. Os principais micro-organismos indesejáveis a serem eliminados nos pré-tratamentos são archaeas metanogênicas e homoacetogênicas, responsáveis pela produção de metano e ácido acético, respectivamente, a partir do consumo de H_2 (YASIN et al., 2013).

Existem diversos tipos de pré-tratamentos do inóculo para produção de biohidrogênio, e estes podem ser classificados em tratamentos físicos e tratamentos químicos. Os tratamentos físicos são aqueles que utilizam o calor, ultrassom e radiação ultravioleta, enquanto que os tratamentos químicos incluem o choque de pH e ativação e inibição química (WONG; WU; JUANJ, 2014).

Dentre os métodos aplicáveis, o tratamento térmico parece ser o mais viável e é o mais aplicado devido a sua simplicidade, baixo custo e não requerer um elevado tempo, o que não ocorre nos tratamentos químicos. Diferentes binômios tempo/temperatura têm sido reportados na literatura e variam, de aproximadamente 80°C a 140°C e de 15 minutos a 3 h respectivamente. No entanto, para que o tratamento seja adequado é importante combinar baixa temperatura por um longo tempo ou alta temperatura por um curto tempo. A aplicação de altas temperaturas por um período prolongado é letal não apenas para as BCH, mas também para as BPH. Por outro lado, baixas temperaturas por um curto período não são suficientes para eliminar as BCH, além disso, a maior parte das BPH permanece na forma esporulada, o que impede o metabolismo de produção de H_2 (WONG; WU; JUANJ, 2014; YASIN et al., 2013).

O tratamento do inóculo com ultrassom tem sido estudado como uma alternativa para destruição das bactérias consumidoras de hidrogênio. Este método baseia-se na destruição da parede celular dos micro-organismos indesejáveis pelas ondas ultrassônicas. Além disso, as ondas ultrassônicas quando aplicadas ao meio de fermentação promovem a cavitação de compostos orgânicos complexos, aumentando a biodegradabilidade, a transferência de massa e as taxas de reações bioquímicas. Isto faz com que estas ondas apresentem um potencial de aplicação para produção de hidrogênio a partir de águas residuárias (GADHE; SONAWANE; VARMA, 2014).

Diversos parâmetros influenciam no processo, tais como densidade ultrassônica, dosagem, tempo e viscosidade do líquido. Gadhe, Sonawane e Varma (2014) estudaram alguns destes parâmetros na produção de biohidrogênio proveniente de águas residuárias de destilarias e observaram que o tratamento do meio com ultrassom aumentou a atividade da hidrogenase além de melhorar a digestão anaeróbia do efluente, o que proporcionou uma melhora na produção de H_2 de 20 a 40 %.

A radiação ultravioleta possui ação bactericida maior sobre as BCH em relação às BPH. Segundo Wong, Wu e Juanj (2014), recomenda-se um tempo de 15 minutos de exposição em UV como pré-tratamento do inóculo para enriquecê-lo em BPH é recomendado. No entanto, este tratamento é pouco eficiente principalmente em inóculos provenientes de lodos de digestão anaeróbia que apresentam partículas grandes e coloração escura, uma vez que nestas condições, a radiação não é bem transmitida.

O choque de pH é o tratamento químico mais utilizado e consiste em levar o inóculo à extremos de pH por um determinado período de tempo. Para os tratamentos ácidos, deve-se

baixar o pH para aproximadamente 3,0, enquanto que para tratamentos alcalinos, o pH é elevado para aproximadamente 12,0. Para muitos estudos encontrados na literatura, geralmente utiliza-se um tempo de tratamento ácido ou alcalino de aproximadamente 24 h (LIU et al, 2009; CHANG; LI; LIU, 2011; O-THONG; PRASERTSAN; BIRKELAND, 2009).

Embora o tratamento alcalino possa ser utilizado com o objetivo de enriquecer o inóculo com bactérias produtoras de hidrogênio, Wong, Wu e Juanj (2014) afirmaram que o tratamento ácido é mais eficiente, apresentando maiores rendimentos em H₂.

3.5.1.2- Influência da fonte e da concentração do substrato

Diversas fontes de substratos têm sido empregadas para a produção de biohidrogênio como: Farelo de arroz (FANG, LI, ZHANG, 2006), resíduos de alimentos ricos em carboidratos (KIM et al., 2009, 2008a, 2008b; WANG et al., 2010), trigo (ARGUN, KARGI, KAPDAN, 2009), soro de queijo, tofu e resíduos de processamento de batata (KIM et al., 2011a; VAN-GINKEL et al., 2005.; YANG et al., 2007; DAVILLA-VAZQUES et al., 2008).

Além de carboidratos outras fontes de carbono podem ser empregadas no processo fermentativo como a proteína e lipídios. No entanto a taxa de hidrólise de carboidratos é mais rápida comparada com a de lipídios. Lay et al. (2003) constataram que a produção de biohidrogênio quando o substrato é rico em carboidratos é vinte vezes mais rápida quando comparado com substratos ricos em lipídios e proteínas.

As águas residuárias também têm sido empregadas como fonte de substratos. Entretanto, as águas residuárias usualmente não apresentam os nutrientes necessários para a produção de hidrogênio. Neste caso para evitar suplementação de nutrientes no meio fermentativo uma alternativa é utilizar uma combinação de diferentes tipos de águas residuárias (WONG; WU; JUANJ, 2014).

A vinhaça é considerada o principal subproduto da indústria sucroalcooleira, devido ao seu elevado volume e potencial poluidor, sendo produzida a partir da destilação e fermentação da cana no processo de fabricação do álcool e na cristalização do caldo de cana para fabricação de açúcar (LUDOVICE, 1997).

Segundo Ludovice (1997), apesar de apresentar algumas variações em sua composição, em geral, a vinhaça é rica em nutrientes minerais como potássio, cálcio e enxofre, além de apresentar elevado teor de matéria orgânica (Demanda Bioquímica de

Oxigênio - DBO de 20.000 a 35.000 mg/L), com pH variando de 3,7 a 5. Devido as características apresentadas a vinhaça também tem sido estudada por diversos autores para a produção de hidrogênio como (WANG et al., 2013; CHU et al., 2011, SEARMSIRIMONGKOL et al., 2011).

A concentração do substrato também desempenha um papel fundamental no processo fermentativo. O aumento no rendimento está ligado ao aumento na concentração do substrato. ADAV et al. (2009) avaliaram a produção de hidrogênio utilizando celobiose como substrato, a faixa estudada foi de 2 g/L a 20 g/L. Os autores relataram um aumento no rendimento de 1,57 para 2,19 molH₂/mol glicose quando a concentração de celobiose foi aumentada 2 g/L para 5 g/L. Concentrações relativamente baixas são suficientes apenas para garantir o crescimento celular ficando restrita a produção de hidrogênio.

Entretanto o aumento excessivo nem sempre proporciona melhorias no rendimento. Quando o substrato encontra-se em excesso é rapidamente consumido e convertido a H₂ aumentando assim a pressão parcial de H₂. Esse aumento da pressão favorece a produção de metano pelas bactérias metanogênicas visto que o hidrogênio é o precursor para sua produção do mesmo. Por outro lado no caso da ineficiência no tratamento altas concentrações de substrato favorecem a produção de metano (WONG; WU; JUANJ, 2014).

Nos últimos anos, alguns estudos mostraram a viabilidade da utilização do soro de queijo para a produção de hidrogênio. Modalidades de substratos como efluentes contendo o soro de queijo (AZBAR e DOKGOZ, 2010; VENETSANEAS et al., 2009); soro de queijo em pó (DAVILA-VAZQUEZ et al., 2008; ROSALES-COLUNGA et al., 2010) e permeado do soro de queijo (YANG et al., 2007; ROSA; SANTOS; SILVA 2014) tem sido cada vez mais utilizadas.

A co-fermentação também tem sido utilizada para a produção de hidrogênio, Gioannis et al. (2003) relataram que o uso da mistura de substratos no processo de fermentação para obtenção de hidrogênio é motivada por objetivos concomitantemente, como: (a) combinação de diferentes tratamentos de resíduos, (b) capacidade de tratar resíduos que seria difíceis de tratar individualmente, (c) diluição de compostos potencialmente tóxicos e ou inibitórios, (d) controle interno de pH e (e) otimização das condições para a produção de hidrogênio.

Prakasham et al. (2009) avaliaram a produção utilizando uma mistura de xilose e de glicose como substrato. Os autores verificaram que o uso de co-substrato aumentou a produção de hidrogênio comparada com fermentações utilizando os substratos separadamente.

A maior produção foi de 1900 mL de hidrogênio para uma concentração de 5 g/L de substrato, sendo a proporção de 2:3 de glicose e xilose a um pH igual a 6.

3.5.1.3- Efeito do pH

O pH é um dos fatores mais importantes a ser controlado nos processos de digestão anaeróbia (CHU et al., 2008, ESPINOZA-ESCALANTE et al., 2009). Na verdade pH não afeta apenas os rendimentos de hidrogênio em culturas mistas, mas também é capaz de modificar espectro de co-produtos, desviando a rota metabólica e gerando impactos sobre a estrutura das comunidades microbianas, afetando assim a atividade da enzima (YE et al., 2007; TEMUDO; KLEEREBEZEM; LOOSDRECHT, 2007; GINKEL; SUNG; LAY, 2001). Relatos da literatura têm demonstrado que o aumento do pH aumenta a capacidade das bactéria para a produção de hidrogênio, porém níveis muito mais altos podem diminuir a capacidade produtora da bactéria.

O valor ótimo do pH depende da forma que o sistema esta sendo operado, a fonte de substrato utilizada, inóculo, e faixa de pH estudada. Resultados da literatura mostram que para resíduos alimentares a melhor faixa foi de 5,0 a 6,0 (KIM et al., 2004; DOI et al., 2009; KIM et al., 2006) ao passo que um pH neutro é recomendado para os resíduos vegetais e estrume de animais (LI e CHEN, 2007; ZHANG et al., 2007; KOTSOPOULOS et al., 2009). Percebe-se também uma diferença nos valores quando o reator é operado de forma continua ou em batelada. Li e Chen (2007), investigaram valores de pH iniciais, de 4 a 8, em batelada sem controle durante o processo. Os resultados mostraram que para a conversão da palha de milho em hidrogênio a melhor faixa foi pH 7 a 7,5. Esse resultado é explicado devido ao acúmulo de subprodutos, acetato e butirato, no meio que provoca uma queda do valor do pH durante o processo fermentativo, sendo assim pH mais elevado (ou seja, em torno da neutralidade) que proporcionou melhores rendimentos de hidrogênio.

Em reatores contínuos, em contraste, o pH é geralmente controlado sendo assim os valores ótimos encontram-se numa faixa de 5,0 - 6,5. ESPINOZA-ESCALANTE et al. (2009) observaram que para um reator semi-contínuo o valor ótimo de pH foi de 5,5 para a produção de hidrogênio. Sendo assim o pH ótimo, em termos de produção biohidrogênio, está dentro de uma faixa de 5,0 a 7,0. Favorecendo a atividade das hidrogenases e também o desenvolvimento microbiano durante o processo de digestão anaeróbia (LI e FANG, 2007).

O valor do pH durante a fermentação interfere também na formação de ácidos orgânicos. Butirato e acetato são os dois principais produtos da fermentação, sendo que em valores de pHs baixos o butirato é preferencialmente produzido. A formação destes dois ácidos é favorecida em pHs de 4,5 a 6,0. Enquanto que o pH neutro ou mais elevado favorece a formação de etanol e ou propionato (GUO et al., 2010).

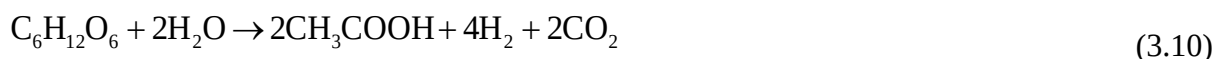
3.5.1.4- Efeito da temperatura

A temperatura assim como o pH é um dos parâmetros operacionais muito importante do processo fermentativo. A temperatura afeta a taxa de crescimento e a atividade do microrganismo (SINHA e PANDEY, 2011).

A digestão anaeróbia pode ser realizada nas condições mesofílica (25 a 40° C), termofílica (40 a 65 °C) ou hipertermofílica (> 70 °C). Os estudos mostram que existe uma divergência quanto à temperatura ótima. Valdez-Vazquez et al. (2005) relataram maiores rendimentos de hidrogênio na faixa termofílica comparada com a faixa mesofílica. Os autores verificaram que o subproduto dominante na condição termofílica foi o ácido acético e que para a condição mesofílica foi o ácido butírico (GHIMIRE et al., 2015).

Substratos provenientes de resíduos agrícolas requerem altas temperaturas para promover maiores rendimentos devido a hidrólise dos compostos, porém substratos facilmente biodegradáveis apresenta melhores rendimentos na condição mesofílica (GHIMIRE et al., 2015)

O efeito da temperatura na produção H_2 pode ser explicado termodinamicamente considerando as mudanças na energia livre de Gibbs e da entalpia padrão da conversão de glicose em acetato. Assumindo um rendimento teórico de 4 mol de H_2 por mol de glicose Equação (3.10) (SINHA e PANDEY, 2011).



$$\Delta G^\circ = -176,1 \text{ kJ/mol}$$

$$\Delta H^\circ = +90,69 \text{ kJ/mol}$$

Avaliando a energia livre de Gibbs e a entalpia da reação nota-se que a reação é de natureza endotérmica e pode ocorrer espontaneamente. A Equação de van'tHoff (3.11) pode ser utilizada para explicar o efeito da temperatura sobre a constante de equilíbrio.

$$\ln \frac{K_1}{K_2} = -\frac{\Delta H^\circ}{R} \left[\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right] \quad (3.11)$$

Com o aumento da temperatura, a constante de equilíbrio também aumenta visto que a reação é endotérmica. Assim, o aumento da temperatura de fermentação, mantendo constante a concentração do substrato proporciona um aumento na concentração de H₂ (SINHA e PANDEY, 2011).

Porém deve-se avaliar a temperatura ótima para cada micro-organismos, assim como para os consórcios microbianos pois elevadas temperaturas podem induzir a desnaturação térmica das proteínas que estão ligadas com a atividade enzimática (GIOANNIS et al., 2013).

Wang e Wan (2008a) estudaram o efeito da temperatura na produção de hidrogênio em processo batelada utilizando um consórcio microbiano como inóculo e glicose como substrato. Os autores observaram que o aumento na temperatura de 25 °C a 40 °C afetou positivamente o rendimento de hidrogênio alcançando um rendimento de 275,1 mLH₂/g glicose. Porém já o aumento de 40 °C à 55 °C provocou um decréscimo na produção. A temperatura ótima para o estudo foi de 40 °C.

3.5.1.5- Macro e micro nutrientes

Os macronutrientes essenciais e presentes na fermentação escura são o carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P). O carbono geralmente é obtido do substrato a partir do qual o hidrogênio é produzido. Este elemento pode estar na forma de açúcares, proteínas, lipídios etc. O nitrogênio pode estar em várias formas, tais como proteínas, nitrato, nitrito e amônio. A presença de amônio na fermentação é essencial, pois além de servir como um nutriente para o crescimento bacteriano fornece uma ligeira capacidade tamponante ao meio o que é importante devido à formação de ácidos orgânicos. No entanto, argumenta-se que o conteúdo de nitrogênio não é essencial, pois não influencia na produção do total de biogás, contudo pode afetar na fase *lag* do processo. Já o fósforo encontra-se presente sob a forma de fosfato que auxilia no crescimento microbiano (WONG; WU; JUANJ, 2014).

A produção de biohidrogênio requer micronutrientes essenciais para o metabolismo bacteriano durante a fermentação. Traços de metais como Na⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺ afetam o metabolismo dos micro-organismos produtores de H₂, devido ao fato de que estes elementos

são necessários para o crescimento celular, atuam como cofator de enzimas, nos processos de transporte e de desidrogenases (SINHA e PANDEY, 2011).

O ferro é um elemento importante para formação da hidrogenase e outras enzimas responsáveis pela produção de H_2 . É classificado de acordo com o componente de metal no local ativo, comumente Ni-Fe e Fe-Fe. Tem sido relatado que a ferro-enzofre afeta as funções primárias da proteína e funciona principalmente como um transportador de elétrons, além disso, está envolvido na oxidação de piruvato a acetil-CoA, a CO_2 e H_2 (WONG; WU; JUANJ, 2014).

Zhang e Shen (2006) estudaram o efeito da temperatura e da concentração de ferro na produção de hidrogênio utilizando como substrato sacarose e um consórcio microbiano. Os autores constataram que quando a temperatura de fermentação foi mantida a 25 °C um aumento na concentração de $FeSO_4$ de 200 a 800 mg/L provocava um efeito positivo na produção de hidrogênio. Para concentrações acima de 800 mg de $FeSO_4$ /L o efeito foi negativo. Já para as temperaturas de 35 °C e 40 °C o aumento na concentração de sulfato ferroso não apresentou efeito positivo no rendimento de hidrogênio, sendo as concentrações de $FeSO_4$ que apresentou melhor rendimento de hidrogênio para estas temperaturas foram 200 e 25 mg $FeSO_4$ /L respectivamente. Os autores observaram que, quando a temperatura ambiente é relativamente baixa, as bactérias precisam de concentrações maiores do íon ferroso para ativar a hidrogenase podendo assim oxidar a ferredoxina reduzida produzindo mais hidrogênio molecular.

A exigência de íons de magnésio no metabolismo bacteriano é principalmente devido à exigência específica dos ribossomos, também funciona como cofator de enzimas e é um dos constituintes das paredes das membranas celulares. O íon magnésio é um dos elementos mais abundantes no micro-organismo, desempenha um papel crucial como ativador de muitas quinases e sintetases. A maioria das enzimas glicolíticas requer este íon como cofator tal como as enzimas hexoquinase, fosfofruto quinases, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenases e enolase (SINHA e PANDEY, 2011).

3.6- Permeado do soro de queijo

O soro de queijo é um líquido verde-amarelado resultante da precipitação e remoção da caseína do leite no processo de fabricação do queijo. A cor amarelada do soro de queijo é causada pela presença de riboflavina (vitamina B2). A maior parte da lactose do leite, em

torno 39 a 60 kg/m³, permanece no soro de queijo, constituindo principal fração (90%) da carga orgânica. A gordura e proteína também são parcialmente responsáveis pela contaminação orgânica, com valores na faixa 0,99 a 10,58 kg/m³ e 1,4 a 8,0 kg/m³, respectivamente. Os valores de DBO e DQO variam de 27 a 60 kg/m³ e 50 a 102 kg/m³ respectivamente. A razão DBO₅/DQO é comumente maior do que 0,5. Assim, este substrato é adequado para ser tratado por processos biológicos (PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012).

Devido as exigências quanto a disposição e tratamento do soro estudos apontaram uma mudança na concepção indicando que o soro poderia ser aproveitado na indústria de alimentos. Para esse aproveitamento o soro de queijo passa por processos como desmineralização, filtração e/ou evaporação. As etapas aplicadas irão depender do produto final desejado (CUARTAS-URIBE et al., 2009).

As proteínas do leite e proteínas de soro de queijo em particular, são valorizadas como importantes ingredientes alimentares devido a sua propriedade funcional e nutricional, e além de ser amplamente utilizadas como emulsificantes em alimentos (ADJONU et al., 2014).

Para obtenção do concentrado protéico, o soro é pasteurizado e estocado em tanque de armazenamento. Em seguida é clarificado para remoção de resíduos de caseína e concentrado pelo processo de ultrafiltração, no qual a permeação ocorre em membranas, e o líquido ultrafiltrado é chamado de permeado. Este é composto por água, sais e lactose. As proteínas e a gordura que possuem peso molecular na ordem de grandeza de 100 a 1000 vezes maior que dos componentes permeado, são retidas na membrana, as quais são concentradas (ATRA et al., 2005).

O permeado pode ser utilizado para alimentação animal ou pode ser evaporado obtendo um pó com uma alta concentração de lactose, fato que torna atrativo para utilização como fonte de carbono em processos fermentativos, além disso pode ser empregado na indústria de alimentos na fabricação de produtos láteos e na panificação (GIRARD et al., 2014).

O soro de queijo também tem sido utilizado para a produção de etanol, Sansonetti et al. (2009) avaliaram a produção de etanol utilizando como substrato o soro de queijo proveniente da fabricação da ricota. Os autores verificaram que a lactose foi totalmente consumida em 13 h de fermentação e o rendimento obtido foi de 97 % em relação ao teórico.

Além disso o soro também tem sido utilizado para a produção de hidrogênio em processos fermentativos. Davila-Vazquez et al. (2008) estudou o processo fermentativo para

produção de hidrogênio utilizando soro em pó. Os autores obtiveram um rendimento de 3,1 molH₂/mol a lactose, para um pH de 6,0 e uma concentração de 15 g soro/L

CAPÍTULO 4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Substrato

O substrato utilizado na fermentação para produção de hidrogênio foi obtido a partir da separação da proteína do soro de queijo, denominado permeado do soro de queijo (Figura 4.1), o qual foi adquirido da empresa Sooro Concentrado Indústria de Produtos Lácteos Ltda. O permeado foi estocado em vidros e utilizado durante todo o desenvolvimento dos experimentos. A caracterização do substrato foi realizada pela própria empresa sendo apresentada na Tabela 4.1.



Figura 4.1 – Permeado do soro de queijo utilizado como substrato na fermentação.

Tabela 4.1 – Características do substrato utilizado na fermentação realizado pela empresa Sooro Concentrado.

Parâmetros	Especificação	Valores análise
Umidade (%)	Máximo 4,0	1,05
Acidez (%)	Máximo 2,0	1,93
Gordura (%)	Máximo 1,5	0,0
pH	6,0 - 6,7	6,25
Proteína (%)	Mínimo 3,0	1,42
Cinzas (sais minerais %)	Máximo 6,0	4,56
Lactose (%)	Mínimo 80	92,97
Aeróbios mesófilos (UFC/g)	Máximo 5×10^4	$< 10^2$
Coliformes totais (UFC/g)	Máximo 100	$< 10^1$
Coliformes fecais (UFC/g)	Máximo 10	$< 10^1$
Bolores e leveduras (UFC/g)	Máximo 50	$2,0 \times 10^1$
Salmonela (valor garantido)	Ausência	Ausente

Fonte: (Empresa Sooro)

4.2- Inóculo

O inóculo proveniente do laboratório do Nucbio (Núcleo de Processos Biotecnológicos) consistia de um consórcio microbiano, o qual foi previamente 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 proveniente do permeado do soro de queijo. Gás nitrogênio foi borbulhado por 10 min no inóculo com o objetivo de manter o mesmo em ambiente anaeróbico. O inóculo foi armazenado em frascos (Figura 4.2) no escuro e em temperatura ambiente.



Figura 4.2 – Inóculo utilizado para produção de hidrogênio.

4.3- Testes preliminares

Testes preliminares foram realizados para verificar a formação de biogás. As fermentações foram conduzidas em batelada, à temperatura ambiente, na ausência de luz, sem controle do pH e em anaerobiose por um período de três dias. As fermentações foram realizadas utilizando frascos de penicilina de 100 mL, sendo o volume reacional de 75 mL e 25 mL de *headspace*. O volume reacional consistiu 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 , 3g/L de extrato de levedura e 1 g/L de extrato de carne, com suplementação de lactose. Para manter o sistema anaeróbio, borbulhou-se nitrogênio após a inoculação do meio para retirada do oxigênio dissolvido. Em seguida os frascos foram tampados com septos de borracha e

lacrados com lacres de alumínio. O biogás produzido foi coletado por seringas graduadas como mostrado na Figura 4.3 e, ao final da fermentação, o gás foi transferido para ampolas gasométricas para posterior análise da composição do biogás como mostrado na Figura 4.4.



Figura 4.3 – Reator utilizado para a produção de hidrogênio.



Figura 4.4 – Ampolas gasométricas utilizadas para armazenar o biogás produzido.

Para os dois primeiros testes fez-se uma alteração na composição do meio sintético. O primeiro teste preliminar consistiu de uma fermentação em que somente lactose proveniente do permeado (40 g/L) foi utilizado no meio fermentativo não havendo complementação de nutrientes. No segundo teste, a fermentação foi realizada utilizando apenas os nutrientes sem adição do permeado. Nos dois testes preliminares, utilizou-se porcentagem de inóculo de 1,8 % v/v.

Verificada a formação de biogás, realizou-se testes para avaliar a porcentagem de inóculo a ser utilizada durante a fermentação. Utilizou-se uma concentração de 40 g/L de lactose proveniente do permeado de soro de queijo no meio sintético. As porcentagens de inóculo testadas foram: 0,8; 1,0; 1,3; 1,6; 2,0; 2,6; 5,3; 8,0; 10,6 e 13,3 % v/v.

Selecionada a melhor condição de inóculo, outros ensaios foram realizados para avaliar a concentração de lactose no meio fermentativo, conduzindo fermentações com diferentes concentrações do substrato. As concentrações testadas foram: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 g/L de lactose proveniente do soro de queijo.

4.4- Estudo da concentração de sulfato ferroso, sulfato de amônio e pH na produção de hidrogênio

Com o objetivo de otimizar as concentrações de FeSO_4 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ assim como o valor de pH na produção de hidrogênio, elaborou-se um Planejamento Composto Central (PCC).

Este método científico de planejamento permite obter experimentos significativos e confiáveis com as vantagens de reduzir o tempo de experimentação assim como custo relativo à execução dos ensaios, uma vez que permite a otimização do número de experimentos. Além disto, o planejamento composto central permite uma otimização multivariada, minimiza o erro experimental e não requer conhecimentos elevados em estatística (BOX et al., 1978).

Este tipo de planejamento estatístico estuda os efeitos da interação dos parâmetros em questão. Cada variável é estudada com 5 diferentes níveis ($-\alpha$, -1, 0, +1, $+\alpha$) e cada nível possui seu respectivo valor nominal. O parâmetro α utilizado foi o ortogonal de modo a se obter um planejamento onde a matriz de variância e covariância é diagonal e os parâmetros estimados não estão correlacionados entre si (BOX et al., 1978).

O PCC, portanto, foi elaborado para 3 variáveis (concentrações de FeSO_4 (X_1) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (X_2) e pH (X_3) a dois níveis (2^3) com três réplicas no ponto central e 6 pontos axiais, totalizando 17 experimentos.

A Tabela 4.2 apresenta os valores reais e codificados das variáveis X_1 , X_2 e X_3 para o planejamento. Os valores adotados para pH inicial da fermentação, concentração de FeSO_4 e de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foram escolhidos conforme revisão da literatura (CHONG et al., 2009a; WANG; WAN; WANG, 2009; WANG e WAN 2008b). As respostas analisadas no planejamento efetuado foram: conversão de hidrogênio e produtividade. Os cálculos estatísticos foram realizados com auxílio do *Software Statistica 7.1*, da StatSoft.

Tabela 4.2 – Níveis adotados para as variáveis do planejamento composto central 2⁽³⁾.

Variáveis	Níveis				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
pH (X ₁)	3,47	4,00	5,50	7,00	7,53
FeSO ₄ (g/L) (X ₂)	0,03	0,10	0,30	0,50	0,57
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L) (X ₃)	0	0,30	1,15	2,00	2,30

A Tabela 4.3 mostra a matriz do planejamento utilizada. A otimização foi realizada utilizando a técnica de superfície de respostas.

Tabela 4.3 – Matriz do planejamento composto central 2³ com os valores codificados e originais das variáveis.

Valores codificados (valores reais)			
	pH (X ₁)	FeSO ₄ (g/L) (X ₂)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L) (X ₃)
1	-1 (4,00)	-1 (0,10)	-1 (0,30)
2	-1 (4,00)	-1 (0,10)	1 (2,00)
3	-1 (4,00)	1 (0,50)	-1 (0,30)
4	-1 (4,00)	1 (0,50)	1 (2,00)
5	1 (7,00)	-1 (0,10)	-1 (0,30)
6	1 (7,00)	-1 (0,10)	1 (2,00)
7	1 (7,00)	1 (0,50)	-1 (0,30)
8	1 (7,00)	1 (0,50)	1 (2,00)
9	-1,35 (3,47)	0 (0,30)	0 (1,15)
10	1,35 (7,53)	0 (0,30)	0 (1,15)
11	0 (5,50)	-1,35 (0,03)	0 (1,15)
12	0 (5,50)	1,35 (0,57)	0 (1,15)
13	0 (5,50)	0 (0,30)	-1,35 (0)
14	0 (5,50)	0 (0,30)	1,35 (2,3)
15	0 (5,50)	0 (0,30)	0 (1,15)
16	0 (5,50)	0 (0,30)	0 (1,15)
17	0 (5,50)	0 (0,30)	0 (1,15)

Todos os níveis das variáveis estudadas foram adimensionalizados (codificados) segunda a Equação 4.1.

$$X_n = \frac{(X - X_0)}{\left[\frac{X_{+1} - X_{-1}}{2} \right]} \quad (4.1)$$

X_n = valor codificado da variável ($n = 1, 2, \dots$)

X = valor da variável a ser calculada;

X_0 = valor da variável no ponto central;

X_{+1} = valor da variável no nível superior;

X_{-1} = valor da variável no nível inferior.

As Equações codificadas (4.2, 4.3 e 4.4) são as equações para cada variável estudada no experimento:

$$X_1 = \frac{(\text{pH} - 5,50)}{\left[\frac{7,00 - 4,00}{2} \right]} \quad (4.2)$$

$$X_2 = \frac{(\text{sulfato ferroso} - 0,30)}{\left[\frac{0,50 - 0,10}{2} \right]} \quad (4.3)$$

$$X_3 = \frac{(\text{sulfato de amônio} - 1,15)}{\left[\frac{2,00 - 0,30}{2} \right]} \quad (4.4)$$

As fermentações foram conduzidas como explicado no item 4.3 por um tempo de 3 dias nas condições ótimas definidas nos ensaios preliminares, e o valor do pH foi ajustado utilizando soluções de hidróxido de sódio e ácido fosfórico.

Não foi possível otimizar a produção com as faixas estudadas. Sendo assim, um novo planejamento teve que ser realizado com uma nova faixa para as variáveis estudadas. Para o segundo planejamento, os níveis testados estão apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Níveis adotados para as variáveis do segundo planejamento composto central $2^{(3)}$.

Variáveis	Níveis				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
pH (X_1)	5,60	6,00	7,00	8,00	8,40
FeSO ₄ (g/L) (X_2)	0,32	0,40	0,60	0,80	0,88
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L) (X_3)	0,80	1,00	1,50	2,00	2,20

A Tabela 4.5 mostra a nova matriz do planejamento utilizada. A otimização foi realizada utilizando a técnica de superfície de respostas.

Tabela 4.5 – Matriz do planejamento composto central 2^3 com os valores codificados e originais das variáveis.

Valores codificados (valores reais)			
	pH (X_1)	FeSO ₄ (g/L) (X_2)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L) (X_3)
1	-1 (6,00)	-1 (0,4)	-1 (1)
2	-1 (6,00)	-1 (0,4)	1 (2,0)
3	-1 (6,00)	1 (0,8)	-1 (1)
4	-1 (6,00)	1 (0,8)	1 (2,0)
5	1 (8,00)	-1 (0,4)	-1 (1)
6	1 (8,00)	-1 (0,40)	1 (2,00)
7	1 (8,00)	1 (0,80)	-1 (1,00)
8	1 (8,00)	1 (0,80)	1 (2,00)
9	-1,35 (5,60)	0 (0,60)	0 (1,50)
10	1,35 (8,40)	0 (0,60)	0 (1,50)
11	0 (7,00)	-1,35 (0,32)	0 (1,50)
12	0 (7,00)	1,35 (0,88)	0 (1,50)
13	0 (7,00)	0 (0,60)	-1,35 (0,80)
14	0 (7,00)	0 (0,60)	1,35 (2,20)
15	0 (7,00)	0 (0,60)	0 (1,15)
16	0 (7,00)	0 (0,60)	0 (1,50)
17	0 (7,00)	0 (0,60)	0 (1,50)

Para o segundo planejamento as fermentações também foram conduzidas como descrito no item 4.3, porém o tempo de fermentação foi de dois dias. Essa redução no tempo de fermentação ocorreu devido a limitações na coleta do biohidrogênio.

As Equações codificadas (4.5, 4.6 e 4.7) são as equações para cada variável estudada no segundo planejamento:

$$X_1 = \frac{(\text{pH} - 7,00)}{\left[\frac{8,00 - 6,00}{2} \right]} \quad (4.5)$$

$$X_2 = \frac{(\text{sulfato ferroso} - 0,60)}{\left[\frac{0,80 - 0,40}{2} \right]} \quad (4.6)$$

$$X_3 = \frac{(\text{sulfato de amônio} - 1,50)}{\left[\frac{2,00 - 1,00}{2} \right]} \quad (4.7)$$

4.5- Avaliação da fermentação ao longo do tempo

Definidas as condições ótimas de concentrações de substrato, inóculo, FeSO_4 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e de pH, um estudo foi realizado para acompanhar a produção de hidrogênio com o tempo bem como a produção de ácidos orgânicos, etanol, a quantidade de ferro dissolvido no meio fermentativo e ferro acumulado nas células. 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. A fermentação foi acompanhada até 93 h.

4.6- Efeito das variáveis concentração de sulfato de magnésio e temperatura na produção de hidrogênio.

O efeito da concentração de sulfato de magnésio e da temperatura sobre a produção de hidrogênio por fermentação escura também foi avaliado. Para estudar o efeito dessas variáveis utilizou-se o planejamento composto central 2^2 . A Tabela 4.6 mostra os valores para os níveis adotados.

Tabela 4.6 – Níveis adotados para as variáveis do planejamento composto central $2^{(2)}$.

Variável	Nível				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Temperatura (°C) (X_1)	27,9	30,0	35,0	40,0	42,1
MgSO ₄ (g/L) (X_2)	0,31	0,48	0,88	1,28	1,45

A Tabela 4.7 apresenta os valores reais e codificados das variáveis temperatura (X_1) e concentração de sulfato de magnésio (X_2) para o planejamento.

Tabela 4.7 – Matriz do planejamento composto central 2^2 com os valores codificados e originais das variáveis.

	Valores codificados (valores reais)	
	Temperatura(°C) (X_1)	MgSO ₄ (g/L) (X_2)
1	-1 (30,0)	-1 (0,48)
2	-1 (30,0)	1 (1,28)
3	1 (40,0)	-1 (0,48)
4	1 (40,0)	1 (1,28)
5	-1,14 (27,9)	0 (0,88)
6	1,14 (42,1)	0 (0,88)
7	0 (35,0)	-1,14 (0,31)
8	0 (35,0)	1,14 (1,44)
9	0 (35,0)	0 (0,88)
10	0 (35,0)	0 (0,88)
11	0 (35,0)	0 (0,88)

As Equações codificadas (4.8 e 4.9) são as equações para cada variável estudada no experimento:

$$X_1 = \frac{(\text{temperatura} - 35,0)}{\left[\frac{40,0 - 30,0}{2} \right]} \quad (4.8)$$

$$X_2 = \frac{(\text{sulfato de magnésio} - 0,88)}{\left[\frac{1,28 - 0,48}{2} \right]} \quad (4.9)$$

4.7- Processo fermentativo em escala ampliada

Definidas todas as variáveis, uma fermentação foi conduzida em um reator batelada Tec-Bio-Flex, Tecnal[®], com volume útil de 1,5 L sendo o volume reacional de 700 mL, equipado com agitador mecânico e com controle de temperatura. O objetivo foi avaliar o comportamento do processo em uma escala ampliada. A fermentação foi acompanhada ao longo do tempo, sendo avaliado o pH da fermentação, a produção de hidrogênio e a formação de metabólitos. A Figura 4.5 ilustra a unidade experimental utilizada para realizar as fermentações em maior escala. O biogás produzido foi medido pelo deslocamento de água.



Figura 4.5 – Unidade experimental.

4.8- Fermentação com controle do pH

Para avaliar a influência do pH na produção de hidrogênio e na rota metabólica, fermentações foram realizadas controlando o valor do pH durante a fermentação, visto que no planejamento composto central (2^3) (Item 4.4.), apenas o pH inicial da fermentação foi monitorado. Os valores testados foram 5,5 e 6,5, sendo que o pH inicial utilizado neste caso foi o escolhido no Item 4.4 e depois mantido durante a fermentação nos valores em estudo. A fermentação foi conduzida no reator nas condições otimizadas definidas previamente (Itens 4.3, 4.4 e 4.6).

4.9- Fermentações em batelada sequencial

Um novo sistema foi aplicado durante a fermentação com intuito de aumentar o tempo de produção do biogás. O novo sistema testado foi o de batelada sequencial em que, durante o ensaio, o meio fermentativo foi renovado substituindo parte de volume de meio fermentado por um novo meio sintético, de composição igual à inicial. Esta renovação do meio de fermentação foi denominada de “corte”.

O sistema batelada sequencial foi investigado sob quatro diferentes condições de operação, alterando-se o volume do corte e/ou o tempo do corte, as fermentações foram conduzidas no fermentador de 1,5 L.

A primeira fermentação foi conduzida da seguinte maneira: iniciou-se a fermentação em batelada nas condições otimizadas com controle do pH e, após 24 h de fermentação realizou-se o primeiro corte. Nesse momento retirou-se 233 mL de meio fermentado com o auxílio de uma bomba peristáltica a uma vazão de 0,2 mL/s. Em seguida, novo meio sintético mantendo a composição próxima da inicial foi bombeado para o reator. Borbulhou-se nitrogênio no meio para retirada do oxigênio dissolvido. A concentração de lactose no meio foi calculada de forma que a concentração após o corte no reator se mantivesse em torno de 20 g/L. O segundo corte foi realizado em 48 h de fermentação e o terceiro depois de 60 h de fermentação.

Na segunda fermentação o procedimento de corte foi realizado, aproximadamente, a cada 28 h de fermentação. Nesse teste o volume do corte foi de 466 mL e todas as outras condições foram mantidas iguais a da primeira fermentação.

Na terceira fermentação, nas primeiras 48 h de fermentação realizou-se 2 cortes, sendo que cada corte foi feito após 24 h de fermentação. Após as 48 h os cortes aconteceram a cada 12 h com a retirada de 466 mL. A fermentação foi conduzida como descrito na primeira fermentação.

A quarta fermentação foi caracterizada pelo reciclo de células. Retirou-se 460 mL de meio com o auxílio da bomba peristáltica e o volume restante foi centrifugado. Após a centrifugação, as células foram suspensas no novo meio. Então, borbulhou-se nitrogênio e uma nova fermentação foi conduzida com a reutilização das células contidas no volume centrifugado. Nessa fermentação o corte ocorreu a cada 28 h de fermentação.

4.10- Tratamento térmico no inóculo

Dois tratamentos térmicos foram realizados no inóculo no intuito de melhorar a produção de hidrogênio ao tentar eliminar as possíveis archaeas consumidoras de hidrogênio, as não produtoras de hidrogênio e os agentes produtores de toxinas que podem inibir a produção de hidrogênio.

Nos dois tratamentos as fermentações ocorreram no reator de 1,5 L e alíquotas de gás e do fermentado foram retiradas durante o ensaio para análises do biogás e dos metabólitos formados.

Os tratamentos foram realizados da seguinte maneira:

4.10.1-Primeiro tratamento

O primeiro tratamento térmico realizado no inóculo foi a 93 °C durante 15 min. Em seguida, o inóculo foi resfriado à temperatura ambiente e, posteriormente, foi mantido em meio sintético com a seguinte composição: 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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 20 g/L de lactose proveniente do permeado do soro de queijo.

Depois de alguns dias realizaram-se três fermentações com o inóculo tratado em diferentes temperaturas. As temperaturas testadas nas fermentações foram 30, 50 e 70 °C, sendo as concentrações de sulfato de amônio, sulfato ferroso, sulfato de magnésio e valor do pH inicial utilizados conforme definidos anteriormente.

4.10.2- Segundo tratamento

O segundo tratamento térmico foi realizado da seguinte maneira: inicialmente realizou-se o repique do consórcio e, em seguida, este foi exposto a uma temperatura de 50 °C durante a manutenção do inóculo. Após o crescimento das bactérias, realizaram-se três fermentações variando a temperatura da fermentação em 30, 50 e 70 °C.

4.11- Métodos analíticos

4.11.1- Quantificação de hidrogênio

O gás produzido foi coletado e sua composição determinada através de cromatografia gasosa utilizando cromatógrafo Shimadzu modelo GC 17A (Figura 4.6), equipado com detector de condutividade térmica e uma coluna capilar Carboxen 1010 (comprimento de 30 m, diâmetro interno 0,53 mm). As temperaturas do injetor, da coluna e do detector durante as análises foram 230 °C, 30 °C e 230 °C, respectivamente. Argônio foi utilizado como gás de arraste. O hidrogênio foi quantificado com o auxílio da curva de calibração (Apêndice A).



Figura 4.6 – Cromatógrafo utilizado para análise do biogás formado.

4.11.2- Quantificação de açúcar e metabólitos formados na fermentação

A quantificação dos açúcares e dos metabólitos formados foi realizada por cromatografia líquida de alto desempenho HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (Figura 4.7). A amostra foi diluída, filtrada em um filtro 0,22 μm e injetada no cromatógrafo marca Shimadzu modelo LC-20A Promience, equipado com coluna SUPELCOGEL C-610H. As concentrações de lactose e etanol foram determinadas por detector de índice de refração, enquanto que para os ácidos orgânicos, utilizou-se detector ultravioleta no comprimento de onda de 210 nm. As análises foram realizadas utilizando ácido fosfórico (0,1 %) como fase móvel sendo a vazão da bomba de 0,5 mL/min, temperatura do forno de 32 °C e volume de injeção de 20 μL . Os valores obtidos foram calculados com o auxílio de uma curva padrão (Apêndice A).



Figura 4.7 – Cromatógrafo utilizado na análise dos metabolitos formados e na quantificação do substrato.

4.11.3- Ferro dissolvido e ferro celular

A quantificação de ferro dissolvido e celular foi realizada por absorção atômica com chama, utilizando o espectrômetro SHIMADZU AA 7000 (Figura 4.8), após as amostras serem centrifugadas.



Figura 4.8 – Espectro de absorção atômica utilizado para realizar a quantificação do íon ferro.

As amostras foram centrifugadas. Para determinação do ferro dissolvido, utilizou-se o sobrenadante, que foi então diluído e, em seguida, analisado em espectrômetro de absorção atômica. A concentração do íon foi então quantificada com auxílio de uma curva padrão.

O precipitado após centrifugação foi utilizado para quantificação do ferro celular. Para isto, a massa celular foi suspensa em água e colocada em um ultrassom modelo CV 334 para

rompimentos da membrana celular por trinta minutos. Após o rompimento, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi analisado no espectro para quantificação do íon ferro.

4.11.4- Quantificação do crescimento celular

A determinação do crescimento celular foi feita por análise de absorvância do meio fermentativo em espectrofotômetro (modelo Shimadzu UVmini-1240) a um comprimento de onda de 660 nm. Uma curva padrão previamente estabelecida foi utilizada para correlacionar a leitura de absorvância com a massa seca de células (Apêndice A).

4.12- Rendimento

O rendimento em mol de hidrogênio por mol de substrato consumido foi calculado segundo a Equação 4.10

$$\text{Conversão} = \frac{\text{mol H}_2}{\text{mol de substrato consumido}} \quad (4.10)$$

4.13- Produtividade

O cálculo da produtividade, em relação ao hidrogênio produzido foi feita utilizando-se a Equação 4.11.

$$\text{Produtividade} = \frac{\text{mmol H}_2}{\text{volume reacional} \cdot \text{tempo de fermentação}} \quad (4.11)$$

CAPÍTULO 5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Testes preliminares

A primeira fermentação foi conduzida em temperatura ambiente com um volume reacional de 75 ml para avaliar a possibilidade de produção de biogás utilizando o permeado do soro de queijo, substrato este rico em lactose. Nessa fermentação o meio sintético foi composto somente pelo permeado do soro de queijo, sendo a concentração de lactose utilizada de 40 g/L e uma porcentagem de inóculo de 1,8 %v/v. A análise do biogás mostrou que a produtividade e conversão obtidas foram de 4,15 mmolH₂/L dia e 1,06 molH₂/ mol substrato consumido. Apesar dos baixos valores observados, a síntese do produto-alvo foi considerada satisfatória visto que a fermentação foi realizada sem a suplementação de nutrientes para as células. Durante o processo fermentativo apenas hidrogênio e dióxido de carbono foram produzidos, não sendo detectada a produção de metano nas fermentações.

Na segunda fermentação o objetivo foi verificar se o consorcio microbiano era capaz de produzir hidrogênio utilizando somente os nutrientes essenciais para manutenção celular sem adição de permeado do soro de queijo. Os nutrientes utilizados foram 3 g/L de KH₂PO₄, 7 g/L de K₂HPO₄, 1 g/L de MgSO₄, 3g/L de extrato de levedura e 1 g/L de extrato de carne. O volume reacional foi de 75 mL sendo utilizado uma porcentagem de 1,8 % v/v de inóculo. Entretanto, nesse ensaio verificou-se que não houve a produção de biogás durante o processo fermentativo.

5.1.1- Avaliação da concentração do inóculo

Ainda como teste exploratório avaliou-se a porcentagem de inóculo no meio fermentativo para a produtividade e conversão em hidrogênio. Para tal, a concentração de lactose de 40 g/L, proveniente do permeado de soro de queijo, foi mantida constante. Os resultados obtidos estão representados pela Tabela 5.1.

A Tabela 5.1 mostrou que em relação à produtividade o melhor resultado obtido foi para o volume de inóculo de 1,2 mL (1,6 % v/v) o que corresponde a 0,22 ± 0,01 g/L de inóculo para um tempo de fermentação de três dias. Como o processo utilizava cultura mista, uma maior concentração de células pode levar a uma maior competição dos micro-organismos presentes para a produção de outros metabólitos que não o hidrogênio.

Tabela 5.1 – Resultados do processo fermentativo variando o volume de inóculo.

Inóculo (%)	Conversão (molH₂/mol substrato consumido)	Produtividade (mmolH₂/L dia)
0,8	0,64	3,33
1,0	1,40	8,47
1,3	1,63	11,96
1,6	1,65	24,61
2	1,53	19,03
2,6	1,10	18,95
5,3	0,47	9,53
8	0,49	9,29
10,6	0,40	8,02
13,3	0,84	8,41

Comparando os resultados deste trabalho, com o de outros autores que empregaram soro de queijo como substrato, com exceção do ensaio em que se utilizou apenas 0,8 % v/v de inóculo, a produtividade encontrada neste trabalho foi superior à apresentada por Castello et al. (2009), 5 mmolH₂/L dia, que avaliaram a produção de hidrogênio por 250 dias em um reator UASB. Com relação à conversão, os resultados encontrados neste estudo foram inferiores àquela relatada no trabalho de Davila-Vazquez et al. (2009), que utilizando um reator CSTR de 3,0 L, obtiveram uma conversão de 2,8 molH₂/mol de lactose consumida. Entretanto, a conversão foi superior àquela apresentada por Venetsaneas et al. (2009), de 0,78 – 0,61 molH₂/mol de glicose consumida.

5.1.2- Avaliação da concentração do substrato

Outro teste realizado foi para avaliar o efeito da concentração de substrato. As concentrações de substrato testadas foram 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 g/L sendo essas concentrações já de lactose no meio. O tempo de fermentação foi de 3 dias a temperatura ambiente e a porcentagem de inóculo foi de 1,6 % v/v definida no teste anterior. Os resultados obtidos no ensaio com variação da concentração de permeado são mostrados na Tabela 5.2:

Tabela 5.2 – Resultados do processo fermentativo variando a concentração lactose.

Concentração de lactose no meio (g/L)	Conversão (molH₂/mol substrato consumido)	produtividade (mmolH₂/Ldia)
10	1,25	25,62
20	1,71	30,59
30	1,66	26,92
40	1,65	26,85
50	1,64	25,56
60	1,60	23,73
70	1,18	20,41
80	0,94	19,21

Pela Tabela 5.2 verifica-se que a maior produtividade ocorreu para a concentração de 20 g/L. Já para a resposta conversão os valores ficaram próximos e apenas para as concentrações de substrato de 70 e 80 g/L resultaram em reduzidas conversões de lactose em hidrogênio. Sabe-se que altas concentrações de açúcares proporcionaram um aumento na pressão osmótica provocando uma inibição no crescimento das bactérias produtoras de hidrogênio. Além disso, o excesso destes açúcares pode inibir a síntese do produto-alvo desviando a rota metabólica para a produção de álcool e ácido lático (WONG, WU, JUANJ, 2014).

Kargi et al. (2012) estudaram a influência da concentração de substrato na produção de hidrogênio também utilizando um consórcio microbiano. Os autores avaliaram uma faixa de 5,2 a 28,5 g/L de açúcar total proveniente do soro de queijo, estando a temperatura de fermentação fixada em 55 °C. Os resultados obtidos mostram que a resposta produção de hidrogênio acumulado aumentou de 80 mL para 257 mL quando aumentou a concentração de substrato (5,2 para 20 g/L) respectivamente. Porém quando a concentração passou para 28,5 g/L ocorreu uma redução na produção passando para 148 mL. Já para rendimento de hidrogênio resposta encontrada foi 1,03 molH₂/mol de glicose para uma concentração de açúcar de 9,5 g/L.

O efeito da concentração do substrato e do valor inicial do pH foram avaliados por Davila-Vazquez et al. (2008). Os autores utilizaram a metodologia de superfície de resposta para estudar os efeitos das variáveis investigadas. As variáveis avaliadas foram o pH (3,88 -

8,12) e a concentração inicial de substrato (0,86 - 29,14 g/L). Como substratos foram testados a lactose, o soro de queijo em pó e a glicose. Já como inóculo foi utilizado um consórcio pré-tratado termicamente. Para lactose, o rendimento molar de hidrogênio e a taxa volumétrica de produção H_2 , foram 3,6 mol H_2 /mol lactose e 5,6 mmol H_2 /L/h respectivamente, para uma concentração de 5 g de lactose/L e um pH inicial 7,5. Os autores observaram que à medida que a concentração inicial de lactose diminuía e o valor do pH aumentava o rendimento aumentava. Já para o soro em pó obtiveram um rendimento de 3,1 mol H_2 /mol a lactose, para um pH de 6,0 e uma concentração de 15 g soro/L. Contudo, a maior produtividade observada foi de 8,1 mmol H_2 /L/h, a um pH de 7,5 e concentração de 25 g soro/L.

Em geral, a análise dos resultados mostrou que esforços devem ser feitos de modo a aumentar a produção de hidrogênio do sistema de fermentação no escuro a partir do uso do permeado do soro de queijo por cultura mista anaeróbia. A diferença essencial dos nossos resultados e os estudos descritos na literatura são principalmente devido à fermentação escura estar altamente dependente das condições operacionais, tais como a temperatura, o pH, a formulação de meio mineral, tipo de inóculo, o perfil de ácidos orgânicos produzidos, tipo e concentração do substrato, pressão parcial de H_2 , a operação no modo e configuração do reator (HOLLADAY et al., 2009; DAS; KHANNA; VEZIROĞLU, 2008).

Dessa forma, realizou-se um planejamento para estudar a influência de algumas dessas variáveis no processo fermentativo e com isso aumentar o valor encontrado para as respostas estudadas.

5.2- Avaliação do efeito das variáveis ferro, pH e amônio na fermentação escura

A partir do planejamento composto central 2^3 foi possível verificar como as variáveis pH, e as concentrações de sulfato ferroso e de sulfato de amônio afetaram a produção de hidrogênio. A Tabela 5.3 apresenta os valores codificados e originais das variáveis de estudo e as respostas obtidas.

Tabela 5.3 – Resultado do PCC para as variáveis pH, concentração de sulfato ferroso e sulfato de amônio no processo fermentativo

	pH (X ₁)	FeSO ₄ (g/L) (X ₂)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L) (X ₃)	Conversão (molH ₂ /mol de substrato consumido)	Produtividade (mmolH ₂ /L dia)
1	-1 (4)	-1 (0,1)	-1 (0,3)	0,948	0,45
2	-1 (4)	-1 (0,1)	1 (2,0)	1,116	0,64
3	-1 (4)	1 (0,5)	-1 (0,3)	0,008	0,05
4	-1 (4)	1 (0,5)	1 (2,0)	0,297	0,75
5	1 (7)	-1 (0,1)	-1 (0,3)	2,087	54,28
6	1 (7)	-1 (0,1)	1 (2,0)	2,618	64,75
7	1 (7)	1 (0,5)	-1 (0,3)	2,951	74,02
8	1 (7)	1 (0,5)	1 (2,0)	3,466	73,65
9	-1,35 (3,47)	0 (0,3)	0 (1,15)	0,066	0,20
10	1,35 (7,53)	0 (0,3)	0 (1,15)	3,070	69,65
11	0 (5,5)	-1,35 (0,03)	0 (1,15)	0,907	13,21
12	0 (5,5)	1,35 (0,57)	0 (1,15)	1,645	35,14
13	0 (5,5)	0 (0,3)	-1,35 (0)	1,490	38,00
14	0 (5,5)	0 (0,3)	1,35 (2,3)	1,805	41,64
15	0 (5,5)	0 (0,3)	0 (1,15)	0,683	12,79
16	0 (5,5)	0 (0,3)	0 (1,15)	0,703	14,59
17	0 (5,5)	0 (0,3)	0 (1,15)	0,796	17,49

O valor de α usado no planejamento foi de 1,35

Observa-se na Tabela 5.3 que a conversão variou de 0,008 (molH₂/mol de substrato consumido) (experimento 3) a 3,46 (molH₂/mol de substrato consumido) no experimento 8 e a produtividade esteve entre 0,05 (experimento 3) e 74,02 mmolH₂/L dia (experimento 7).

Através dos resultados obtidos e considerando um teste de hipóteses *t de Student* com uma área de rejeição de 5 %, e relacionando as variáveis independentes com as respostas conversão e produtividade, obteve-se os diagramas de Pareto (Figura 5.1 (a) e 5.1 (b)) e as Equações (5.1) e (5.2) dos modelos respectivamente nos quais foram excluídas as variáveis não significativas.

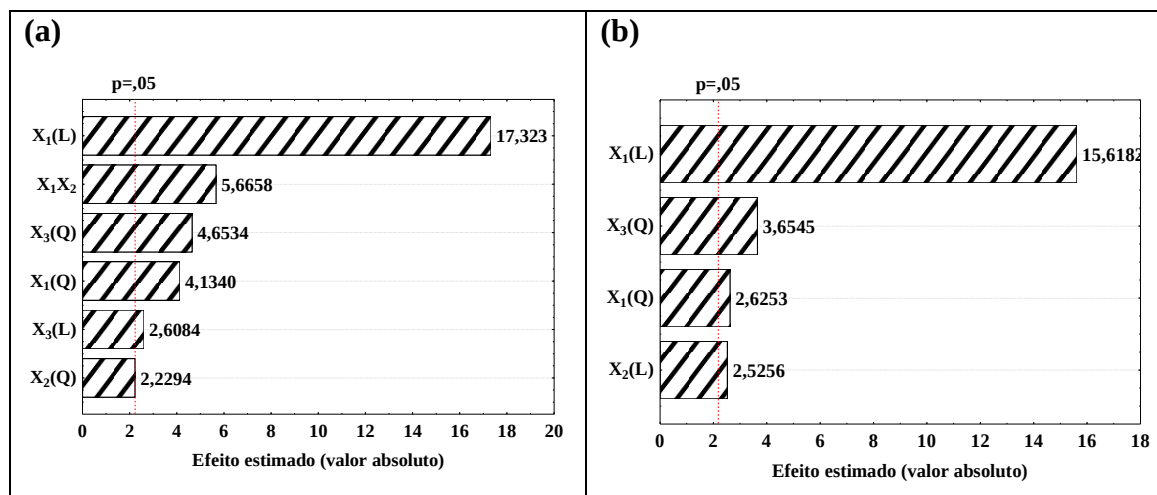


Figura 5.1 – Diagrama de Pareto com variáveis estudadas para as respostas conversão (a) e produtividade (b) de hidrogênio.

Pela Figura 5.1 nota-se que as variáveis apresentaram um maior efeito sobre a resposta conversão do que para produtividade, sendo que o pH (X_1) linear apresentou maior efeito sobre as respostas. Percebe-se também que somente para a conversão observou-se o efeito da interação entre as variáveis X_1 e X_2 .

$$\text{Conversão} = 0,82 + 1,09 X_1 + 0,34 X_1^2 + 0,18 X_2^2 + 0,16 X_3 + 0,38 X_3^2 + 0,43 X_1 X_2 \quad (5.1)$$

$$\text{Produtividade} = 18,24 + 30,8 X_1 + 6,82 X_1^2 + 4,97 X_2 + 9,49 X_3^2 \quad (5.2)$$

Sendo X_1 , X_2 e X_3 as variáveis codificadas de pH, concentração de FeSO_4 e concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, respectivamente.

Os coeficientes de correlação (R^2) para conversão e produtividade obtidos após os ajustes foram de 97,45 % e 95,7 % respectivamente. Pelos gráficos apresentados na Figura 5.2 e na Equação 5.1, verifica-se que o pH teve maior efeito nas respostas para conversão do substrato em hidrogênio. A conversão do substrato em hidrogênio apresentou uma região de mínimo para concentração de sulfato ferroso e sulfato de amônio (ver Figura 5.2) entre as faixas de concentração 0,2 – 0,4 g/L e 0,5 – 1,5 g/L, respectivamente.

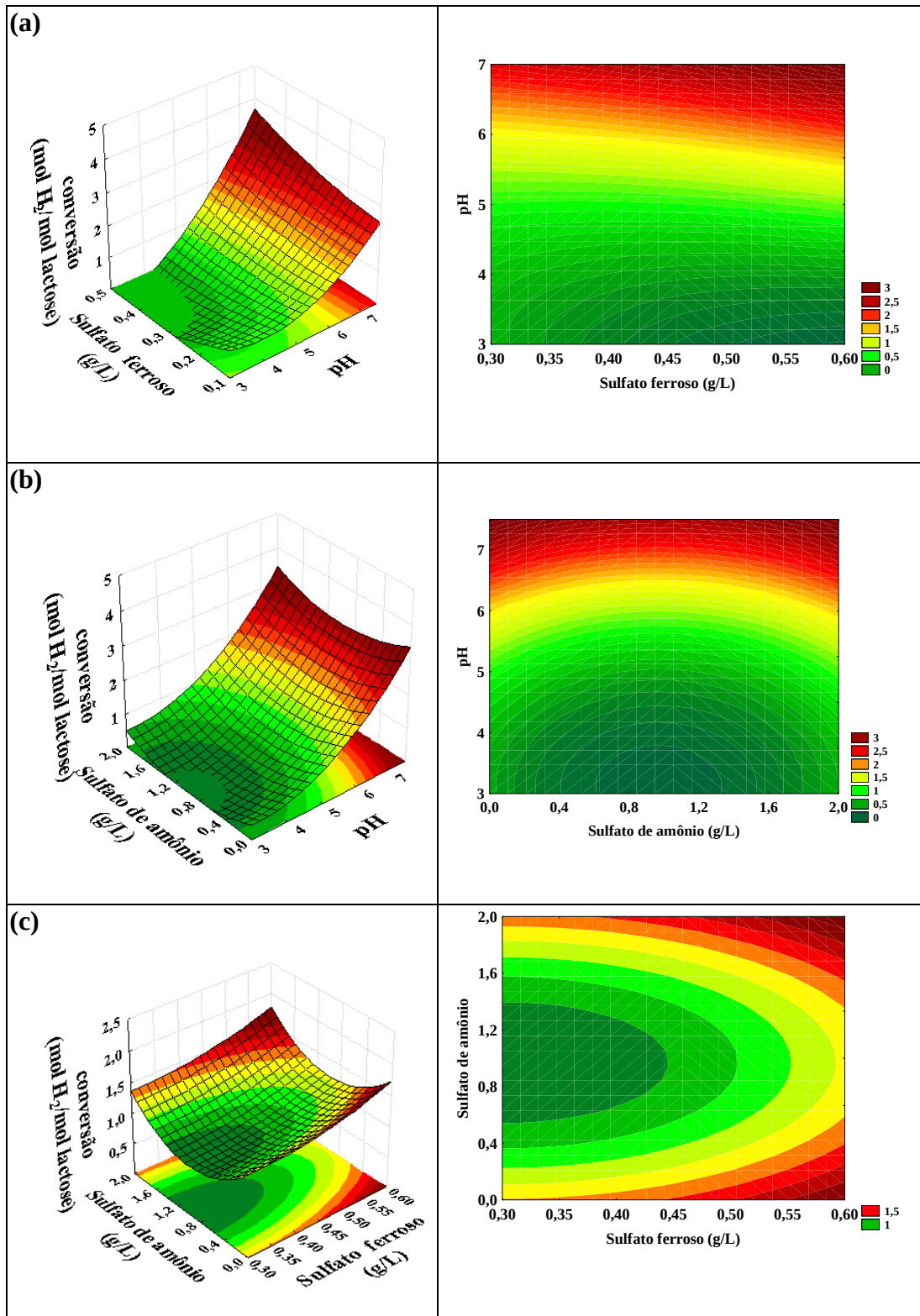


Figura 5.2 – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta conversão de hidrogênio em função (a) pH e FeSO_4 (g/L); (b) pH e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L); e (c) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e FeSO_4 (g/L). Todos os ensaios ocorreram em condições anaeróbias, no escuro e com temperatura ambiente.

A Figura 5.3 apresenta as superfícies para a resposta produtividade. Percebe-se que assim como para a conversão, as faixas das variáveis independentes estudadas também não resultaram em uma região de máximo.

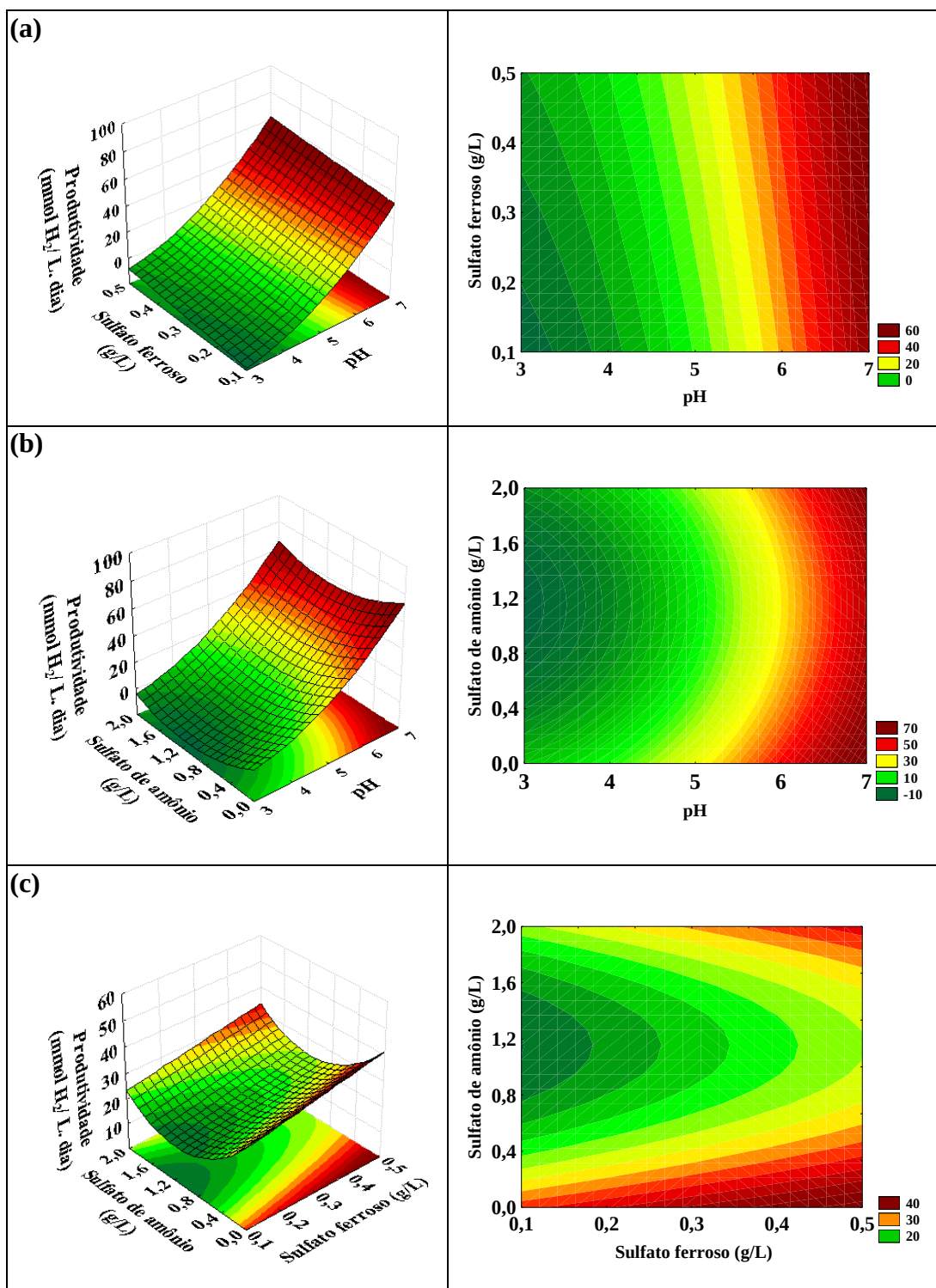


Figura 5.3 – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta produtividade de hidrogênio em função (a) pH e FeSO₄ (g/L); (b) pH e (NH₄)₂SO₄ (g/L); e (c) (NH₄)₂SO₄ e FeSO₄ (g/L). Todos os ensaios ocorreram em condições anaeróbias, no escuro e com temperatura ambiente.

As regiões estudadas para as variáveis concentração de sulfato de amônio, sulfato ferroso e pH não convergiram para um ponto de máximo, mas indicou que para se obter uma máxima conversão e produtividade é preciso a utilização de valores de concentração e pH maiores. Sendo assim um novo planejamento foi realizado adotando valores para o ponto +1 superior ao planejamento anterior. As novas faixas estudadas foram: pH do meio fermentativo de 6 a 8 concentração de FeSO_4 , de 0,4 a 0,8 g/L e concentração $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 1 a 2 g/L. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 5.4

Tabela 5.4 – Resultado do PCC para as variáveis pH, concentração de sulfato ferroso e sulfato de amônio no processo fermentativo.

	pH (X_1)	FeSO_4 (g/L) (X_2)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L) (X_3)	Conversão ($\text{molH}_2/\text{mol de}$ substrato consumido)	Produtividade ($\text{mmolH}_2/\text{Ldia}$)
1	-1 (6)	-1 (0,4)	-1 (1)	1,03	19,86
2	-1 (6)	-1 (0,4)	1 (2,0)	1,21	24,96
3	-1 (6)	1 (0,8)	-1 (1)	2,44	31,98
4	-1 (6)	1 (0,8)	1 (2,0)	2,83	33,28
5	1 (8)	-1 (0,4)	-1 (1)	2,12	54,32
6	1 (8)	-1 (0,4)	1 (2,0)	2,93	53,12
7	1 (8)	1 (0,8)	-1 (1)	2,13	65,33
8	1 (8)	1 (0,8)	1 (2,0)	2,07	55,68
9	-1,35 (5,6)	0 (0,6)	0 (1,5)	1,16	14,14
10	1,35 (8,4)	0 (0,6)	0 (1,5)	1,32	38,98
11	0 (7)	-1,35 (0,32)	0 (1,5)	3,41	60,76
12	0 (7)	1,35 (0,88)	0 (1,5)	3,77	83,85
13	0 (7)	0 (0,6)	-1,35 (0,8)	3,62	76,82
14	0 (7)	0 (0,6)	1,35 (2,2)	3,59	76,71
15	0 (7)	0 (0,6)	0 (1,5)	4,09	88,96
16	0 (7)	0 (0,6)	0 (1,5)	4,12	84,51
17	0 (7)	0 (0,6)	0 (1,5)	4,13	86,31

O valor de α usado no planejamento foi de 1,35

As Equações 5.3 e 5.4 representam os modelos ajustados para as respostas conversão e produtividade de hidrogênio para as novas faixas estudadas apresentando um R^2 de 95,01 % e

97,73 % respectivamente. Os modelos com as variáveis codificadas foram obtidos com um nível de significância de 5 % para teste de hipóteses *t de Student*.

$$\text{Conversão} = 4,07 + 0,16 X_1 - 1,52 X_1^2 + 0,22 X_2 - 0,24 X_2^2 - 0,23 X_3^2 - 0,48 X_1 X_2 \quad (5.3)$$

$$\text{Produtividade} = 86,08 + 13,03 X_1 - 32,15 X_1^2 + 5,59 X_2 - 7,17 X_2^2 - 4,73 X_3^2 \quad (5.4)$$

Os modelos indicam que para a faixa estudada nem todas as variáveis foram significativas. Isso pode ser confirmando nos gráficos de pareto para a conversão e para a produtividade na Figura 5.4 respectivamente.

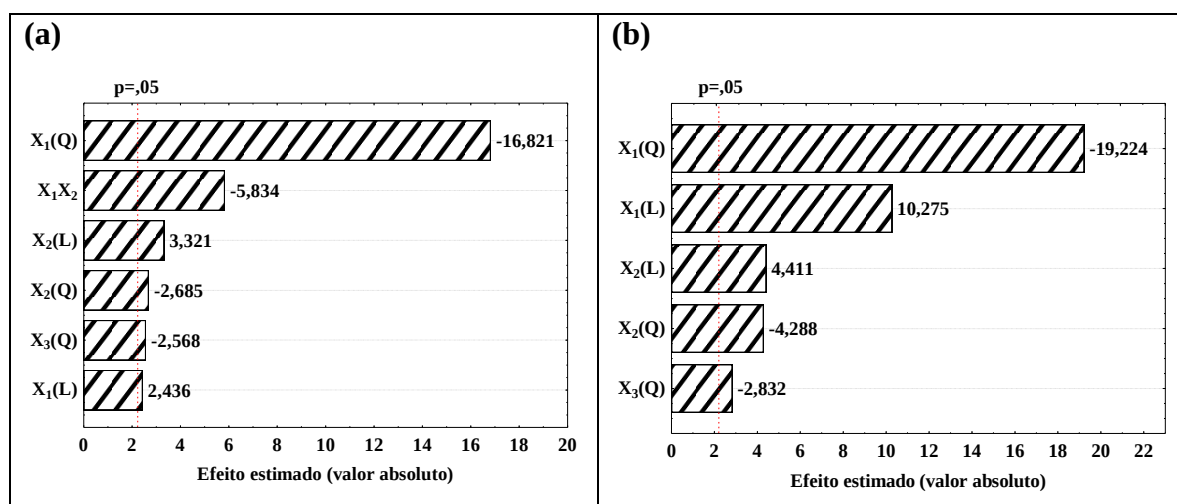


Figura 5.4 – Diagrama de Pareto com variáveis estudadas para as respostas conversão e produtividade de hidrogênio

É importante observar que as variáveis pH e concentração de sulfato ferroso influenciam positivamente nas respostas estudadas e que o aumento da variável provoca um aumento na resposta. Para a resposta produtividade o pH foi a variável mais significativa, enquanto para a resposta conversão o ferro foi a variável mais significativa. E observou-se também a ocorrência da interação entre as variáveis pH e concentração de sulfato ferroso para a resposta conversão.

As superfícies de respostas e as curvas de contorno para a conversão e produtividade obtidas utilizando o *Software Statistica* são mostradas nas Figuras 5.5 e 5.6 respectivamente.

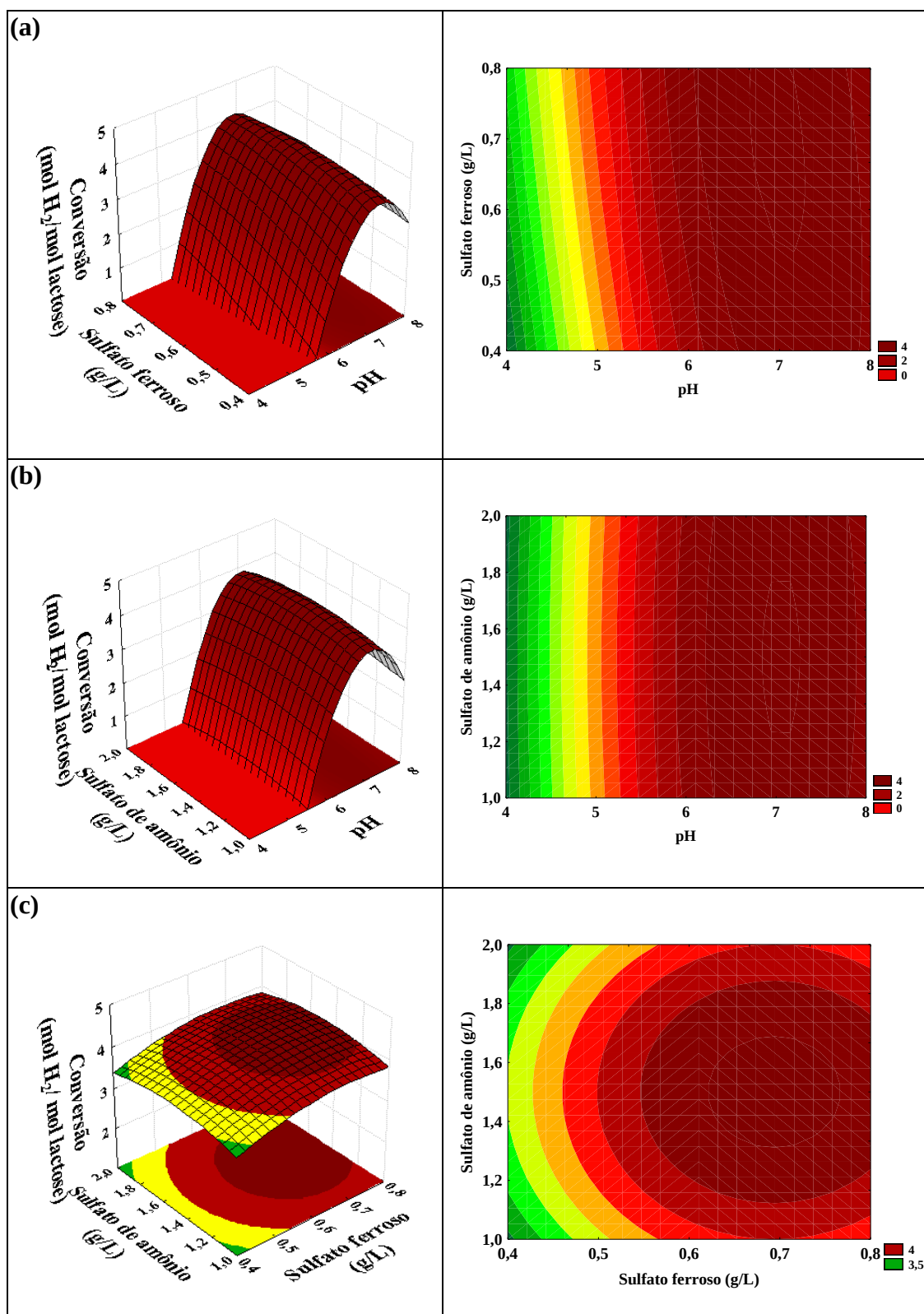


Figura 5.5 – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta conversão de hidrogênio em função (a) pH e FeSO_4 (g/L); (b) pH e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L); e (c) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e FeSO_4 (g/L). Todos os ensaios ocorreram em condições anaeróbias, no escuro e com temperatura ambiente.

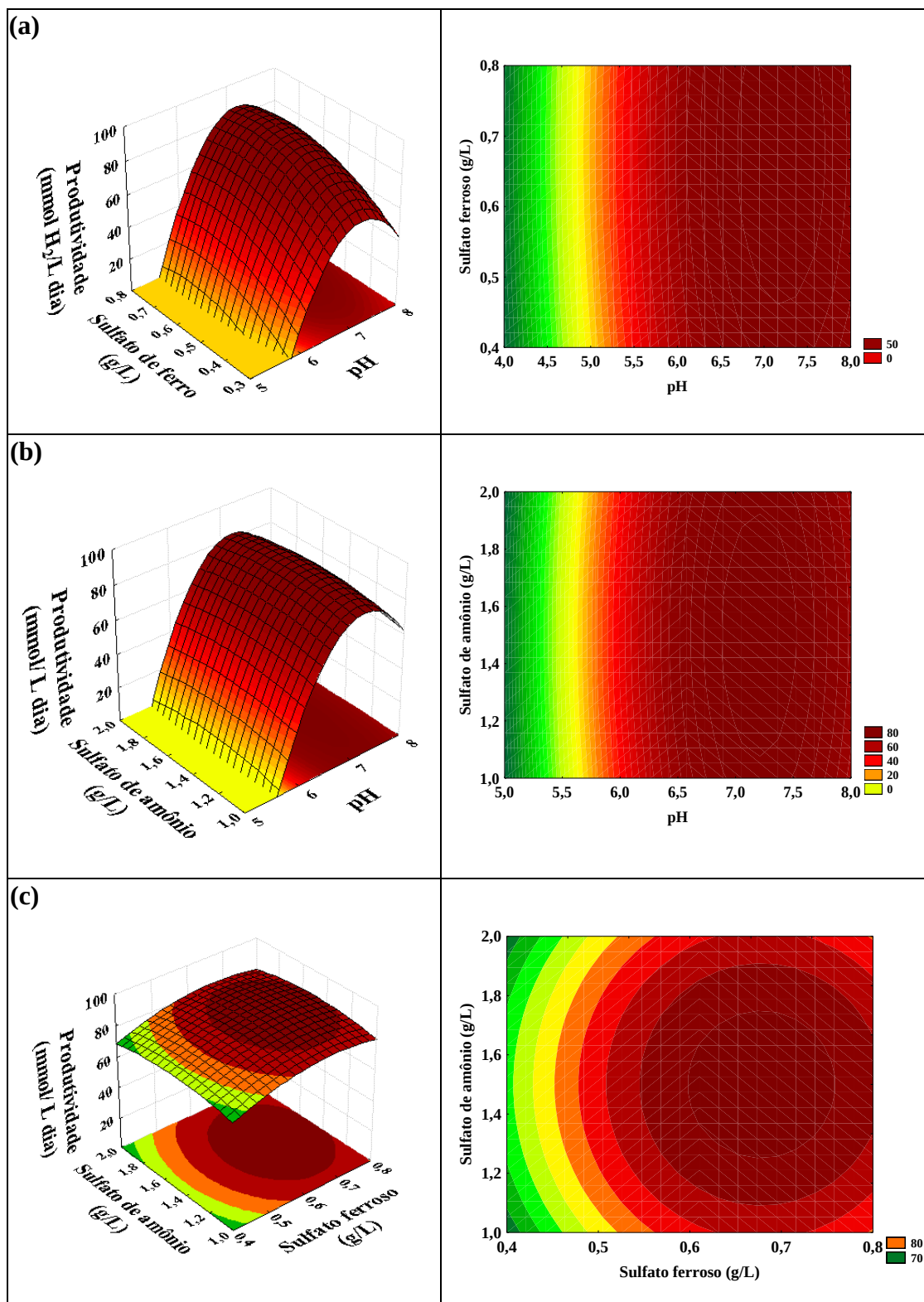


Figura 5.6 – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta produtividade de hidrogênio em função (a) pH e FeSO₄ (g/L); (b) pH e (NH₄)₂SO₄ e FeSO₄ (g/L). Todos os ensaios ocorreram em condições anaeróbias, no escuro e com temperatura ambiente.

Analizando as Figuras 5.5 e 5.6 nota-se que tanto para a conversão quanto para a produtividade, as superfícies pH em função concentração de sulfato ferroso e sulfato de amônio mostraram que para qualquer concentração dos sais utilizada, desde que o valor do pH seja por volta de 7, obtém-se o valor máximo nas respostas estudadas. Porém, quando se analisa as superfícies, os gráficos concentração de sulfato ferroso versus concentração de sulfato de amônio sugerem que existem faixas 0,6 a 0,8 g/L de FeSO_4 e 1,2 a 1,8 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na qual as respostas apresentam o valor máximo.

A condição experimental que apresentou os melhores valores de conversão de hidrogênio e produtividade foi pH inicial igual a 7 e concentrações de FeSO_4 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ igual a 0,6 g/L e 1,5 g/L, respectivamente. A conversão obtida foi de 4,13 mol H_2 /mol de substrato consumida e uma produtividade de 86,31 mmol H_2 /L dia.

A Tabela 5.5 apresenta os resultados obtidos de trabalhos prévios que também utilizaram o soro de queijo como substrato na produção de hidrogênio.

Tabela 5.5 – Resultados de trabalhos que o uso de soro de queijo para produção de hidrogênio.

Reator	pH	Substrato	Produção	Referência
UASB ^a	5	Soro de queijo	5 mmol H_2 / L/ dia	Castello et al. (2009)
CSTR ^b	5.9	Soro de queijo	1119 mmol H_2 /L/ dia	Davila-Vazquez et al. (2009)
CSTR ^b	5,2	Soro de queijo	1,9 LH ₂ /Lreator/dia	Venetsaneas et al. (2009)
Batelada	7 ^c	Permeado Soro de queijo	86,31 mmol H_2 /L dia	Nesse estudo

^a reator anaeróbio de manta de lodo; ^b tanque agitado e contínuo; ^c pH ajustado inicialmente e não controlado.

5.2.1- Avaliação do efeito do pH na produção de hidrogênio

Davila-Vasquez et al. (2008) verificaram um aumento na conversão de hidrogênio quando aumentaram o valor do pH. A maior resposta obtida no estudo foi encontrada quando o valor do pH foi igual a 7,5, e da concentração de lactose igual a 5 g/L. Nessa condição a conversão medida foi de 3,6 mol H_2 /mol lactose e uma produtividade 134,4 mmol H_2 /L/dia. Além disso, quando o soro de queijo em pó (77 % de lactose e 11 % de proteína) foi utilizado

como um substrato (25 g/L), os autores observaram uma produtividade mais elevada de H_2 (194,4 mmol H_2 /L/dia) utilizando um pH de 7,5. Por outro lado, valores mais baixos de pH, também são descritos como melhores condições, quando o valor do pH é controlado durante a fermentação.

Hwang et al. (2009) utilizaram lodo de estação de tratamento de água como inóculo e glicose como fonte de carbono. Os pesquisadores observaram decréscimos na produção de hidrogênio com o aumento do valor do pH de 5,5 até 6,2. Os resultados obtidos apontaram que valores de pH mais alcalinos favoreceram o crescimento de bactérias redutoras de sulfato, que utilizavam o hidrogênio para a redução do enxofre e produção de H_2S . A presença de ácido sulfídrico foi observada em pH 5,8 e 6,2 para concentrações de sulfato acima de 3000 e 300 mg/L, respectivamente. No entanto, em pH 5,5, nenhuma atividade de redução de sulfato foi observada mesmo para concentrações de sulfato de 20000 mg/L. Estes resultados sugerem que na presença de bactérias redutoras de sulfato em meio contendo enxofre, pHs mais alcalinos podem influenciar negativamente na produção de H_2 .

Ferchichi et al. (2005) conduziram ensaios em batelada para investigar o efeito do pH inicial, na faixa de 5 a 10, na produção de hidrogênio a partir de soro de queijo [87,5 % (v/v)], 41,4 g lactose/L, sendo *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* suplementado com 0,3 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e 50 mg/L de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, utilizado como inóculo. Esses autores observaram que a produtividade de hidrogênio e a conversão atingiu um máximo a um pH inicial de 6 e, em seguida, diminuiu de forma constante, com a elevação do pH. Os valores mais elevados encontrados foram 28,3 mL/h e 7,89 mmol/g lactose, respectivamente. Além disso, Infantes et al. (2011) observaram que a produção de hidrogênio foi favorecida a baixos valores de pH e temperaturas, quando uma cultura mista acidogênica enriquecida e alimentada com uma solução de glicose 9 g/L foi usada. A produção mais elevada de hidrogênio atingida, neste caso, ocorreu a pH 5,4 e 26 °C.

Ghosh e Hallenbeck (2009) estudaram o efeito do pH, temperatura e do tipo substrato para a produção de biohidrogênio utilizando uma espécie modificada *E. coli* DJT135. O rendimento H_2 nas condições ótimas (pH 6,5, temperatura de 35 °C e glicose como substrato) empregadas foi de 1,51 mol H_2 /mol glicose.

Avaliando todos os estudos comparativos e os resultados obtidos nesse trabalho sobre a influência da variável pH, ficou evidente que o valor adotado para o pH inicial interferiu diretamente na taxa de produção de hidrogênio. Em relação a este valor, observou-se que para valores próximo da neutralidade tem-se uma produção mais acentuada de hidrogênio como o

verificado no ensaio no qual um valor inicial de 7 foi utilizado (Figuras 5.5 e 5.6). Esse resultado mostra que as bactérias permanecem por mais tempo em um pH favorável até que o pH do meio atinja um valor abaixo de 4,5, pH este no qual as enzimas perdem sua atividade. Quando a fermentação é iniciada com valores de pH mais ácidos, o tempo em que as enzimas permanecem ativas, até que o valor do pH do meio chegue em 4,5, é menor quando comparado a valores mais alcalinos. Dessa forma o valor do pH inicial adotado para os próximos ensaios foi igual a 7.

5.2.2- Efeito da concentração de sulfato ferroso na produção de hidrogênio

De acordo com o PCC, a concentração de ferro para a produção de H_2 estudada foi na faixa de 0,5-0,8 g/L de $FeSO_4$. A concentração de ferro relatada em trabalhos anteriores varia muito, dependendo das condições da fermentação.

Azbar, Dokgoz e Peker (2009) avaliaram a produção de H_2 utilizando águas residuais de soro de queijo como substrato em biorreatores de 100 mL. O maior resultado obtido foi de 3,5 mol H_2 /mol lactose. Eles verificaram que a faixa ótima era de 0,05 - 0,1 g/L de $FeCl_2$, o que é uma quantidade consideravelmente inferior à utilizada no presente trabalho. No entanto, o meio foi suplementado com outros sais ($CoCl_2$, $NiCl_2$, $ZnCl_2$, $CaCl_2$, $MgCl_2$, $MnCl_2$, L-cisteína), o pH foi de 5,5 e a temperatura foi de 36 °C.

No presente trabalho, os ensaios fermentativos foram realizados à temperatura mais baixa (27 - 30 °C) e, de acordo com o que foi observado por Zhang e Shen (2006), a concentração de ferro para a produção de hidrogênio diminui de 800 mg/L de $FeSO_4$ para 25 mg/L de $FeSO_4$ com o aumento da temperatura do reator de 25 °C até 40 °C. Estes autores sugeriram que as bactérias necessitam de mais íons ferrosos para ativar a hidrogenase e oxidar a ferredoxina reduzida, a fim de produzir mais hidrogênio, quando a temperatura ambiente é baixa.

Zhang, Liu e Shen (2005) investigaram a influência da concentração de ferro na produção de H_2 , em batelada, com pH inicial de 7,4 usando consórcio microbiano e sacarose a 44 g/L como substrato. Estes autores relataram que a produção de hidrogênio atingiu um máximo a concentração de 1,6 g/L de $FeSO_4$, e em concentrações mais elevadas (1,6 g/L para 5,0 g/L), o rendimento diminuiu.

Este limite de $FeSO_4$ foi relatado por Yang e Shen (2006), no qual o efeito da concentração de $FeSO_4$ foi avaliado com um pH inicial de 7,0 e 8,0, em reatores bateladas de

120 mL. Neste estudo, o amido foi utilizado como substrato, a 35 °C e uma cultura mista anaeróbia foi usada como inóculo. Esses autores perceberam que o ferro solúvel inibia a fermentação do amido quando a concentração de FeSO_4 foi maior do que 0,15 g/L, em ambos os valores iniciais de pH. A maior quantidade de H_2 produzido foi semelhante em pH inicial 7,0 e 8,0 a 0,15 g/L de FeSO_4 . No entanto, a pH 7,0, a fase *lag* e o tempo final de fermentação foram menores do que a pH 8,0, o que indica que o pH 7,0 favoreceu a propagação das células. Portanto, Yang e Shen (2006) mostraram que o ferro ferroso afeta tanto, o cultivo e a atividade das bactérias produtoras de hidrogênio, uma vez que o resultado mais elevado para a produção de H_2 foi de acordo com uma maior produção de massa celular.

Chong et al. (2009a) avaliaram simultaneamente o efeito do pH, glicose e concentração de sulfato ferroso no rendimento do biohidrogênio por *Clostridium butyricum* EB6, usando como fonte de nitrogênio 4 g/L de extrato de levedura e 2 g/L de sulfato de amônio a 37 °C. Na condição ideal (pH 5,6, concentração de glicose de 15,7 g/L e concentração de FeSO_4 0,39 g/L), o rendimento de hidrogênio foi de 2,2 mol H_2 /mol de glicose. Em relação ao efeito quadrático e interativo no planejamento composto central (PCC), o pH e a concentração de FeSO_4 influenciaram significativamente a produção de hidrogênio semelhante ao presente trabalho. No entanto, os autores também observaram que o efeito isolado de concentração FeSO_4 também foi significativo ($p < 0,05$).

5.2.3- Efeito da concentração de sulfato de amônio na produção de hidrogênio.

Neste estudo, o intervalo de sulfato de amônio, que resultou em uma conversão e em uma produtividade de hidrogênio mais elevadas (a partir de 1 até 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) foi, em geral, inferior ao dos outros trabalhos previamente publicados.

No trabalho desenvolvido por Salerno, Park e Zuo (2006) utilizando a glicose como substrato, a produção de biohidrogênio foi dependente do pH e da concentração de amônio (definida como a soma de NH_3 e de espécies $^+\text{NH}_4$), quando a concentração de N foi superior a 2 g/L em reator batelada. A produção total de gás ($129 \pm 5\text{mL}$) e o rendimento de hidrogênio ($1,00 \pm 0,04$ mol H_2 /mol glicose) não foram afetados significativamente pela concentração de amônia para ambos os valores de pH testados (5,2 e 6,2), levando em conta 95 % de intervalo de confiança. No entanto, a fase *lag* foi maior, para a maior concentração de amônio. Além disso, os autores registraram uma diminuição na taxa máxima de produção a pH 6,2 de 56 mL/h (entre 2 gN/L) a 16 mL/h (em 10 gN/L). A pH 5,2, a diminuição foi de 49-

7 ml/h, a 2 e 10 gN/L, respectivamente. Estes autores investigaram também o processo de fluxo contínuo, e descobriram que a produção de hidrogênio foi possível com altas concentrações de hidróxido de amônio (até 7,8 gN/L), quando o reator foi inicialmente aclimatados a uma concentração de amônio inferior a 0,8 gN/L. Estes autores concluíram que o mecanismo de inibição depende da relação $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ e não apenas da concentração de NH_3 . No que se refere especificamente ao efeito da concentração amônio em relação ao pH, aumento da fase *lag* e menor taxa de produção foram observados a um pH de 5,2, quando a concentração de NH_3 foi de uma ordem de grandeza menor do que a pH 6,2.

Chen et al. (2009) investigaram a produção contínua de H_2 a partir de amido hidrolisado (25-28 g/L) a 55 °C e pH 6,0, sob diferentes concentrações de NH_4HCO_3 (1,31-5,24 g/L). Sob esta condição a taxa de produção de H_2 e o rendimento foram 419 mmol H_2 /dia e 13,2 mmol H_2 /g açúcar total, respectivamente. Os autores também verificaram que a concentração de células diminuiu com a redução da concentração NH_4HCO_3 de 2,62 para 1,31 g/L. Além disso, a taxa de produção de H_2 e de consumo de substrato diminuíram quando a concentração de NH_4HCO_3 passou de 5,24 para 1,31 g/L. No entanto, o teor de H_2 no biogás (50-55 %) foi o mesmo, independentemente da concentração de amônio. A concentração de NH_4HCO_3 e o tempo de retenção ótimos foram de 2,62 g/L e 12 h respectivamente.

O efeito da concentração de amônio na fermentação escura de hidrogênio foi estudado por Wang, Wan e Wang (2009). Os testes foram realizados no reator batelada de 150 mL, utilizando culturas mistas a 35 °C e pH inicial 7,0. Como substrato usou-se glicose (10 g/L) e a faixa de concentrações de amônio variou entre 0 e 10 g N/L. Os maiores resultados foram alcançados em 0,1 gN/L, onde o rendimento de hidrogênio foi de 2,13 mol de glicose H_2 /mol, já o potencial de produção de hidrogênio foi de 291,4 mL e a taxa de produção de hidrogênio média foi de 8,5 mL/h. Deve-se salientar que a concentração de amônio utilizada no trabalho desenvolvido por Wang, Wan e Wang (2009) foi consideravelmente inferior aos determinados no presente trabalho, que foi de 1,5 g/L nos estudos mencionados anteriormente (CHEN et al., 2009; SALERNO, 2006).

Belokopytov et al. (2009) avaliaram o efeito do amônio sobre a degradação do amido, a fim de produzir biohidrogênio em reatores bateladas de 250 mL, pelo consórcio microbiano. Em um meio contendo 5 g/L de peptona e 27 g/L de amido, estes autores verificaram que com a eliminação de NH_4Cl do meio, a produção de gás duplicou, atingindo 4,8 L/L de cultura. Esse resultado foi obtido nas seguintes condições: temperatura a 37°C, o valor do pH inicial

de 6,8 e 50 mg/L de FeSO_4 . Também foi observado que uma redução na concentração de peptona 5,0-1,0 g/L, provocou um aumento na produção de biogás, sendo o valor encontrado de 7,5 L/L de cultura.

5.3- Avaliação da fermentação ao longo do tempo

Com o intuito de verificar se ocorreria reprodutibilidade dos resultados apontados pelos modelos, quando empregadas as condições experimentais indicadas pela análise das superfícies de resposta e curvas de contorno, ensaios experimentais adicionais foram realizados.

Pela análise das superfícies de resposta e curvas de contorno (Figura 5.5 e 5.6), concluiu-se que para se obter valores satisfatórios para as respostas conversão e produtividade de hidrogênio as variáveis estudadas devem estar entre as seguintes faixas: 0,6 a 0,8 g/L de FeSO_4 , 1,2 a 1,8 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e pH de 6,5 a 7,5.

Baseando-se nas faixas de interesse para as respostas estudadas, e considerando-se critérios técnicos e econômicos definiu-se as condições ótimas para realização de uma cinética com intuito de validação do modelo previsto.

O teste de reprodutibilidade foi realizado adotando as seguintes condições ótimas: pH de 7,0, FeSO_4 de 0,6 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 1,5 g/L. A fermentação foi realizada à temperatura ambiente, em condição anaeróbia, no escuro sendo empregado o permeado do soro de queijo (20 g lactose/L) como substrato e cultura mista (1,6 %v/v) como inóculo. Análises da produtividade e conversão de hidrogênio, ferro dissolvido, concentração de ferro celular (Figura 5.7 e 5.8) e concentração de metabolitos (Fig. 5.9) foram realizadas ao longo do ensaio fermentativo.

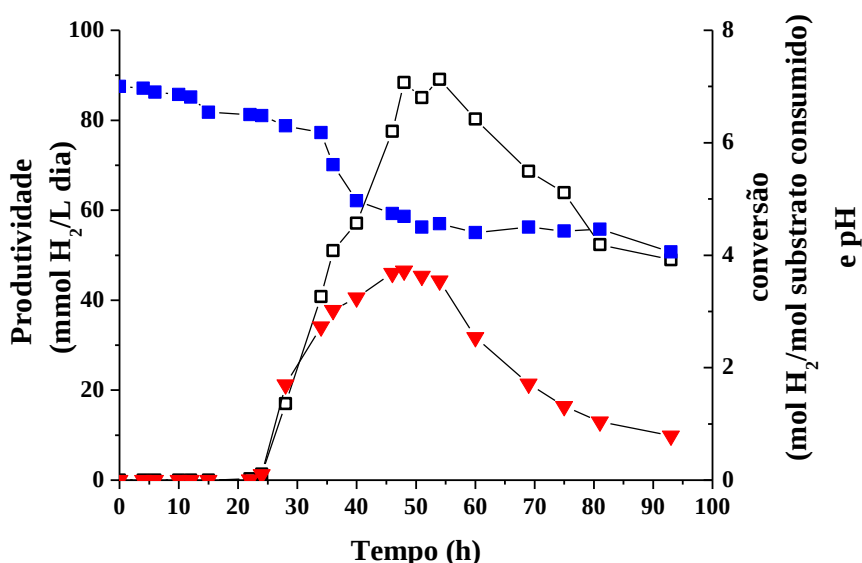


Figura 5.7 – Produtividade ($\text{mmol H}_2/\text{L} \cdot \text{dia}$) ($\square$), conversão ($\text{mol H}_2/\text{mol substrato consumida}$) ($\blacktriangle$) e pH ($\blacksquare$) durante o processo fermentativo a condição inicial ótima ($\text{pH} = 7,0$, $C_{\text{FeSO}_4} = 0,6 \text{ g/L}$, $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4} = 1,5 \text{ g/L}$).

Analisando a Figura 5.7 observa-se que a produção só se inicia após 24 h de fermentação para ambas as curvas de produtividade de hidrogênio e conversão, apresentando um pico em cerca de 50 h. O pH não foi controlado durante a fermentação e observou-se um decréscimo de 7 - 4,5 no prazo de 40 h. Após 50 h de fermentação, a produção de H_2 apresentou uma redução, que pode ser explicado pela diminuição do pH, que atingiu um valor baixo de 4,5.

De acordo com Khanal et al. (2004), a taxa de produção e a fase *lag* são afetadas negativamente pelo valor baixo do pH 4,5. Além disso, hidrogenase, a enzima responsável pela catálise da produção de hidrogênio, apresentou um pH ótimo de 6,2 e a sua atividade é inibida para valores abaixo de 5,2 (ADAMS, 1984; GEORGE e CHEN, 1983). Deve-se salientar que o pH começou a diminuir, antes de 24 h, atingindo o pH mínimo (4,5) após 40 h. Além disso, algumas rotas consumidoras de hidrogênio podem existir com pH igual ou inferior ao apresentado, como relatado por Zhu et al. (2009).

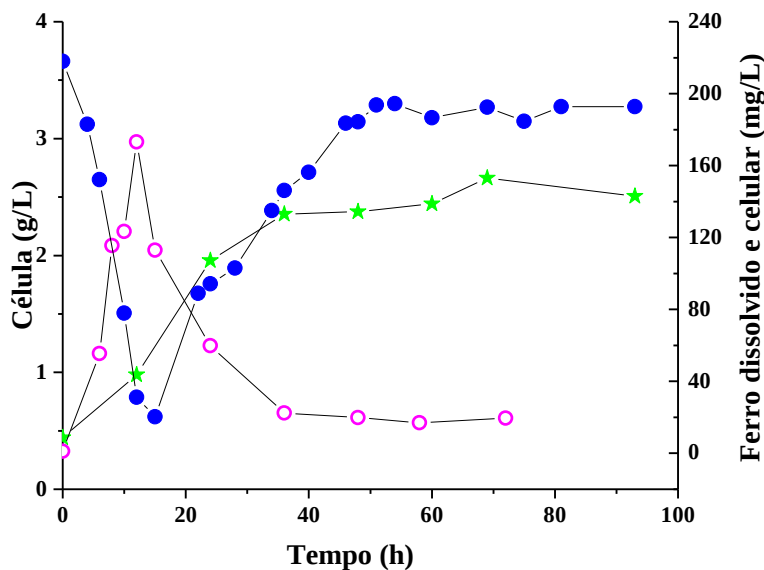


Figura 5.8 – Variação da concentração de ferro dissolvido (mg/L) (●), concentração de célula (g/L) (★) e variação da concentração de ferro celular (mg/L) (○) durante o processo fermentativo a condição inicial ótima (pH = 7.0, C_{FeSO_4} = 0.6 g/L, $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}$ = 1.5 g/L).

Em relação à biomassa, note-se que a taxa de crescimento foi maior nas primeiras 24 h e após 36 h, tornou-se quase estacionária (Figura 5.8).

No que diz respeito ao perfil de concentração de ferro dissolvido, nenhum trabalho foi encontrado na literatura relatando esta análise. Pode-se notar na Figura 5.8, que a concentração de ferro dissolvido diminuiu a partir do início da fermentação até 15 h. Após isso, um aumento gradual foi observado até que o valor inicial fosse atingido.

Uma possível explicação para esta mudança no perfil de concentração de ferro pode ser devido à biossorção do metal sobre as paredes das células, uma vez que as bactérias podem afetar o teor de componentes dissolvidos através de reações de adsorção por suas superfícies reativas. Esta explicação pode ser reforçada pelos resultados obtidos na análise de ferro nas células apresentada na Figura 5.8. Ao mesmo tempo em que diminui a concentração de ferro dissolvido, a concentração de ferro na célula aumentou.

Châtellier e Fortion (2004) através do estudo da adsorção de íons ferrosos nas células de *Bacillus subtilis*, mostraram que adsorção aumentou à medida que o pH aumentou. Além disso, Fowle e Fein (2000) mostraram que a adsorção de Cd^{+2} e Ca^{+2} na mesma bactéria foi totalmente reversível. Portanto, nossos resultados podem sugerir que, à medida que a fermentação progrediu e, conseqüentemente, houve diminuição do pH, o ferro desprendeu das células bacterianas.

A Tabela 5.6 apresenta a comparação dos resultados obtidos na condição selecionada com base nas superfícies de resposta usando os modelos (Equações 5.3 e 5.4) encontrados para as respostas avaliadas e os resultados experimentais da cinética fermentativa.

	Conversão (molH ₂ /mol de substrato consumido)	Produtividade (mmolH ₂ /Ldia)
Modelo	4,07	86,08
Experimento	3,89 ± 0,3	87,05 ± 2

Os valores obtidos pelo experimento e do modelo estão bastante próximos, o que indica que houve reprodutibilidade dos resultados tanto em termos de rendimento quanto de produtividade.

5.3.1- Rotas metabólicas na produção de hidrogênio

Durante o processo fermentativo acompanhou-se a formação dos metabolitos durante o tempo. O perfil da concentração de etanol e dos ácidos orgânicos voláteis pode ser observado na Figura 5.9. Os principais produtos ao final da fermentação (93 h), foram ácido láctico (3,63 g/L), seguido de ácido butírico (2,62 g/L), ácido propiônico (1,75 g/L), ácido acético (1,53 g/L) e etanol (1,30 g/L).

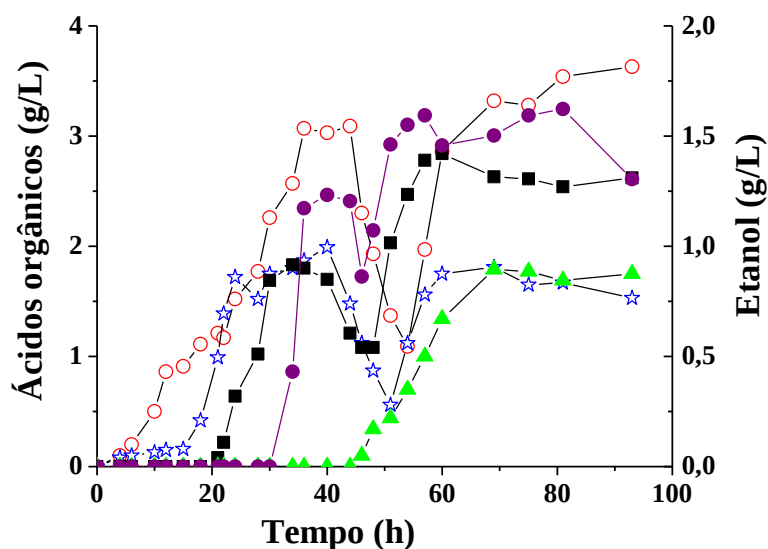
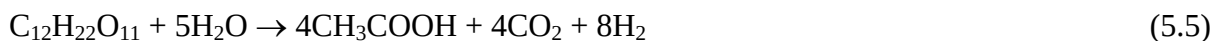


Figura 5.9 – Variação da concentração dos metabolitos formados (ácido acético (☆), ácido butírico (■), ácido propiônico (▲), ácido láctico (○), etanol (●)) durante os ensaios da fermentação escura utilizando cultura mista anaeróbica nas condições ótimas iniciais ((pH de 7,0, C_{FeSO4} de 0,6 g/L, C_{(NH4)2SO4} de 1,5 g/L).

Para se ter a relação entre os metabólitos produzidos e rendimento de hidrogênio, é necessário analisar as possíveis vias metabólicas na degradação da lactose como a fonte de carbono.

Após difusão nas bactérias, a lactose é hidrolisada em glicose e galactose devido à ação da β -galactosidase. A conversão de 1 mol de lactose pode corresponder a 2 moles de glicose, uma vez que o balanço de massa e energia das etapas de oxidação de ambos os monossacarídeos são convertidos a piruvato (NAPOLI et al., 2012). Assim, 1 mol de lactose pode ser oxidado para 4 moles de piruvato, que podem ser convertidos em 4 moles de lactato ou 4 moles de propionato. Piruvato também pode seguir outra rota, sendo convertido em acetil-CoA. Esta via pode resultar em 4 moles acetato ou 4 moles de etanol. Se o butirato é o produto, neste caso, o rendimento máximo será de 2 moles de H_2 (REN; WANG; HUANG, 1997).

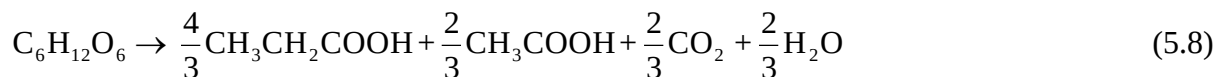
Com base na Equação 5.5, pode-se notar que, se não há produção de etanol, o rendimento teórico de hidrogênio em lactose pode atingir 8 mol H_2 /mol lactose, o equivalente a 4 mol H_2 /mol hexose (COLLET et al., 2004; DAVILA-VAZQUEZ et al., 2011; CALLI et al., 2008).



A formação de etanol e butirato para a fermentação da lactose é representada pelas Equações 5.6 e 5.7 respectivamente (COLLET et al., 2004). Na rota do ácido butírico o rendimento máximo é 4 mol H_2 /mol lactose DAVILA-VAZQUEZ et al., 2011; CALLI et al., 2008):



A respeito do ácido propiônico, o balanço estequiométrico é descrito pela Equação 5.8, que mostra que o hidrogênio não é produzido por essa rota (REN; WANG; HUANG, 1997; ZHU et al., 2009).



Os ácidos orgânicos obtidos durante o processo de fermentação são produzidos com o objetivo de manter a relação NADH/NAD^+ . Assim, o tipo de via metabólica pode ser designado como de tipo-propiónico, tipo-butírico e do tipo-etanol, entre outros. Devido à formação de outros metabólitos, a conversão de hidrogênio em lactose pode ser inferior ao valor teórico (REN; WANG; HUANG, 1997; DAVILA-VAZQUEZ et al., 2011; HWANG et al., 2004).

Os resultados deste trabalho indicaram que os produtos principais foram o ácido láctico e ácido butírico e o montante deles correspondeu a cerca de 58% do total dos metabólitos. Assim, a via predominante foi do tipo lactato e butirato na fermentação para a produção de hidrogênio avaliada neste estudo.

Os trabalhos relacionados à produção de H_2 por fermentação escura usando lactose ou soro de queijo descritos na literatura, em geral, apresentam uma distribuição diferente em concentrações de sub-produtos, exceto no trabalho desenvolvido por Rosales-Colunga, Razo-Flores e Rodríguez (2012). No seu trabalho, durante todo o processo de fermentação (600 h), o lactato foi o principal metabólito e sua concentração máxima atingiu 5 g/L a 27 h e manteve-se constante até ao final do ensaio. Eles também detectaram a formação de etanol e acetato (2 g/L), seguido por succinato (1 g/L). Os autores investigaram a produção de H_2 a partir da lactose por *Escherichia coli* WDHL e observaram que a lactose foi hidrolisada e que o processo fermentativo foi caracterizado por duas fases. Na primeira fase, ocorreu o consumo de glicose e na segunda, a galactose foi consumida lentamente.

5.4- Avaliação da influência das variáveis temperatura e magnésio no processo fermentativo

Definidas as concentrações de sulfato de amônio 1,5 g/L, sulfato ferroso 0,6 g/L e o valor do pH inicial igual a 7, um estudo foi realizado para avaliar o efeito da concentração de sulfato de magnésio e da temperatura no processo fermentativo. Os resultados obtidos para a resposta estudada estão mostrados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7 – Resultado do PCC para as variáveis temperatura e concentração de sulfato de magnésio no processo fermentativo.

	Temperatura(°C) (X ₁)	MgSO ₄ (g/L) (X ₂)	Produtividade (mmolH ₂ /L.dia)	Conversão (molH ₂ /mol substrato consumido)
1	-1 (30)	-1 (0,48)	70,21	2,63
2	-1 (30)	1 (1,28)	127,80	4,84
3	1 (40)	-1 (0,48)	47,46	2,27
4	1 (40)	1 (1,28)	52,19	3,14
5	-1,14 (27,9)	0 (0,88)	81,75	3,13
6	1,14 (42)	0 (0,88)	35,86	2,16
7	0 (35)	-1,14 (0,31)	79,26	3,66
8	0 (35)	1,14 (1,44)	93,72	4,67
9	0 (35)	0 (0,88)	105,35	4,53
10	0 (35)	0 (0,88)	101,04	4,45
11	0 (35)	0 (0,88)	100,59	4,55

O valor de α usado no planejamento foi de 1,14

Através dos resultados apresentados na Tabela 5.7 e considerando um teste de hipóteses *t de Student* com uma área de rejeição de 5 %, obteve-se a os diagramas de pareto para a conversão e para a produtividade respectivamente (Figura 5.10).

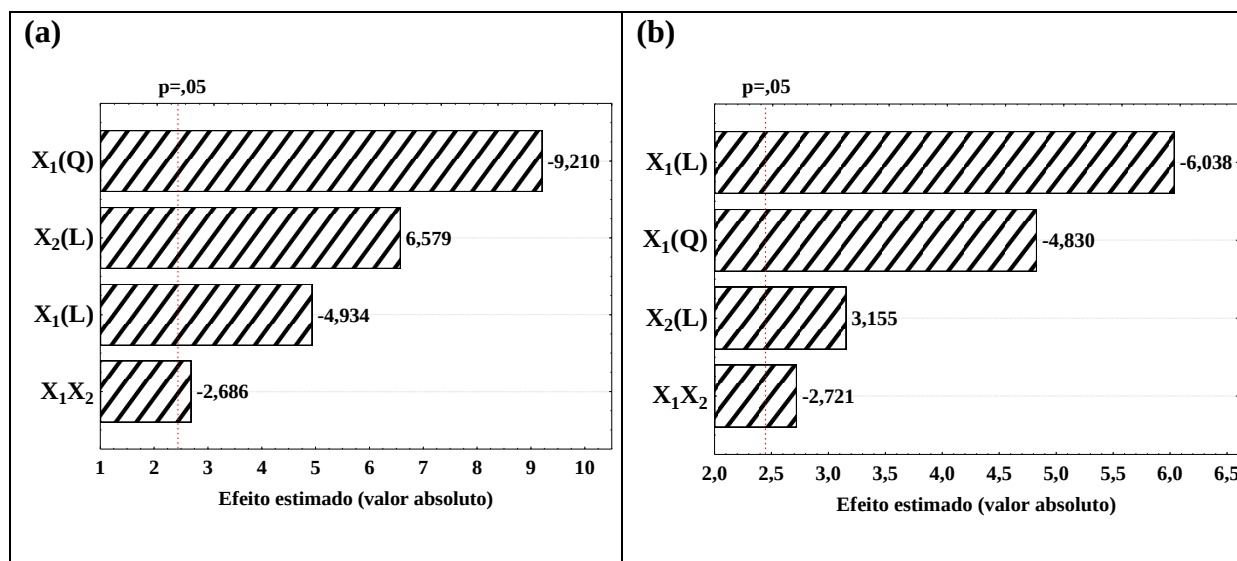


Figura 5.10 – Diagrama de Pareto com variáveis significativas para as respostas conversão (a) e produtividade de hidrogênio (b).

A Figura 5.10 mostra o gráfico de Pareto com os efeitos padronizados. A linha pontilhada indica a magnitude que o efeito deve ter para ser considerado significativo adotando 95 % de confiança.

Analisando a Figura 5.10 pode-se perceber que nem todas as variáveis foram significativas para as respostas conversão e produtividade. O efeito quadrático da variável concentração de magnésio não se mostrou estatisticamente significativo a 95 % de confiança. Logo, este efeito foi eliminado do modelo. As equações ajustadas para o modelo empírico das respostas conversão e produtividade de hidrogênio em função das variáveis significativas codificadas são mostradas nas Equações 5.9 e 5.10, respectivamente.

$$\text{Conversão} = 4,39 - 0,47 X_1 - 1,23 X_1^2 + 0,63 X_2 - 0,33 X_1 X_2 \quad (5.9)$$

$$\text{Produtividade} = 96,58 - 22,76 X_1 - 25,19 X_1^2 + 11,89 X_2 - 13,21 X_1 X_2 \quad (5.10)$$

O coeficiente de correlação (R^2) obtido após o ajuste foi de 96,37 % para conversão e 93,5 % para a produtividade, o que indica que 96,37 e 93,5 % dos resultados são representados pelos modelos propostos respectivamente. O sinal negativo que acompanha a variável linear da temperatura (X_1), indica que um aumento no valor da variável proporciona redução nas respostas estudadas. Esse efeito pode ser observado comparando as respostas dos experimentos 1 e 3. A mesma análise pode ser feita para o sinal positivo que acompanha a variável linear da concentração de sulfato de magnésio (X_2), esse sinal indica que um aumento na variável estudada provoca um efeito positivo na produtividade e na conversão de H_2 .

A partir dos modelos preditivos, as superfícies de resposta foram construídas. A Figura 5.11 ilustra as superfícies de resposta e a curva de contorno em função de X_1 e X_2 para as respostas estudadas.

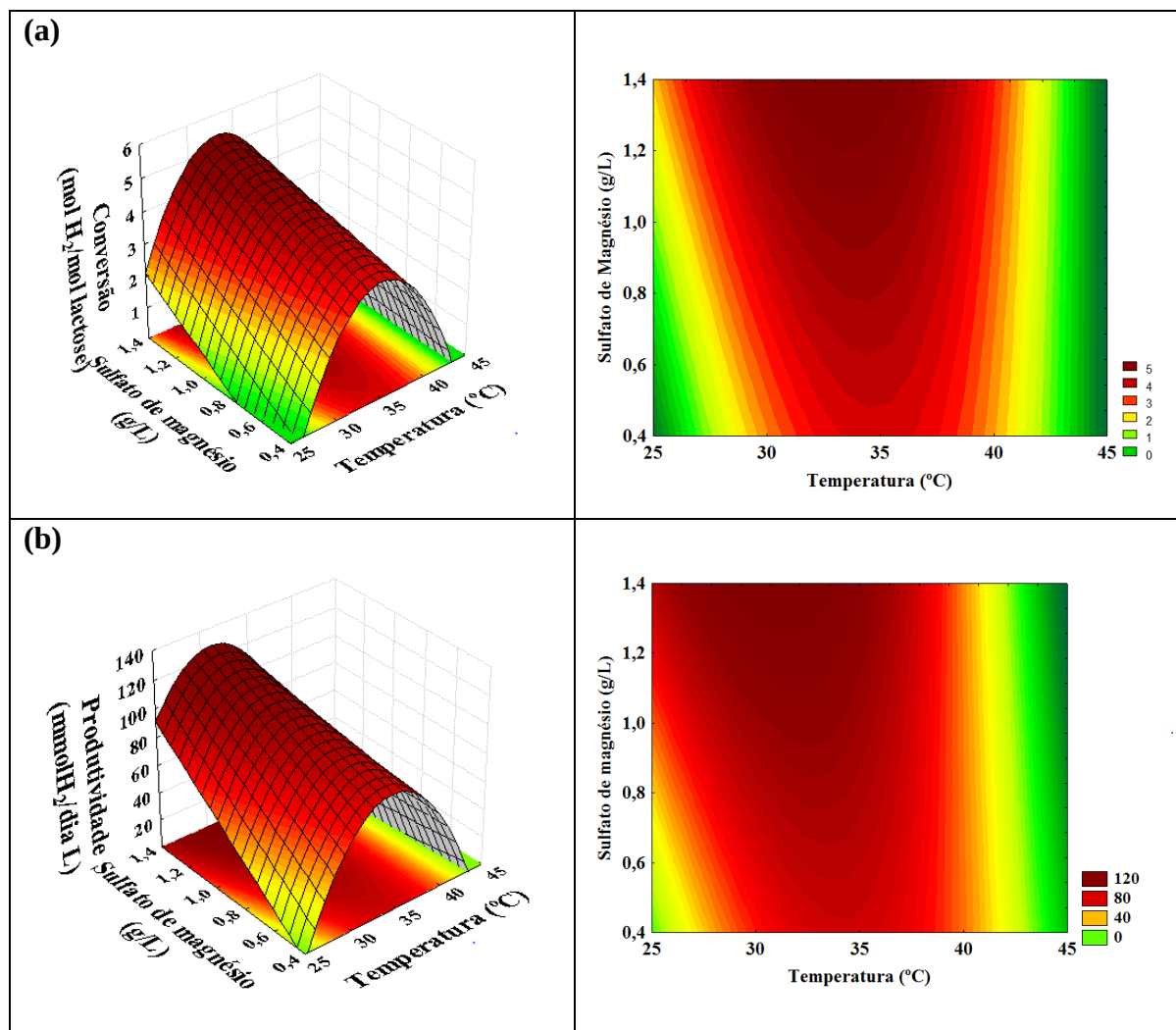


Figura 5.11 – Superfície de resposta e curva de contorno para a (a) conversão e (b) produtividade de hidrogênio em relação às variáveis sulfato de magnésio e temperatura.

Observando a Figura 5.11 nota-se que às variáveis concentração de sulfato de magnésio e temperatura influenciaram a produção de biohidrogênio. Analisando as curvas de contorno verifica-se que quando a temperatura do sistema encontra-se abaixo de 30 °C ou acima de 40 °C para a conversão e acima de 40 para a produtividade, o efeito da concentração de sulfato de magnésio é baixo. A mudança na concentração não afetou significativamente as respostas estudadas. Porém já na faixa de 30 à 40 °C percebeu-se que o aumento da concentração do sal provocou um aumento nas respostas estudadas. Sendo que a faixa que apresentou melhores resultados foi a temperatura de 30 a 35 °C e a de concentração de sulfato de magnésio de 1 a 1,4 g/L. Verificado o comportamento defini-se trabalhar com uma concentração de sulfato de magnésio de 1,28 g/L e uma temperatura a 30 °C

Assim como neste trabalho grande parte dos estudos mais recentes sobre a produção de hidrogênio a partir de resíduos orgânicos foram realizados sob condições mesofílicas, entre

30 °C (LEE e CHUNG, 2010) e 40 °C (WANG e ZHAO, 2009), ou ainda mais especificamente na faixa de 35 - 37 °C (DONG et al., 2009; HONG e HAIYUN, 2010; KIM et al., 2010, 2011b; MING, et al., 2008; ZONG et al., 2009).

Pandey et al. (2009) avaliaram o efeito da temperatura na produção de hidrogênio, sendo a faixa estudada de 27 - 40 °C. Os autores observaram que a produção de hidrogênio aumentou com o aumento da temperatura até 30 °C. Após esse valor, o aumento na temperatura provocou uma diminuição na produção, sendo o valor máximo obtido de 2,1 molH₂/mol de glicose a temperatura de fermentação de 30 °C.

Yossan, O-Thong e Prasertsan (2012) avaliaram o efeito da temperatura na produção de hidrogênio utilizando um consórcio microbiano e efluente de óleo de palma (EOP). As temperaturas testadas foram 25, 37, 45 e 55 °C. O tempo gasto para que a produção atingisse a fase estacionária foi de 75, 63, 53 e 53 h, respectivamente. Para avaliar o efeito da temperatura, os autores utilizaram a cinética de Gompertz, em que a máxima produção de hidrogênio (985,3 mL/L-EOP) foi obtida a 55 °C, seguida de 37 °C e 45 °C (948,29 e 939,96 mL/L-EOP, respectivamente). A 25 °C, a produção foi 706,42 mL/L-EOP com uma taxa de produção de 22,52 mL/L/h e apresentando um maior tempo de fase *lag*. A máxima taxa de produção (75,99 mL/L/h) foi alcançada para 45 °C, porém o maior rendimento (27,09 mL/g DQO) foi alcançado a 37 °C.

Zhang e Shen (2006) demonstraram que a temperatura afetou a produção de biohidrogênio, modificando o metabolismo dos micro-organismos. Os autores constataram que pequenos gradientes de temperatura provocaram um aumento na produção de hidrogênio, enquanto que um grande aumento causou a inibição da produção de hidrogênio. Os resultados obtidos indicaram que a sensibilidade do consócio à temperatura foi significativamente alta e a temperatura ótima para produção de hidrogênio foi de cerca de 35 °C com um rendimento de 371,7 mL.

Já no trabalho de Kim et al. (2011c), o efeito da temperatura foi investigado tanto na faixa mesofílica quanto termofílica (35 - 60 °C). A fermentação foi realizada com resíduos alimentares na ausência de qualquer inóculo específico e foi constatado que o menor e os maiores rendimentos de produção de H₂ foram associados a temperaturas de 35 e 50 °C, respectivamente. Embora em ambos os casos, a quantidade de ácidos orgânicos foi comparável, o lactato foi predominante a 35 °C, enquanto que o butirato foi o componente principal a 50 °C. A análise microbiológica do meio de fermentação, também indicou que as espécies dominantes foram as bactérias produtoras do ácido láctico a 35 °C e as produtoras de

H₂ a 50 °C, confirmando assim o papel de temperatura em ditar a natureza do consórcio microbiano durante o processo.

Por outro lado, as temperaturas elevadas também têm sido relatadas como indutoras da desnaturação térmica de proteínas e enzimas essenciais, atuando de forma negativa na atividade microbiana (LEE; LIN; CHANG, 2006).

Portanto, para cada processo existe uma temperatura ótima, que depende de vários fatores como o tipo de micro-organismos utilizados, condições operacionais do sistema e suplementos adicionados a meio (SÁ, 2011). A temperatura ótima (30 °C) encontrada neste trabalho, caracterizada como uma temperatura mesofílica (25-40 °C), possibilitou ao processo a vantagem de não haver necessidade de aquecimento do biorreator, minimizando assim o consumo energético no processo e o custo operacional tornando o processo mais atrativo economicamente. Diante disso escolheu-se trabalhar com a temperatura de 30 °C na fermentação nos ensaios seguintes.

Uma vez que os íons de magnésio atuam como co-fatores de muitas enzimas da via glicolítica, o aumento da sua concentração no meio de crescimento pode favorecer a glicólise. Por outro lado, o acúmulo da concentração de metabólitos da via glicolítica, tais como frutose-1,6-difosfato, 3-fosfoglicerato e fosfoenol piruvato inibem a glicólise. A produção de hidrogênio na fermentação escura ocorre a partir da transferência de elétrons da ferredoxina reduzida para os prótons H⁺ na presença da enzima hidrogenase. A ferredoxina é reduzida seja pela oxidação do piruvato ou pela oxidação do NADH, ambos formados a partir da via glicolítica. Se há inibição da glicólise, haverá pouca ou nenhuma formação de NADH ou piruvato e conseqüentemente a produção de hidrogênio cessa. Portanto, uma concentração ótima de magnésio deve estar presente para maximizar a produção de H₂ (SINHA e PANDEY, 2009).

Diversos autores reportaram aumento da produção de hidrogênio em processos fermentativos após a adição de íons Mg²⁺. WANG et al. (2007) verificaram que o aumento na concentração de MgCl₂.6H₂O de 10 – 200 mg/L provocou também um aumento na produção de hidrogênio, passando de 934,9 para 2360,5 mL H₂/L cultura. Os autores perceberam que após 5h de fermentação todo o magnésio tinha sido consumido quando 10 mg/L de MgCl₂.6H₂O foi adicionado na fermentação. Entretanto, após 15 h não houve mais a produção de hidrogênio, sendo a glicose residual de 2 g/L. Ao se utilizar 200 mg/L de MgCl₂.6H₂O, em 5 h de fermentação somente 19,8 % do magnésio foi consumido, mas o aumento da

concentração de magnésio não provocou a inibição da fermentação, já que toda a glicose foi consumida produzindo 2360,5 mLH₂/L após 20 h de fermentação.

GUO et al. (2009) avaliaram os efeitos dos componentes nutricionais na produção de hidrogênio utilizando como inóculo a bactéria *E. harbinense* B49 e como fonte de substrato glicose. Os autores observaram que, dentro da faixa estudada 100 - 800 mg de Mg²⁺/L, a concentração que apresentou maior resultado foi a de 691,98 mg Mg²⁺/L com um rendimento de 2,21 molH₂/mol de glicose.

Lin e Lay (2005) também avaliaram a influência dos componentes nutricionais na produção de biohidrogênio. O estudo realizado foi conduzido em batelada a 35 °C, sendo a sacarose utilizada como substrato e um consórcio microbiano utilizado como inóculo. Os resultados obtidos mostram que o magnésio foi o nutriente que apresentou maior efeito sobre a produção de hidrogênio. Os autores também verificaram que traços de zinco, sódio e ferro são fundamentais para o crescimento dos micro-organismos. O maior rendimento foi de 3,52 molH₂/mol sacarose quando as concentrações dos nutrientes foram de 120 mg/L de MgCl₂·6H₂O, 1000 mg/L de NaCl, 0,5 mg/L de ZnCl₂ e 3 mg/L de FeSO₄·7H₂O.

Comparando os resultados obtidos neste estudo com os apresentados acima nota-se que a faixa apresentada pela curva de contorno (Figura 5.11) está próxima dos valores encontrados na literatura, sendo que neste trabalho os valores obtidos para as respostas estudadas em alguns casos foram maiores.

5.5- Processo fermentativo em escala ampliada

Definidas as condições ótimas para produção de biohidrogênio em testes preliminares, 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 condições de fermentação ótimas foram: porcentagem de inóculo de 1,6 % v/v, concentração de lactose 20 g/L, sulfato ferroso 0,6 g/L, sulfato de amônio 1,5 g/L, sulfato de magnésio 1,28 g/L, temperatura 30 °C e pH inicial do meio igual a 7. A Tabela 5.8 apresenta os resultados obtidos durante o tempo. Os resultados de dióxido de carbono estão apresentados no Apêndice A.

Tabela 5.8- Avaliação da produtividade e da conversão de hidrogênio com o tempo em ampliação de escala.

Tempo (h)	Produtividade (mmolH ₂ /dia L)	Conversão (molH ₂ /mol substrato consumido)
17	9,90	0,89
21	20,39	1,23
28	70,24	2,33
39	109,14	3,30
45	89,31	2,06
50	62,02	1,06
62	40,20	0,67

A Figura 5.12 apresenta os valores de conversão e de produtividade de hidrogênio obtidos bem como a formação de metabolitos.

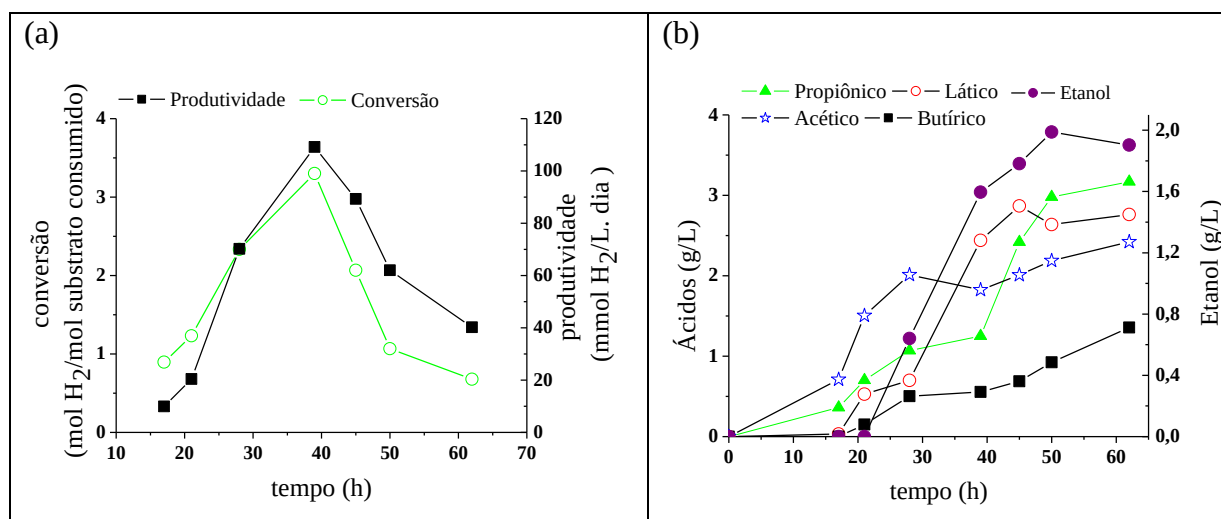


Figura 5.12 – Produtividade e conversão (a) e metabolitos (b) obtidos do processo fermentativo nas condições otimizadas sem controle de pH.

Nota-se na Figura 5.12 que a máxima produtividade obtida foi 109,14 mmolH₂/L dia, para a conversão de 3,3 molH₂/mol substrato consumido no tempo de fermentação de aproximadamente 35 h. Nota-se também que, apesar da ampliação da escala, os valores obtidos para as respostas em estudos anteriores foram próximos dos valores em menor escala (127,8 mmolH₂/L dia e 4,84 molH₂/mol respectivamente). Os ácidos formados durante a fermentação foram propiônico, acético, láctico e butírico, além de outro metabólito, o etanol. Observa-se que, após 40 h de fermentação, ocorreu um decréscimo nas respostas estudadas e consequentemente um aumento na concentração dos metabólitos da reação. Uma redução do pH também foi observada atingindo um valor de 4,0 em 40 h de fermentação.

5.6- Fermentação com controle de pH

Como já citado anteriormente no item 5.3.1, o pH exerceu uma alta influência no metabolismo microbiano, por isso duas fermentações foram realizadas com controle do pH durante o processo fermentativo para verificar se ocorreria alguma modificação na rota metabólica do consórcio microbiano. Os valores de pH avaliados foram 6,5 e 5,5. Os resultados obtidos estão representados nas Figuras 5.13 e 5.14 respectivamente.

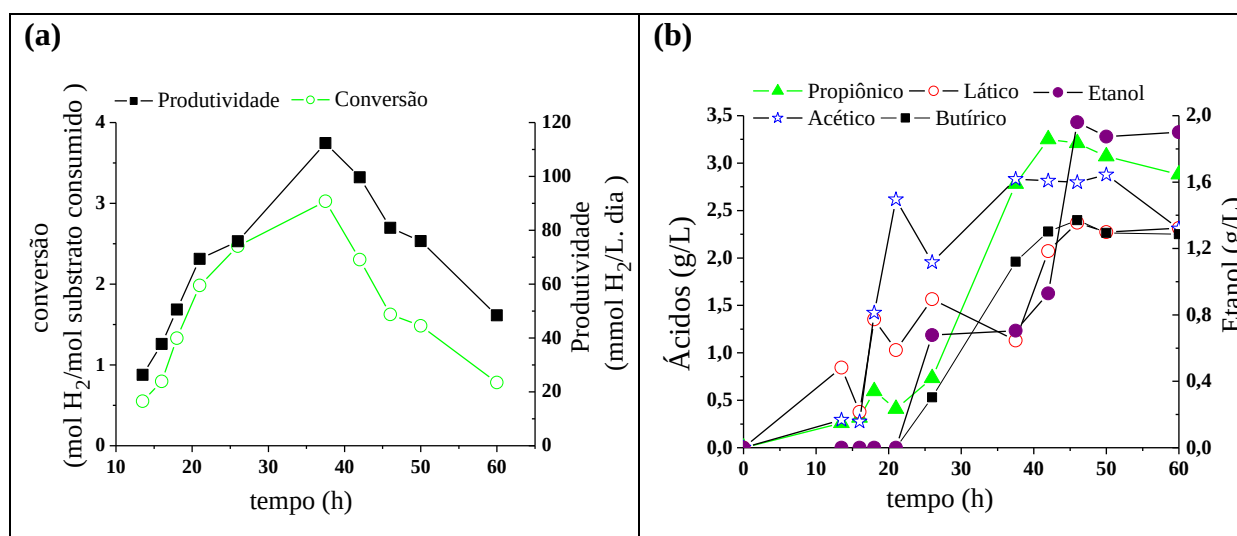


Figura 5.13 – Produtividade e conversão (a) e metabolitos (b) obtidos do processo fermentativo nas condições otimizadas e com pH controlado em 6,5.

Observando a Figura 5.13 nota-se que, quando o pH foi mantido a 6,5, a maior produção de ácido orgânico foi do ácido acético (2,75 g/L) até aproximadamente 37 h de fermentação. Acima de 37 h, a produção do ácido propiônico que estava baixa (0,7 g/L) até 25 h de fermentação alcançou a maior concentração dos metabólitos (3,25 g/L). Durante a fermentação ocorreu também a formação de ácido lático apresentando uma concentração de (2,2 g/L) após 40 h. A formação de ácido butírico e de etanol só foi observada após 20 h de fermentação chegando a uma concentração de 2,2 e 1,9 g/L respectivamente

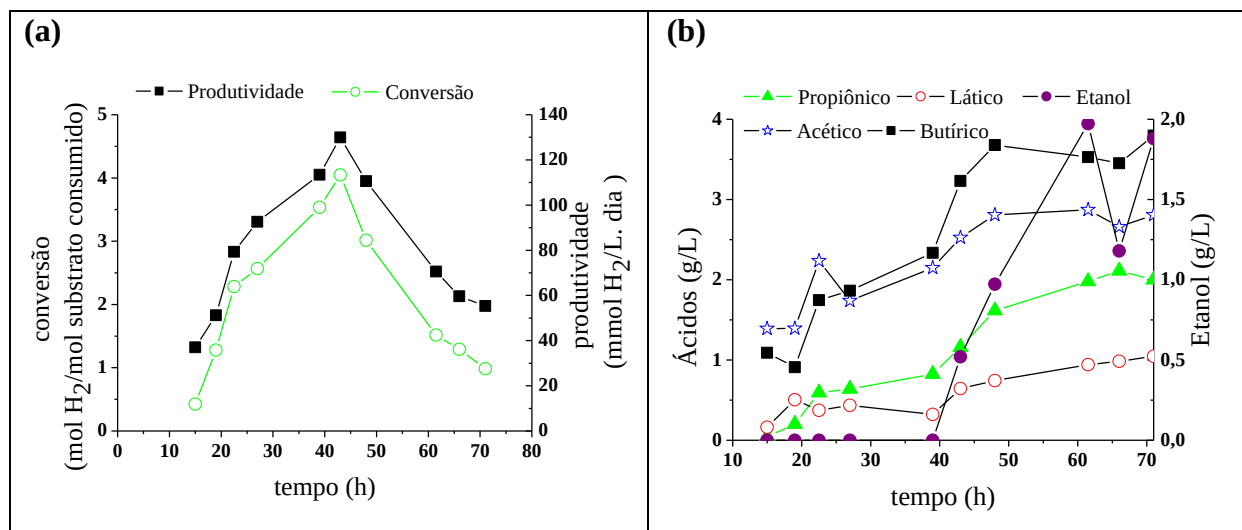


Figura 5.14 – Produtividade e conversão (a) e metabolitos (b) obtidos do processo fermentativo nas condições otimizadas e com pH controlado em 5,5.

Quando o pH foi mantido a 5,5 (Figura 5.14), a produtividade e a conversão apresentaram valores maiores (129,33 mmolH₂/dia L e 4,04 molH₂/mol substrato consumido) do que quando o pH foi controlado a 6,5 (112,39 mmolH₂/dia L e 3,02 molH₂/mol substrato consumido) respectivamente. Nota-se também um comportamento diferente na formação dos metabólitos na fermentação com controle pH 5,5. O ácido formado em maior concentração foi o ácido butírico (3,5 g/L) seguido do ácido acético (2,5 g/L). As concentrações de ácido lático e etanol foram baixas e a concentração do propiônico também foi menor (2,0 g/L).

A Tabela 5.9 apresenta a comparação entre os valores encontrados nos ensaios sem e com controle do pH durante o processo fermentativo, em escala ampliada.

Tabela 5.9- Resultados obtidos nos ensaios fermentativos com e sem controle de pH.

pH	Produtividade (mmolH ₂ /dia L)	Conversão (molH ₂ /mol substrato consumido)
Sem controle e iniciado em 7	109,14	3,3
Inicial 7 e controlado em 5,5	129,33	4,04
Inicial 7 e controlado em 6,5	112,39	3,02

Pela Tabela 5.9 é possível concluir que quando o controle do pH foi realizado em 5,5 durante o processo fermentativo obteve-se um aumento de 18,5 % para a produtividade e de 22,4 % para a conversão. Verificado o aumento nas respostas estudadas decidiu-se trabalhar com o controle do pH durante a fermentação em 5,5 nos experimentos subsequentes.

Segundo Guo et al. (2010) valores de pHs abaixo de 6 favoreceram a formação de butirato e acetato, enquanto que valores acima de 6 favoreceram a formação de etanol e ou propionato. Sendo assim definiu-se manter o pH do processo fermentativo em 5,5 nos ensaios realizados posteriormente.

5.7- Fermentação em batelada sequencial

Como visto nas fermentações em batelada, a produtividade e a conversão de hidrogênio atingiram um ponto máximo e depois caíram com o tempo. Para tentar manter essa produção por mais tempo, uma fermentação semi-contínua (sistema com retirada e reposição de meio durante a fermentação) foi realizada. A fermentação foi conduzida nas condições ótimas definidas anteriormente: porcentagem de inóculo de 1,6 %, concentração de substrato 20 g/L, sulfato ferroso 0,6 g/L, sulfato de amônio 1,5 g/L, sulfato de magnésio 1,28 g/L , temperatura 30 °C e pH inicial igual a 7 e depois mantido a 5,5. Após 24 h de fermentação, retirou-se 233 mL de meio e em seguida adicionou-se 233 mL de meio novo. Esse procedimento foi repetido após 48 h de fermentação e depois após 60 h. Os resultados encontrados estão representados na Tabela 5.10. Durante toda a fermentação não foi constatado a produção de metano, somente hidrogênio e CO₂ foram detectados no biogás produzido.

Tabela 5.10 – Resultados da fermentação em batelada sequencial sendo o volume do corte de 223 mL.

Tempo (h)	Produtividade (mmolH ₂ /dia L)	Conversão (molH ₂ /mol substrato consumido)
0	0	0
16	63,70	2,00
20,5	99,48	2,23
24	114,33	3,04
29	127,01	3,46
41,5	140,02	3,72
45,5	143,3	3,81
60	129,7	2,96
69,5	73,80	1,68
74,5	37,53	0,55

Na Figura 5.15, os dados de conversão e produtividade, bem como a produção dos ácidos orgânicos e do etanol durante o tempo estão apresentados.

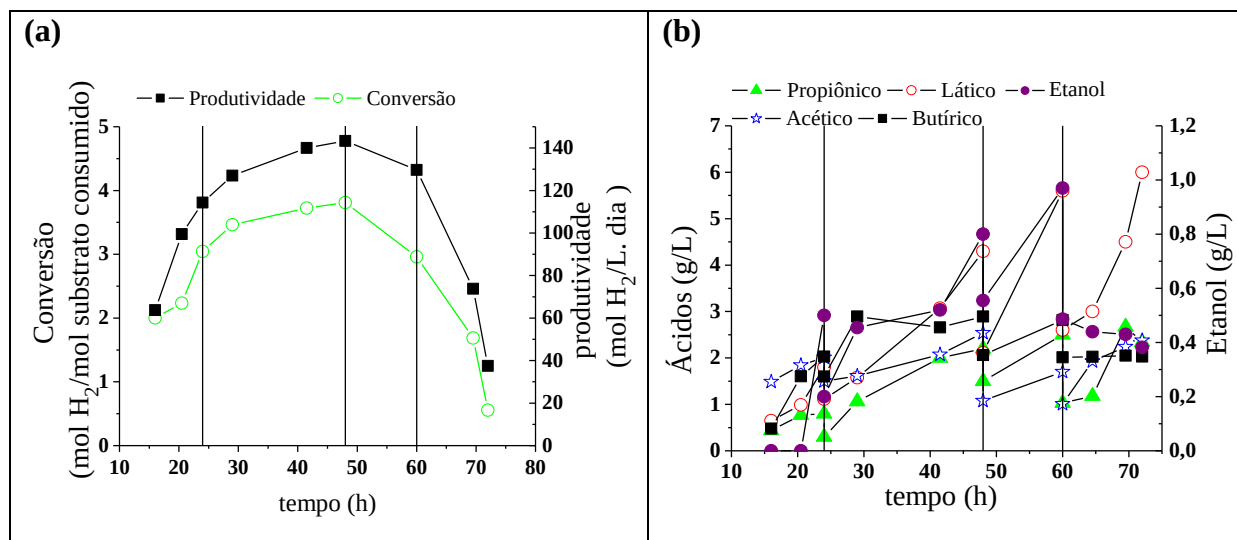


Figura 5.15 – Produtividade, conversão (a) e metabólitos (b) obtidos do processo fermentativo nas condições otimizadas com retirada de 233 mL de meio durante o processo e com pH controlado em 5,5 com reposição de nutrientes.

A Figura 5.15 mostra que os valores da produtividade e da conversão caíram para valores próximos a 50 % do valor máximo após 60 h de processo. Em relação aos metabólitos formados e analisados a concentração de etanol permaneceu baixa, ácido acético e ácido butírico permaneceram constantes entre o primeiro e o segundo corte e foram os que apresentaram maior concentração até 60 h de fermentação. Já a concentração de ácido propiônico aumentou depois do primeiro corte atingindo uma concentração de 2,2 g/L no final do ensaio.

A Figura 5.15 indica que o sistema em corte pode ajudar a manter a produção de hidrogênio por mais tempo (40 h no processo sem corte para 60 h no processo com cortes). Em 60 h, a queda na produtividade foi de 9,5 % e em 69,5 h de 48,5 %. O aumento no tempo de produção de hidrogênio pode estar relacionado a retirada de metabólitos tóxicos do processo (diminuição ou manutenção da concentração dos metabolitos identificados e de outros não analisados). Os resultados mostram que após 60 h de fermentação, a concentração de ácido lático continua a aumentar, ao contrário dos outros ácidos analisados. Este fato indica que o corte estimulou as bactérias produtoras de ácido lático e inibiu a produção de hidrogênio.

Calli et al. (2008) estudaram a influencia do pH na produção de hidrogênio utilizando lactose e xilose como substrato em batelada sequencial. Os autores observaram que a rota metabólica era alterada dependendo do pH utilizado. Além disso o estudo mostrou que quando o pH era mantido em 5 ao final da terceira corrida um decréscimo do rendimento era

observado passando de 3,4 a 1,7 mol H_2 / mol de lactose. Esse decréscimo estava associado ao desvio da produção de acetato e butirato para a produção de etanol e lactato.

Na tentativa de aperfeiçoar o sistema realizou-se uma fermentação aumentando o volume dos cortes de 233 mL para 466 mL de meio. Os cortes foram feitos a cada 28 h. Os dados estão apresentados na Tabela 5.11 e na Figura 5.16.

Tabela 5.11 – Resultados da fermentação em batelada sequencial sendo o volume do corte de 466 mL.

Tempo (h)	Produtividade (mmol H_2 /dia L)	Conversão (mol H_2 /mol de substrato consumido)
21,5	60	1,5
28	104	2,6
33,5	120	3,0
46	140	3,6
50,5	148,2	3,9
56	142	3,3
71	132	2,74
76	67,7	1,5
78,5	24	0,6
87,5	28,36	0,70
98,5	21,23	0,53
113	23,45	0,58
118	58,14	1,45
137,5	12	0,39
142	0,70	0,01
147	9,47	0,23
158	9,22	0,23
162,5	1,49	0,03
167	12,75	0,31

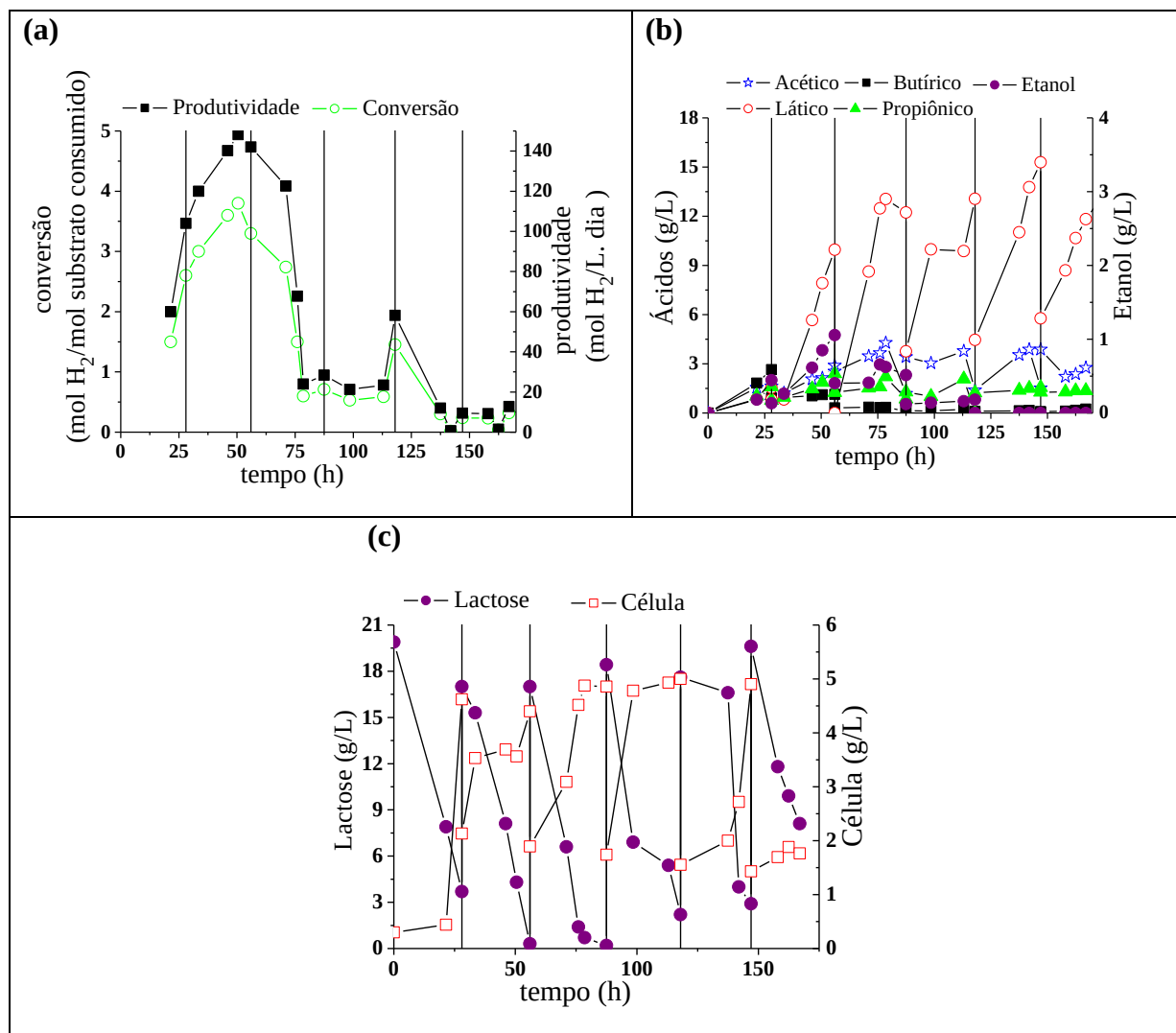


Figura 5.16 – Produtividade, conversão (a), metabolitos (b) e crescimento celular (c) obtidos do processo fermentativo nas condições otimizadas com retirada e de 466 mL de meio durante o processo e com pH controlado em 5,5.

Analisando a Figura 5.16 notou-se que retirando 466 mL, a produtividade e a conversão mantiveram-se com valores próximos ao máximo até por volta de 71 h, apresentando um valor máximo em torno de 148,2 mmolH₂/dia L e 3,9 molH₂/mol de substrato consumido para a produtividade e conversão, respectivamente. Em 71 h ocorreu uma queda de 10,5 % em relação ao valor máximo. Após 71 de fermentação a produtividade e a conversão diminuíram significativamente (próximo de 50 % do valor máximo). Em relação aos metabolitos formados, verifica-se uma baixa concentração até 50 h de fermentação, com exceção do ácido láctico. Notou-se também que a retirada maior de meio diminui a concentração do ácido láctico, porém este volta a atingir concentrações altas, mantendo-se no final de cada corte entorno de 13 g/L.

Verifica-se também que retirando 466 mL o processo fermentativo manteve a produtividade e a conversão por mais tempo quando comparado com o corte de 233 mL. Este fato confirma a hipótese anterior que a retirada de metabólitos do processo é importante para que não ocorra uma queda significativa das respostas em análise. Por outro lado, notou-se também que em cada corte há uma redução na biomassa (Figura 5.16 c), este fato também deve contribuir para a manutenção na produção de hidrogênio por um tempo maior, pois testes preliminares mostraram que existe uma quantidade de biomassa que favorece a produção de hidrogênio (item 5.1.1). Os resultados mostram também que após 150 h de processo a biomassa final de cada corte começa a diminuir e este fato pode indicar que está ocorrendo morte com lise celular.

A alta concentração de ácido láctico indica a presença de bactérias produtoras deste metabólito no consórcio microbiano. Algumas espécies de bactérias produtoras de ácido láctico produzem bacteriocinas que podem afetar as bactérias produtoras de hidrogênio. Essas bactérias são muito empregadas na indústria de alimentos com intuito de aumentar a vida de prateleira do produto. Noike et al. (2002) perceberam que quando a produção de hidrogênio cessava a concentração de ácido láctico era alta. Sendo assim os autores avaliaram a produção de hidrogênio utilizando polipeptídios juntamente com proteases para verificar se as bacteriocinas estavam afetando as bactérias produtoras de hidrogênio. Em seus resultados, os autores mostraram que ao realizar a fermentação adicionando nisina no meio fermentativo, a produção de hidrogênio não ocorreu. Mas quando a fermentação foi conduzida com nisina e quimotripsina houve a produção de hidrogênio. Além deste teste, os autores realizaram fermentações adicionando no meio fermentativo o sobrenadante da cultura de *Lactobacillus paracasei* e tripsina e concluíram que os polipeptídeos formados provocam a inibição da produção de H₂ porém, quando uma protease é adicionada essa inibição é amenizada.

Visto que a concentração de ácido láctico atingiu valores altos ao final de cada 28 h de fermentação, outro procedimento foi aplicado no processo modificando o tempo de cada corte. Nesse ensaio, cortes a cada 24 h nas duas primeiras 24 h foram realizados. Em seguida, os cortes foram realizados a cada 12 h até as 168 h de fermentação. Essa alteração no tempo foi realizada com o objetivo de se obter uma concentração baixa de ácido láctico e com isso o processo prosseguir por mais tempo, o volume retirado foi de 466 mL em cada corte. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.12

Tabela 5.12 – Resultados da fermentação em batelada sequencial sendo o volume do corte de 466 mL e o tempo do corte de 24 e 12 h.

Tempo (h)	Produtividade (mmolH ₂ /dia L)	Conversão (molH ₂ /mol de substrato consumido)
10	57,93	1,44
24	96,33	2,47
36,5	120,81	2,9
48	138,02	3,62
54	156,21	4,01
72	152,34	3,8
78	144,32	3,4
84	138,4	3,02
96	69,54	1,48
101,5	48,88	1,22
108,5	4,17	0,10
120,5	7,93	0,19
126	0,66	0,01
132,5	3,29	0,08
144,5	5,89	0,14
150	33,99	0,89
156,5	0,71	0,01
168,5	1,78	0,04
174,5	1,81	0,04
186,5	0,89	0,02

Para melhor avaliar os resultados encontrados, estes foram dispostos em forma de gráficos que são mostrados na Figura 5.17.

A Figura 5.17 mostra que, reduzindo o tempo de corte, a queda na produtividade e na conversão torna-se sensível após 84 h (próximo de 50 %). A modificação no tempo do corte aumentou o tempo de fermentação quando comparado com os cortes realizados no tempo de 28 h.

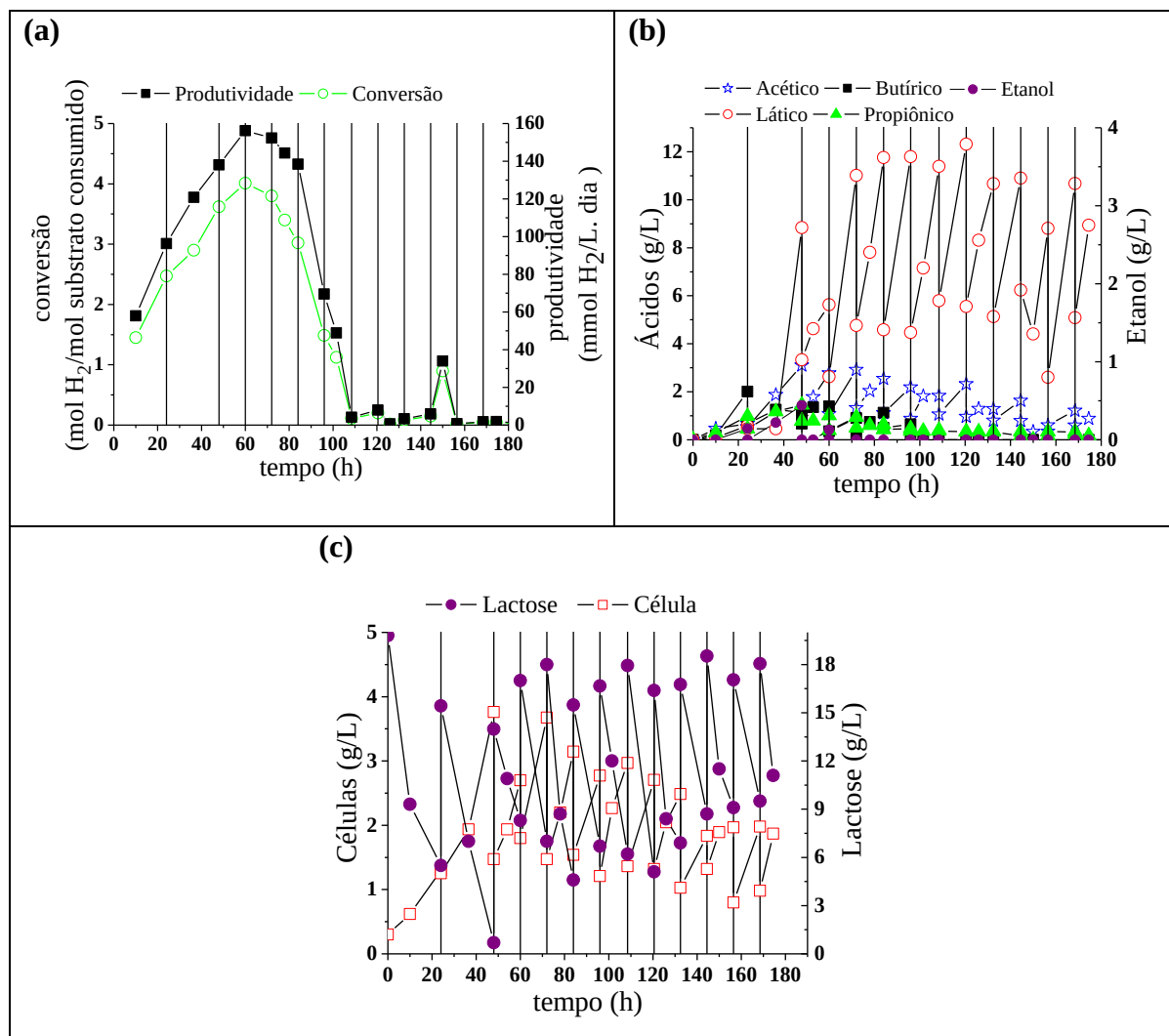


Figura 5.17 – Produtividade e conversão (a), metabólitos (b) e crescimento celular (c) obtidos do processo fermentativo nas condições otimizadas com retirada e de 466 mL de meio durante o processo com cortes de 24 h e com pH controlado em 5,5.

Em relação aos metabólitos formados observa-se que a concentração de ácido láctico permaneceu baixa até 40 h de fermentação. Após o segundo corte a concentração de lactato atingiu valores superiores a 8,7 g/L. Com a retirada do meio, essa concentração reduz para 3,8 g/L, porém ao final do quarto corte volta a atingir valores elevados e concentrações próximas a de 11 g/L deste ácido orgânico foram observadas. Apesar da alta concentração do ácido, a produção continuou até o quinto corte e depois observou-se que a concentração celular diminuiu progressivamente, indicando que após esse tempo houve morte com lise celular devido às condições desfavoráveis do meio. Vale ressaltar que o procedimento de cortes proporcionou altas concentrações de ácido láctico o que pode ter provocado a redução na produção de hidrogênio e, como mencionado anteriormente, pode ter ocorrido a formação de bacteriocinas que inibiram os agentes produtores de hidrogênio (ver item 3.5).

Saraphirom e Reungsang (2011) avaliaram a produção de hidrogênio em batelada sequencial utilizando como substrato xarope de sorgo sacarino. As condições de fermentação foram 25 g/L de açúcar, temperatura de fermentação mantida a 30 °C, pH mantido a 5,5 e concentração de sulfato ferroso de 1,45 g/L. Os autores testaram diferentes tempos de retenção (TR) de 96, 48 24 e 12 h. Os resultados encontrados mostraram que o aumento do TR de 12 h para 24 h resultou em incrementos do rendimento e foi possível se atingir um máximo de 0,68 molH₂/mol hexose. No entanto, após 24 h, o aumento do TR provocou um decréscimo no rendimento. Por outro lado a maior produtividade (365,67 mmolH₂/L.d) foi obtida quando o tempo de retenção foi de 12 h. Para tempos maiores, ocorreu um decréscimo na resposta.

Para verificar se realmente a concentração de metabólitos estava provocando inibição no crescimento celular, um ensaio foi conduzido de forma que os cortes foram realizados a cada 28 h de fermentação. Neste ensaio, 460 mL do meio fermentado foi retirado e o restante 240 mL foi centrifugado com o propósito de recuperar as células. Após a centrifugação, as células foram adicionadas em um novo meio e iniciada uma nova fermentação. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.13 e na Figura 5.18:

Tabela 5.13 – Resultados da fermentação em batelada com retirado de todo meio fermentado e reciclo das células sendo o tempo do corte de 28 h.

Tempo (h)	Produtividade (mmolH ₂ /dia L)	Conversão (molH ₂ /mol de substrato consumido)
0	0	0
6	0	0
10,5	43,95	0,73
24,5	90,17	1,48
28	94,35	1,54
34	110,36	3,07
48	100,08	2,06
56	1,77	0,05
72	0,04	0,001
78	0,28	0,01
83	0,22	0,009
97	0,04	0,001
102	0,56	0,01
106,5	0,72	0,01
118	0,13	0,004
124	0,24	0,006
128	0,34	0,005
142	0,84	0,01

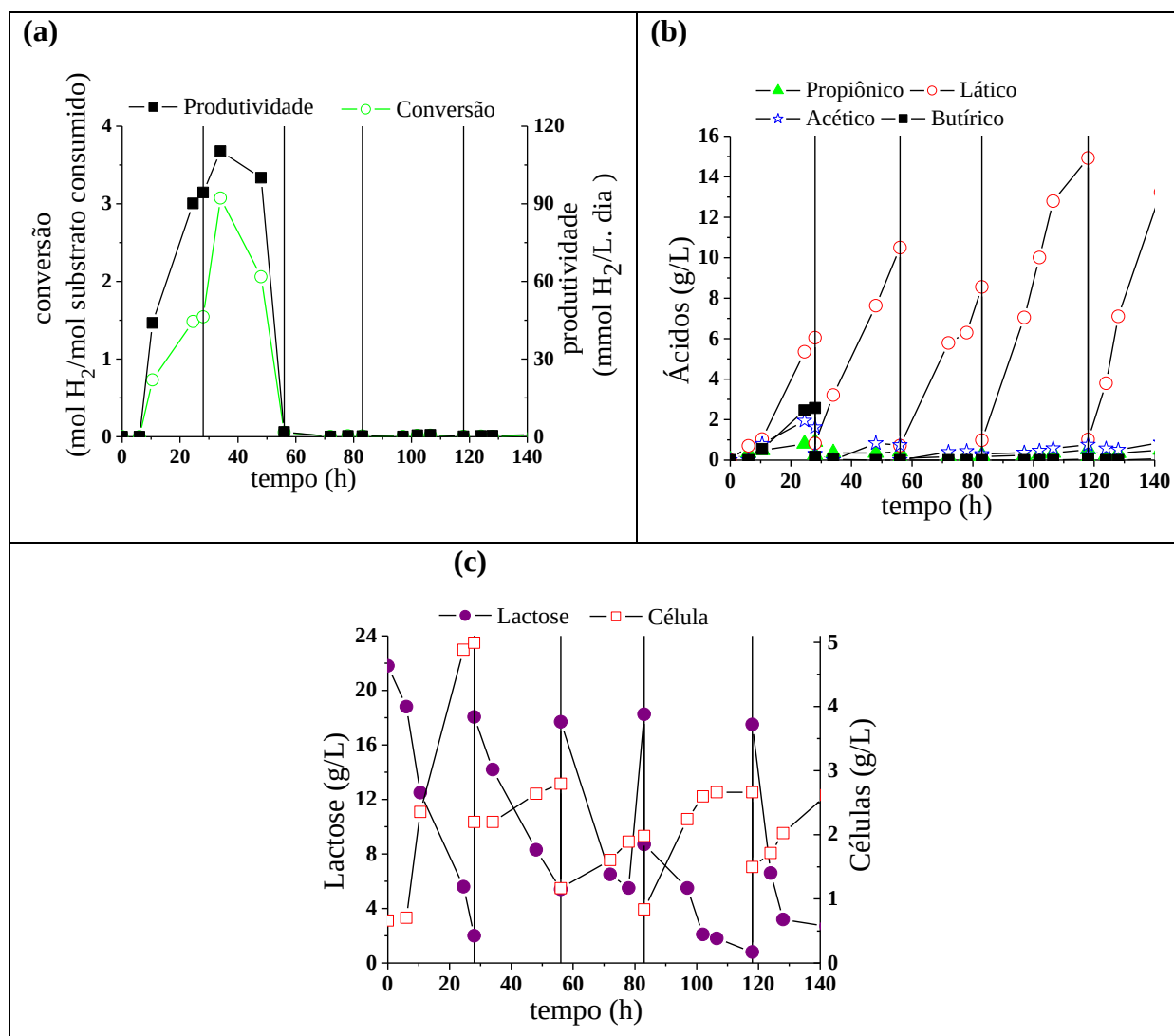


Figura 5.18 – Produtividade e conversão (a), metabolitos (b) e crescimento celular (c) obtidos do processo fermentativo nas condições otimizadas com retirada total de meio durante o processo e com pH controlado em 5,5.

A Figura 5.18 mostrou que o ensaio não aumentou o tempo de fermentação. Visto que a produção de biogás ocorreu somente até 50 h de fermentação. A retirada das células do reator possibilitou que estas ficassem expostas ao oxigênio. Essa exposição pode ter enfraquecido o inóculo, já que algumas são bactérias anaeróbias estritas, visto que, depois do segundo corte, o crescimento das bactérias foi pequeno e a produção de ácido lático também não foi inibida, influenciando o crescimento das células.

5.8- Pré-tratamento térmico

Uma vez que o inóculo utilizado neste estudo consistia de um consórcio microbiano, alguns pré-tratamentos térmicos foram realizados com o objetivo de selecionar àquelas

produtoras, o que por sua vez proporcionaria uma melhor produção de hidrogênio, ao reduzir a carga de bactérias não produtoras de hidrogênio, consumidoras de hidrogênio e os agentes produtores de toxinas que podem inibir a produção de hidrogênio.

Para o primeiro pré-tratamento térmico, o inóculo foi mantido a 93 °C durante 15 min e, em seguida, este foi colocado à temperatura ambiente. Com o inóculo pré-tratado termicamente, fermentações com temperaturas diferentes de 30, 50 e 70 °C foram realizadas. Os resultados para a fermentação a 30 °C estão apresentados na Figura 5.19.

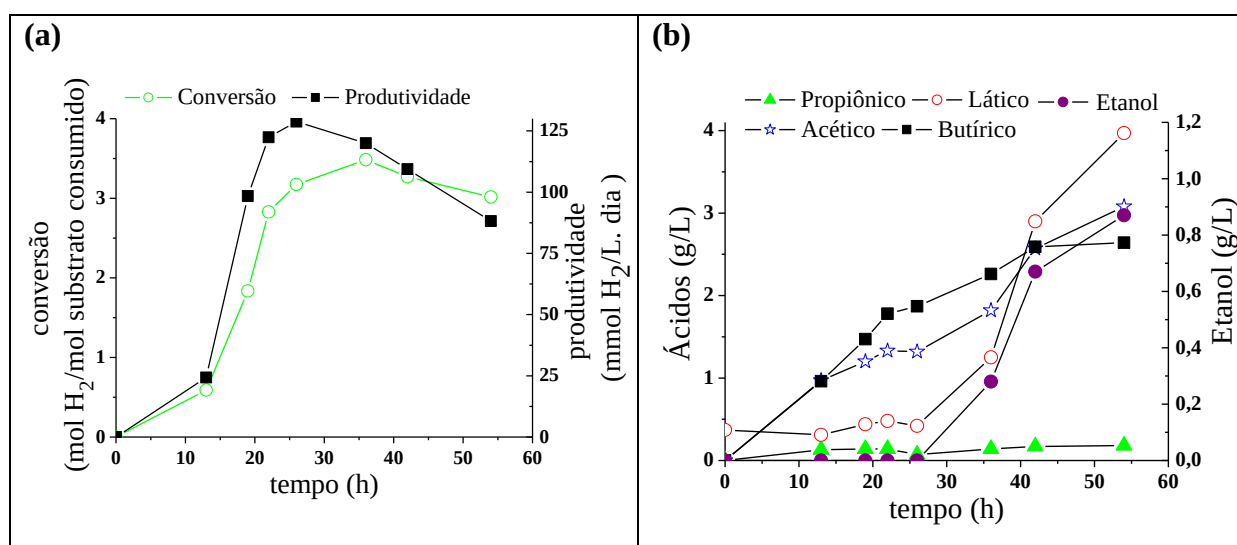


Figura 5.19 – Produtividade, conversão (a) e metabólitos (b) obtidos na fermentação a 30 °C utilizando como inóculo bactérias tratadas a 93 °C por 15 min.

A Figura 5.19 mostrou que, para a fermentação conduzida a temperatura de 30 °C com o inóculo tratado termicamente a 93 °C, ocorreu uma produção significativa de biohidrogênio, próxima dos valores obtidos para a fermentação sem controle do pH. Essa fermentação, comparada com a realizada sem tratamento (Figura 5.12), mostra que a produção de hidrogênio ocorre em menor tempo com o ponto máximo em 25 h sendo que sem controle do pH foi em 43 h e a queda no valor de produtividade e da conversão foi mais lenta do que a fermentação anteriormente mencionada (Figura 5.12), mantendo o valor da produtividade e da conversão próximos dos máximos alcançados por mais tempo.

Em relação aos metabólitos, comparando as duas fermentações (Figura 5.12), notou-se que a produção de ácidos acético e butírico na fermentação conduzida com o tratamento térmico a 93 °C por 15 min é sempre crescente, para a fermentação com o inóculo sem tratamento térmico, a produção de ácido butírico começou a aumentar apenas depois de 20 h. Verifica-se também que a produção de etanol para o inóculo sem tratamento térmico é mais

que o dobro aproximadamente 2 g/L. Além disso, a produção de ácido propiônico na fermentação com inóculo tratado termicamente é praticamente nula. A Figura 5.19 mostra que a produção crescente dos ácidos butírico e acético é superior aos outros metabólitos para a maior parte do tempo de fermentação, e conforme citado anteriormente, a rota de produção destes ácidos favorecem a produção de hidrogênio.

Comparando com a literatura, pode-se citar o trabalho de Kan (2013) que estudou o efeito de diversos tipos de pré-tratamentos no inóculo proveniente de uma unidade de tratamento de águas residuárias em relação à capacidade de conversão do substrato em hidrogênio por fermentação escura. Nos seus estudos, o autor utilizou um meio sintético de crescimento contendo glicose como fonte de carbono. Em relação ao tratamento térmico, o autor aplicou um binômio temperatura/tempo de 100 °C/15 min e, posteriormente, conduziu as fermentações a 35°C. O pesquisador observou melhores resultados do tratamento térmico do inóculo quando comparado aos demais tratamentos, que envolviam tratamentos ácido/base. Com o tratamento térmico, o rendimento da fermentação escura foi 5,3 vezes maior quando comparado à fermentação conduzida sem nenhum tipo de tratamento, alcançando um rendimento de 0,9 mmolH₂/mmol de glicose. Os estudos de Kan (2013) apontaram também altas concentrações de ácido acético e etanol no meio reacional, enquanto que a produção de ácido propiônico foi menor. No entanto, diferente do que foi encontrado neste presente trabalho, a produção de ácido butírico foi praticamente nula.

Quando a fermentação com o inóculo tratado a 93°C foi conduzida a 50 e 70 °C, os resultados apontaram comportamentos semelhantes para os ensaios nestas duas temperaturas (Figuras 5.20 e 5.21, respectivamente).

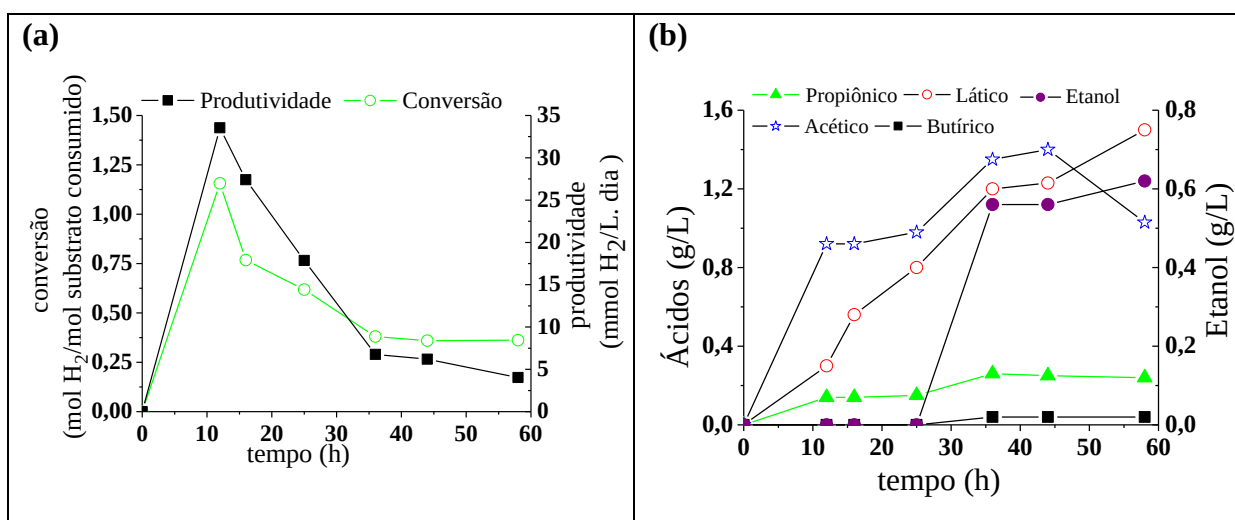


Figura 5.20 - Produtividade, conversão (a) e metabólitos (b) obtidos na fermentação a 50 °C utilizando como inóculo bactérias tratadas a 93 °C por 15 min.

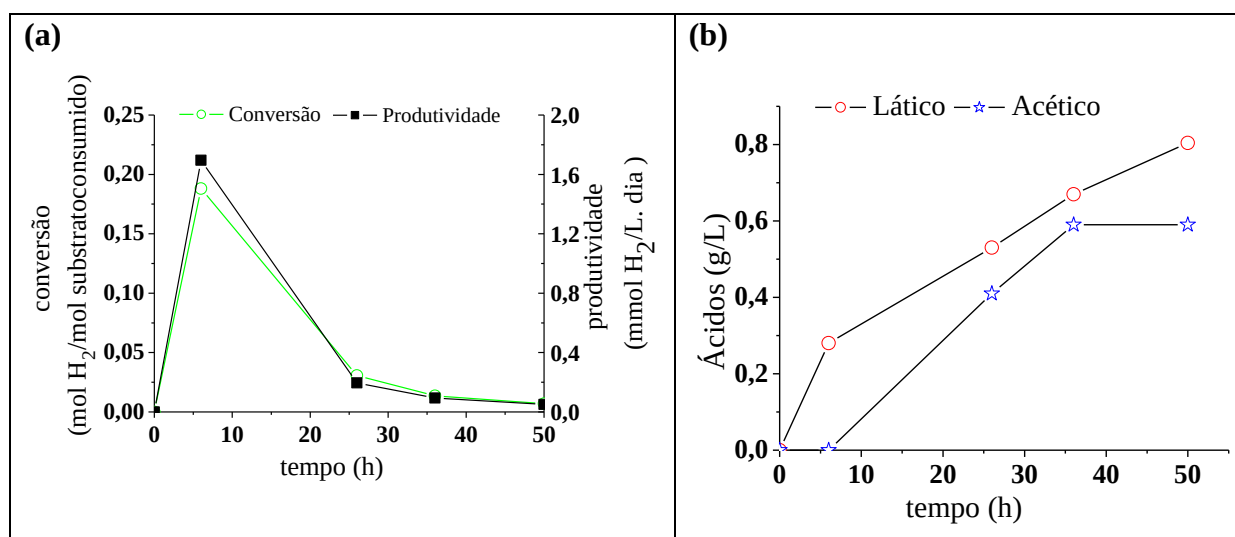


Figura 5.21 – Produtividade, conversão (a) e metabólitos (b) obtidos na fermentação a 70 °C utilizando como inóculo bactérias tratadas a 93 °C por 15 min.

Verificou-se que a produção de hidrogênio diminuiu consideravelmente nestas duas fermentações. Tanto a produtividade de hidrogênio e a conversão do substrato apresentaram valores reduzidos, sendo que, para a temperatura de 70 °C, estas respostas foram ainda menores 1,69 mmolH₂/dia L e 0,18 molH₂/mol de substrato consumido, respectivamente. A 50 °C houve formação de propionato, acetato, lactato, etanol e butirato, porém em concentrações menores quando comparada a fermentação a 30 °C. Já na fermentação a 70 °C, somente acetato e lactato foram detectados durante o processo fermentativo. Esses resultados mostram que em altas temperaturas de fermentação pode ocorrer a desnaturação das enzimas responsáveis pela produção de hidrogênio.

Ainda considerando o estudo de Kan (2013), o autor avaliou o efeito da temperatura de fermentação na produção de hidrogênio para o inóculo tratado a 100 °C/15 min. Analisando o bioprocesso nas temperaturas estudadas de 25, 35, 45 e 55 °C, foi possível observar que a maior produção ocorreu a 35 °C e que, para as temperaturas acima desta, a produção de H₂ caiu drasticamente.

O segundo tratamento térmico aplicado ao inóculo foi a manutenção deste a 50 °C por 15 dias. Após o tratamento, realizaram-se fermentações também nas temperaturas de 30, 50 e 70 °C. Os resultados estão apresentados nas Figuras 5.22, 5.23 e 5.24 respectivamente.

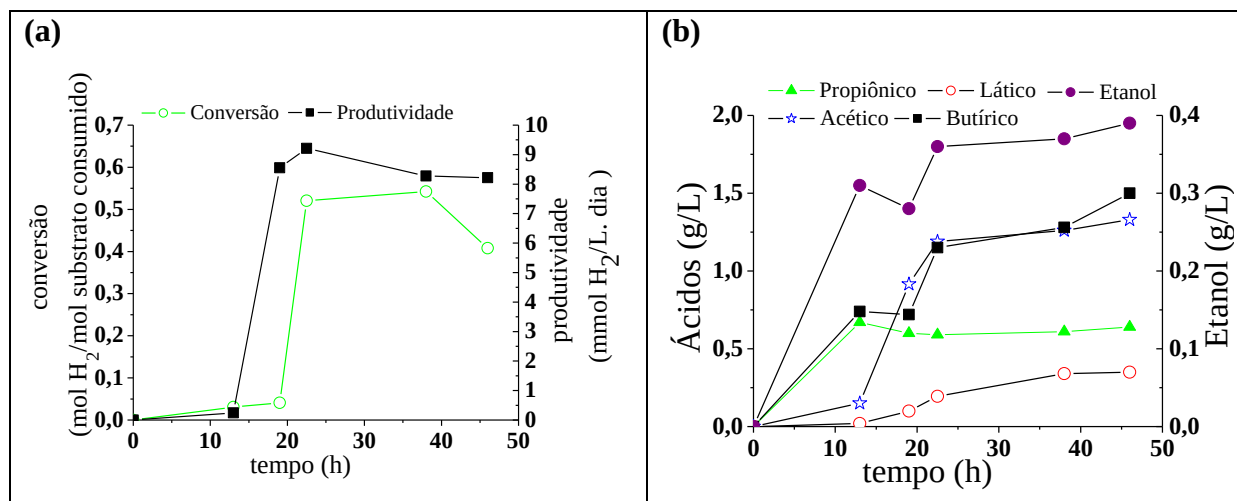


Figura 5.22 – Produtividade, conversão (a) e metabólitos (b) obtidos na fermentação a 30°C utilizando como inóculo bactérias tratadas a 50 °C por 15 dias.

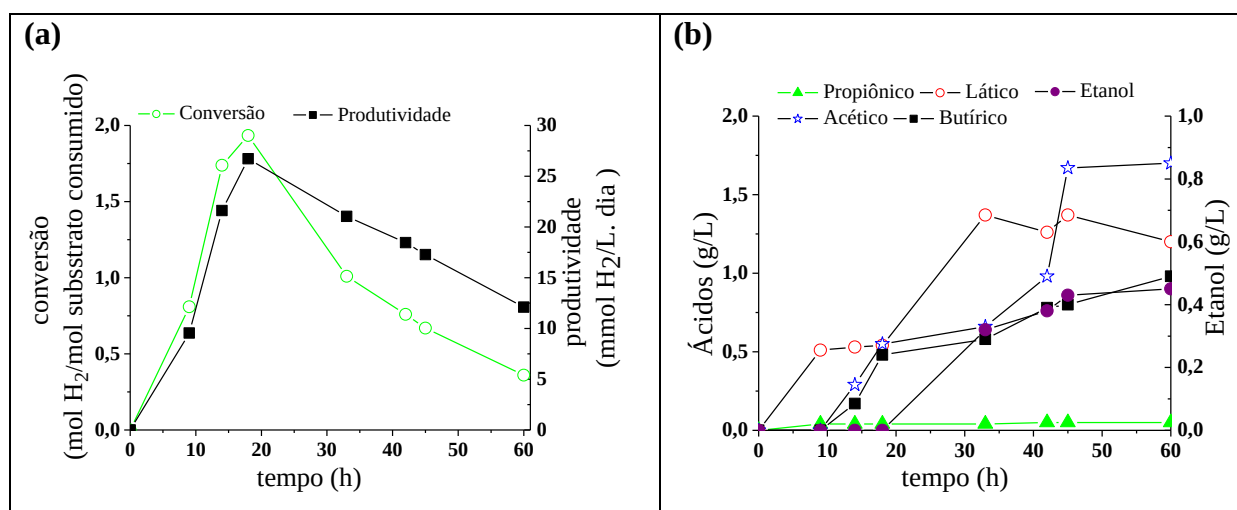


Figura 5.23 – Produtividade, conversão (a) e metabólitos (b) obtidos na fermentação a 50 °C utilizando como inóculo bactérias tratadas a 50 °C por 15 dias.

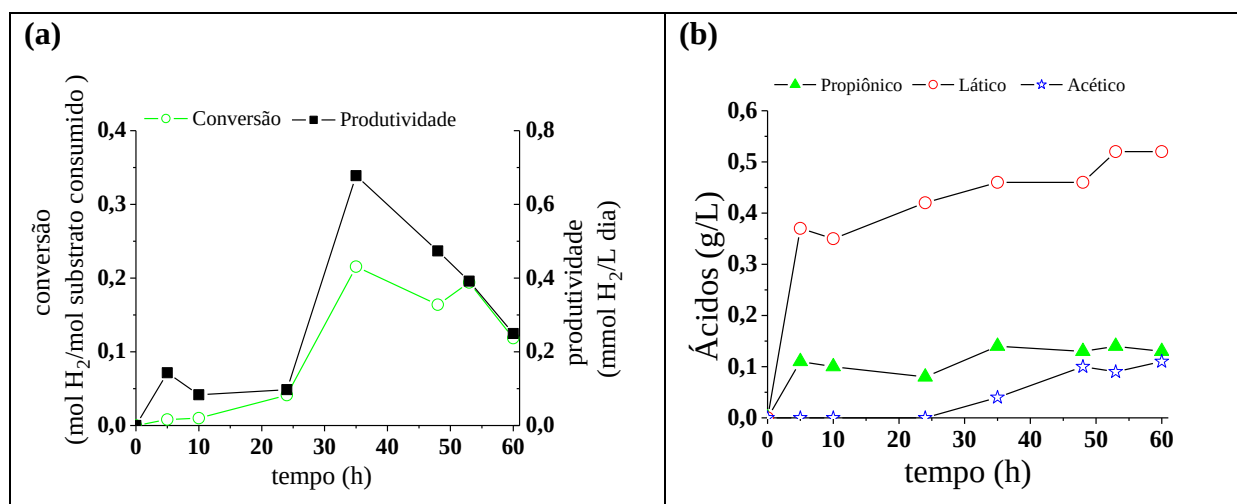


Figura 5.24 – Produtividade, conversão (a) e metabólitos (b) obtidos na fermentação a 70 °C utilizando como inóculo bactérias tratadas a 50 °C por 15 dias.

Pelas Figuras 5.22, 5.23 e 5.24, nota-se que somente para a temperatura de fermentação à 50 °C obteve-se resultados mais favoráveis para produtividade e conversão de hidrogênio. Para as outras duas temperaturas testadas os resultados foram muito baixos em relação às fermentações anteriores.

A manutenção do inóculo a 50 °C por um longo tempo nesse procedimento pode ter ocasionado a morte das bactérias mesofílicas na forma vegetativa. Portanto, a maioria das bactérias que permaneceram ativas foram as termofílicas, justificando assim os baixos valores encontrados para a fermentação a 30 °C.

Já para a fermentação mantida na temperatura de 70 °C os resultados obtidos podem estar ligados à desnaturação da enzima produtora de hidrogênio devido à alta temperatura. Como o inóculo foi mantido por vários dias (15 dias) à temperatura de 50 °C houve adaptação da cultura nesta condição. Este fato pode ser confirmado pela manutenção da produtividade e conversão em concentrações muito baixas nas primeiras horas de fermentação para as temperaturas de 30 e 70 °C. Este comportamento também foi observado para os ácidos acético e butírico. Apesar dos pequenos valores de produtividade e conversão para a temperatura de 30 °C, as fermentações conduzidas nesta temperatura apresentaram comportamento semelhante para as culturas que receberam tratamento térmico a 93 °C e 50 °C, isto é, um rápido aumento destas respostas (produtividade e conversão) e depois de atingir o ponto de máximo, uma queda suave. Este comportamento confirma a hipótese que ocorreu uma seleção de cepas produtoras de hidrogênio, principalmente para a condição de 93 °C (onde os valores destas respostas foram superiores e a produção de hidrogênio atingiu valores máximos em menor tempo de processo) e que a manutenção das cepas por um longo período a temperatura de 50 °C pode ter proporcionado mudanças no processo de seleção das cepas e no comportamento metabólico das mesmas em relação à produção de hidrogênio.

CAPÍTULO 6- CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1 - Conclusões

A partir dos resultados foi possível observar que o permeado do soro de queijo representa uma matéria-prima com potencial para a produção de hidrogênio sendo que:

- Em testes preliminares, verificou-se que a porcentagem de inóculo que proporcionou a maior produção de biogás foi de 1,6 % v/v, com valores de produtividade e conversão de: 24,62 mmolH₂/L dia e 1,65 molH₂/ mol substrato consumido, respectivamente. Ainda nesta fase, observou-se que altas concentrações de lactose (> 60 g/L) no meio fermentativo ocasionou a inibição dos micro-organismos e que a maior produção de H₂ foi obtida quando se utilizou 20 g/L de lactose;
- A execução de uma sequência de três planejamentos de composto central (PCC), mostrou que os melhores resultados de produção de H₂, com uma produtividade de 127,8 mmolH₂/L dia e uma conversão de 4,84 molH₂/mol de substrato consumido, foram atingidos para a seguinte condição: pH inicial de 7,0; temperatura de 30 °C, indicando que no consórcio microbiano há uma predominância de bactérias mesofílicas; e concentrações de sulfato ferroso, de sulfato de amônio e de sulfato de magnésio de 0,6 g/L, 1,5 g/L e 1,28 g/L, respectivamente;
- Durante o estudo da produção de biogás com o tempo foi possível verificar que a concentração de íons Fe²⁺ dissolvido diminuiu nas primeiras 15 h de processo, enquanto a concentração de ferro adsorvidos nas células aumentou, sugerindo a biossorção do metal sobre as paredes das células, uma vez que as bactérias podem afetar o teor de componentes dissolvidos através de reações de adsorção por suas superfícies reativas;
- Os ensaios em escala ampliada mostraram que as fermentações com controle de pH mantido em 5,5 favorecem as rotas metabólicas para a produção de ácido acético e butírico, e portanto, de hidrogênio;

- Em relação ao processo batelada sequencial, foi possível manter a produção de H_2 por um período maior, com até 84 h de fermentação, sendo que no processo em batelada a produção caiu após 50 h de processo. Esse resultado foi atingido quando 466 mL do volume reacional foi retirado do reator a cada 24 h de fermentação nas primeiras 48 h e depois a cada 12 h;
- Com respeito ao efeito do pré-tratamento térmico do inóculo a ser usado posteriormente na fermentação, o mais eficiente foi o choque térmico de 93 °C por 15 min, mantendo a temperatura de fermentação a 30 °C. Sob estas condições, a produção de hidrogênio foi mais rápida alcançando o valor máximo em 25 h de processo, enquanto que nos ensaios realizados sem tratamento do inóculo, a produção máxima foi atingida em 43 h. Além disso, comportamentos parecidos foram verificados nas fermentações conduzidas a 30 °C com os inóculos tratados a 93 °C e 50 °C;

Os resultados apresentados mostram que é possível obter hidrogênio através da fermentação do permeado, sendo que o procedimento em que obteve-se resultados satisfatórios alcançando uma produção por mais tempo, foi quando trabalhou-se, nas condições otimizadas, no processo em batelada sequencial.

6.2 - Sugestões para trabalhos futuros

- Testar a produção de hidrogênio em UASB a partir das condições de fermentação determinadas neste trabalho;
- Verificar a influência do enriquecimento do meio com microrganismo previamente selecionado com grande potencial para produção de H_2 (bioaugmentação);
- Investigar a combinação dos processos identificados neste trabalho, ou seja, pré-tratamento térmico com sistema em batelada sequencial e alternância de substratos, sob controle de pH durante o processo de fermentação escura.

CAPÍTULO 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. W. W., MORTENSON, L. E. The Physical and Catalytic Properties of Hydrogenase II of *Clostridium pasteurianum* International Journal of Biology Chemistry, 259, 7045–7055, 1984.

ADAV, S. S.; LEE, D.-J.; WANG, A.; REN, N. Functional consortium for hydrogen production from cellobiose: concentration-to-extinction approach. Bioresource Technology, v. 100, p. 2546 - 2550, 2009.

ADJONU, R.; DORAN, G.; TORLEY, P.; AGBOOLA, S. Whey protein peptides as components of nanoemulsions: A review of emulsifying and biological functionalities. Journal of Food Engineering, v. 122, p. 15 - 27, 2014.

AJANOVIC, A.; HAAS, R. On future prospects and limits of biofuels in Brazil, the US and EU. Applied Energy, v.135, p. 730 - 737, 2014.

AMORIM, E. L. C.; BARROS, A. R.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; SILVA, E. L. Anaerobic fluidized bed reactor with expanded clay as support for hydrogen production through dark fermentation of glucose. International Journal of Hydrogen Energy, v. 34, p. 783 - 790, 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.; KAPDAN, I. K. Microbial culture selection for bio-hydrogen production from waste ground wheat by dark fermentation. International Journal of Hydrogen Energy, v. 35, p. 2195 - 2200, 2009.

ATRA, R.; VATAI, G., BEKASSY-MOLNAR, E., BALINT, A. Investigation of ultra- and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. Journal of Food Engineering, v.67, p. 325 - 332, 2005.

AVCIOGLU, S. G.; OZGURA, E.; EROGLUA, I.; YUCELB, M.; GUNDUZZ, 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.

AZBAR, N.; DOKGOZ, F. T. C. The effect of dilution and l-malic acid addition on bio-hydrogen production with *Rhodospseudomonas palustris* from effluent of an acidogenic anaerobic reactor. International Journal of Hydrogen Energy, v. 35, p. 5028 - 5033, 2010.

AZBAR, N.; DOKGOZ, F. T. C.; PEKER, Z. Optimization of Basal Medium for Fermentative Hydrogen Production from Cheese Whey Wastewater. International Journal Green Energy, v. 6, p. 371–380, 2009.

AZWAR, M. Y.; HUSSAIN, M. A.; ABDUL-WAHAB, A. K. Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 31, p. 158-173, 2014.

BAO, M.; SU, H.; TAN, T. Biohydrogen Production by Dark Fermentation of Starch Using Mixed Bacterial Cultures of *Bacillus sp* and *Brevumdimonas sp*. *Energy Fuels*, v. 26, p. 5872–5878, 2012.

BELOKOPYTOV, B. F.; LAURINAVICHIOUS, K. S.; LAURINAVICHENE, T. V.; GHIRARDI, M. L.; SEIBERT, M.; TSYGANKOV, A. A. Towards the integration of dark- and photo-fermentative waste treatment. 2. Optimization of starch-dependent fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 3324–3332, 2009.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J.S. *Statistic for experiments. An introduction to design, data analysis and model building*. New York; Wiley, 1978.

BRASIL, Lei nº 11097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. Brasília, DF, 13 de jan. de 2005; disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm>. Acesso em: 20 de outubro 2014.

BRASILAGRO; disponível em <http://www.brasilagro.com.br/conteudo/sapporo-e-petrobras-vao-extrair-hidrogenio-de-biomassa.html#.VT40PPD6gwA>. Acesso em: 25 de abril 2015.

CALLI, B.; SCHOENMAEKERS, K.; VANBROEKHOVEN, K.; DIELS, L. Dark fermentative H₂ production from xylose and lactose-Effects of on-line pH control. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 522–530, 2008.

CASTELLÓ, E.; GARCÍA y SANTOS, C.; IGLESIAS, T.; PAOLINO, G.; WENZEL, J., BORZACCONIA, L.; ETCHEBEHERE, C. Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 5674-5682, 2009.

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.

CHÂTELLIER, X.; FORTIN, D. Adsorption of ferrous ions onto *Bacillus subtilis* cells. *Chemical Geology*, v. 212, p. 209–228, 2004.

CHEN, S. D.; LO, Y. C.; LEE, K. S.; HUANG, T. I. Sequencing batch reactor enhances bacterial hydrolysis of starch promoting continuous bio-hydrogen production from starch feedstock. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 8549–8557, 2009.

CHEN, X.; SUN Y.; XIU, Z.; LI,X.; ZHANG D. Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 31, p. 539-549, 2006.

CHOI, J.; AHN, Y. Characteristics of biohydrogen fermentation from various substrates. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 39, p. 3152-3159, 2014.

CHONG, M. L.; RAHMAN, N. A.; YEE, P. L.; AZIZ, S. A.; RAHIM, R. A.; SHIRAI, Y.; Hassan, M. A. Effects of pH, glucose and iron sulfate concentration on the yield of biohydrogen by *Clostridium butyricum* EB6. International Journal of Hydrogen Energy, v.34, p. 8859–8865, 2009a.

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.

CHU, C. F.; Li, Y. Y.; XU, K. Q.; EBIE, Y.; INAMORI, Y.; KONG, H. N. A pH-and temperature-phased two-stage process for hydrogen and methane production from food waste. International Journal of Hydrogen Energy, v.33, p. 4739 - 4746, 2008.

CHU, C.-Y.; WU, S.-Y.; HSIEH, P.-C.; LIN, C.-Y. Biohydrogen production from immobilized cells and suspended sludge systems with condensed molasses fermentation solubles. International Journal of Hydrogen Energy, v.36, p. 14078-14085, 2011.

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.

CUARTAS-URIBE, B.; ALCAINA-MIRANDA, M. I.; SORIANO-COSTA, E.; MENDOZA-ROCA, J. A.; IBORRA-CLAR, M. I.; LORA-GARCÍA, J. A study of the separation of lactose from whey ultrafiltration permeate using nanofiltration. Desalination, v. 241, p. 244 - 255, 2009.

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

DAS, D.; KHANNA, N.; VEZIROĞLU, T. N. Recent developments in biological hydrogen production processes. Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly, v.14, p. 57-67, 2008.

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.

DAVILA-VAZQUEZ, G.; COTA-NAVARRO, C. B.; ROSALES-COLUNGA, L. M.; LEÓN-RODRÍGUEZ, A.; RAZO-FLORES, E. Continuous biohydrogen production using cheese whey: improving the hydrogen production rate. International Journal of hydrogen energy, v. 34, p. 4296 - 4304, 2009.

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.

DOI, T.; MATSUMOTO, H.; ABE, J.; MORITA, S. Feasibility study on the application of rhizosphere microflora of rice for the biohydrogen production from wasted bread. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, 1735-1743, 2009.

DONG, L.; ZHENHONG, Y.; YONGMING, S.; XIAOYING, K.; YU, Z. Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 812–820, 2009.

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.

FAN, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, S.; HOU, H.; REN, B. Efficient conversion of wheat straw wastes into biohydrogen gas by cow dung compost. *Biosource Technology*, v. 97, p. 500-505, 2006.

FANG, H. H. P.; LI, C.; ZHANG, T. Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 31, p. 683 - 692, 2006.

FERCHICHI, M.; CRABBE, E.; GIL, G. H.; HINTZ, W.; ALMADIDY, A. Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey *Journal of Biotechnology*, v.120, p.402–409, 2005.

FOWLE, D. A.; FEIN, J. B. Experimental measurements of the reversibility of metal–bacteria adsorption reactions. *Chemical Geology*, v. 168, p. 27–36, 2000.

GADHE, A.; SONAWANE, S. S.; VARMA, M. N. Evaluation of ultrasonication as a treatment strategy for enhancement of biohydrogen production from complex distillery wastewater and process optimization. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 39, p. 10041-10050, 2014.

GEORGE, H. A.; CHEN, J. S. Acidic Conditions Are Not Obligatory for Onset of Butanol Formation by *Clostridium beijerinckii* (Synonym, *C. butylicum*). *Applied and Environmental Microbiology*, v. 46, p.321–327, 1983.

GHIMIRE, A.; FRUNZO, L.; PIROZZI, F.; TRABLY, E.; ESCUDIE, R.; LENS, P. N. L.; ESPOSITO, G. A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Applied Energy*, v. 144, p. 73–95, 2015.

GHOSH, D.; HALLENBECK, P. C. Fermentative hydrogen yields from different sugars by batch cultures of metabolically engineered *Escherichia coli* DJT135 *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 7979–7982, 2009.

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

GIOANNIS, G.; MUNTONI, A.; POLETTINI, A.; POMI, R. A review of dark fermentative hydrogen production from biodegradable municipal waste fractions. *Waste Management*, v. 33, p. 1345–1361, 2013.

GIRARD, J. M.; ROY, M. L.; HAFSA, M. B.; GAGNON, J.; FAUCHEUX, N.; HEITZ, M.; TREMBLAY, R.; DESCHÊNES, J. S. Mixotrophic cultivation of green microalgae *Scenedesmus obliquus* on cheese whey permeate for biodiesel production. *Algal Research*, v. 5, p. 241 - 248, 2014.

GOMES NETO, E. H. Hidrogênio, Evoluir sem poluir: a era do hidrogênio, das energias renováveis e das células a combustível. *BrasilH2 Fuel Cell Energy*. Curitiba – PR, 2005.

GUO, W. Q.; REN, N. Q.; WANG, X. J.; XIANG, W. S.; DING, J.; YOU, Y.; LIU B. F. Optimization of culture conditions for hydrogen production by *Ethanoligenens harbinense* B49 using response surface methodology. *Bioresource Technology*, v. 100 p. 1192–1196, 2009.

GUO, X. M.; TRABLY, E.; LATRILLE, E.; CARRÈRE, H.; STEYER, J. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 10660-10673, 2010.

HOLLADAY, J. D.; HU, J.; KING, D. L.; WANG, Y. An overview of hydrogen production technologies. *Catalysis Today*, v. 139, p. 244-260, 2009.

HONG, C.; HAIYUN, W. Optimization of volatile fatty acid production with co-substrate of food wastes and dewatered excess sludge using response surface methodology. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 5487 - 5493, 2010.

HWANG, J. H.; CHOI, J. A.; ABOU-SHANAB, R. A. I.; BHATNAGAR, A.; MIN, B.; SONG, H.; KUMAR, E.; CHOI, J.; LEE, E. S.; KIM, Y. J.; UM, S.; LEE, D. S.; JEON, B. H. Effect of pH and sulfate concentration on hydrogen production using anaerobic mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 9702–9710, 2009.

HWANG, M. H.; JANG, N. J.; HYUN, S. H.; KIM, I. S. Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation: the role of pH. *Journal of Biotechnology*, v. 111, p. 297–309, 2004.

INFANTES, D.; CAMPO, A. G.; VILLASEÑOR, J.; FERNÁNDEZ, F. J. Influence of pH, temperature and volatile fatty acids on hydrogen production by acidogenic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 15595–15601, 2011.

IEA. INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. Key World Energy Statistics 2013. Paris: IEA; 2013

KAN, E. Effects of pretreatments of anaerobic sludge and culture conditions on hydrogen productivity in dark anaerobic fermentation. *Renewable Energy*, v. 49, p. 227-231, 2013.

KARGI, F.; EREN, N. S.; OZMIHCI, S. Hydrogen gas production from cheese whey powder (CWP) solution by thermophilic dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 2260 - 2266, 2012.

KHANAL, S. K.; CHEN, W.; LI, L.; SUNG, S. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 29, p. 1123–1131, 2004.

KIM, D. H.; KIM, S. H.; KIM, H. W.; KIM, M. S.; SHIN, H. S. Sewage sludge addition to food waste synergistically enhances hydrogen fermentation performance. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 8501–8506, 2011b.

KIM, D. H.; KIM, S. H.; KIM, K. Y.; SHIN, H. S. Experience of a pilot-scale hydrogen-producing anaerobic sequencing batch reactor (ASBR) treating food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 1590 -94, 2010.

KIM, D. H.; KIM, S. H.; KO, I. B.; Lee, C. Y.; SHIN, H. S. Start-up strategy for continuous fermentative hydrogen production: early switchover from batch to continuous operation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 1532 - 1541, 2008a.

KIM, D. H.; KIM, S. H.; SHIN, H. S. Hydrogen fermentation of food waste without inoculums addition. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 45, p. 181-187, 2009.

KIM, D. H.; LEE, D.Y.; KIM, M. S. Enhanced biohydrogen production from tofu residue by acid/base pretreatment and sewage sludge addition. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 13922 - 13927, 2011a.

KIM, D. H.; WU, J.; JEONG, K. W.; KIM, M. S.; SHIN, H. S. Natural inducement of hydrogen from food waste by temperature control. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p.10666 - 10673, 2011c.

KIM, S. H.; HAN, S. K.; SHIN H. S. Feasibility of biohydrogen production by anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 29, p. 1607- 1616, 2004.

KIM, S. H.; HAN, S. K.; SHIN, H. S. Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16s rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 199 - 20, 2006.

KIM, S. H.; HAN, S. K.; SHIN, H. S. Optimization of continuous hydrogen fermentation of food waste as a function of solid retention time independent of hydraulic retention time. *Process Biochemistry*, v. 43, p. 213 - 218, 2008b.

KOTAY, S. M.; DAS, D. Microbial hydrogen production from sewage sludge bioaugmented with a constructed microbial consortium. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 10653-10659, 2010.

KOTSOPOULOS, T. A.; FOTIDIS, I. A.; TSOLAKIS, N.; MARTZOPOULOS, G. G. Biohydrogen production from pig slurry in a CSTR reactor system with mixed cultures under hyper-thermophilic temperature (70°C). *Biomass and Bioenergy*, v. 33, p. 1168-1174, 2009.

KUROKAWA, T.; TANISHO, S. Effects of formate on fermentative hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. *Marine Biotechnology*, v. 7, p. 112-118, 2005.

LAY, J. J.; FAN, K. S.; CHANG, J.; KU, C. H. Influence of chemical nature of organic wastes on their conversion to hydrogen by heat-shock digested sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 28, p. 1361 - 1367, 2003.

LEE, K. S.; LIN, P. J.; CHANG, J. S. Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 31, p. 465 - 472, 2006.

LEE, Y.W.; CHUNG, J. Bioproduction of hydrogen from food waste by pilot-scale combined hydrogen/methane fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 11746 - 11755, 2010.

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.

LI, D.; CHEN, H. Biological hydrogen production from steam-exploded straw by simultaneous saccharification and fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 32, 1742 -178, 2007.

LI, Q.; LIU, C. Co-culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermosaccharolyticum* for enhancing hydrogen production via thermophilic fermentation of cornstalk waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 10648-10654, 2012.

LIN, C. Y.; LAY, C. H. A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 30, p. 285 - 292, 2005.

LIN, P. Y.; WANG, L. M.; WU, Y. R.; REN, W. J.; HSIAO, C. J.; LI S. L.; CHANG, J. S. Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: metabolic study and mathematical model simulation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 32, p. 1728-1735, 2007.

LIU, H.; WANG, G.; ZHU, D.; PAN, G. Enrichment of the hydrogen-producing microbial community from marine intertidal sludge by different pretreatment methods. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.34, p. 9696–9701, 2009.

LIU, Y.; YU, P. SONG, X.; QU, Y. Hydrogen production from cellulose by co-culture of *Clostridium thermocellum* JN4 and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* GD17. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 2927-2933, 2008.

LU, Y.; ZHAO, H.; ZHANG, C.; LAI, Q.; XING, X. Perturbation of formate pathway for hydrogen production by expressions of formate hydrogen lyase and its transcriptional activator in wild *Enterobacter aerogenes* and its mutants. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 5072-5079, 2009.

LUDOVICE, M.T. Estudo do efeito poluente da vinhaça infiltrada em canal condutor de terra sobre o lençol freático. Dissertação (Mestrado em Eng^a Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

MARKOWSKI, M.; BIAŁOBREZEWSKI, I.; ZIELIŃSKI, M.; DĘBOWSKI, M; KRZEMIENIEWSKI, M. Optimization low-temperature biogas production from biomass by anaerobic digestion. *Renewable Energy*, v. 69, p. 219-225, 2014.

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

MING, L.; YOUCAI, Z.; QIANG, G.; XIAOQING, Q.; DONGJIE, N. Bio-hydrogen production from food waste and sewage sludge in the presence of aged refuse excavated from refuse landfill, *Renewable Energy*, v. 33, p. 2573–2579, 2008.

MME. Ministério de Minas e Energia. Resenha Energética Brasileira – Exercício de 2013. Edição de Junho de 2014: MME; 2014.

MITTAL, A.; DECKER, S. R. Special issue: Application of biotechnology for biofuels: transforming biomass to biofuels. *3 Biotech*, v. 3, p. 341- 343, 2013.

MURATA, K.; WANG, L.; SAITO, M.; INABA, M.; TAKAHARA, I.; MIMURA, N. Hydrogen production from steam reforming of hydrocarbons over alkaline-earth metal-modified Fe- or Ni-based catalysts. *Energy and Fuels*, v. 18, p. 122-126, 2004

NAPOLI, F.; OLIVIERI, G.; RUSSO, M. E.; MARZOCHELLA, A.; SALATINO, P. Continuous lactose fermentation by *Clostridium acetobutylicum*-Assessment of energetics and product yields of the acidogenesis. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 50, p. 165 - 172, 2012.

NAVARRO, R. M.; PEÑA, M. A.; FIERRO, J. L. G. Hydrogen production reactions from carbon feedstocks fossil fuels and biomass. *Chemical Reviews*, v. 107, p. 3952 - 3991, 2007.

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.

NOIKE, T.; TAKABATAKE, H.; MIZUNO, O.; OHBA, M. Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 27, p. 1367 – 1371, 2002.

NTAIKOU, I.; ANTONOPOULOU, G.; LYBERATOS, G. Biohydrogen Production from Biomass and Wastes via Dark Fermentation: A Review. *Waste Biomass Valor*, v. 1, p. 21-39, 2010.

O-THONG, S.; PRASERTSAN P.; BIRKELAND, N. Evaluation of methods for preparing hydrogen-producing seed inocula under thermophilic condition by process performance and microbial community analysis. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 909–918, 2009.

PANDEY, A.; SINHA, P.; KOTAY, S. M.; DAS, D. Isolation and evaluation of a high H₂-producing lab isolate from cow dung. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 7483–7488, 2009.

PRAKASHAM, R. S.; BRAHMAIAH, P.; SATHISH,T.; RAO, K. R. S. S. Fermentative biohydrogen production by mixed anaerobic consortia: Impact of glucose to xylose ratio. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 9354–9361, 2009.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO F.; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, v.110, p. 48 - 68, 2012.

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.

RICHARDS, N. S. P. S. Soro Lácteo: Perspectivas Industriais e Proteção ao Meio Ambiente. *Food Ingredients*, v.3, p. 20-27, 2002.

ROSA, P. R. F; SANTOS, S. C.; SILVA, E. L. Different ratios of carbon sources in the fermentation of cheese whey and glucose as substrates for hydrogen and ethanol production in continuous reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 39 p. 1288 - 1296, 2014.

ROSALES-COLUNGA, L.M., RAZO-FLORES, E., ORDOÑEZ, L.G., ALATRISTE-MONDRAGÓN, F., LEÓNRODRÍGUEZ, A. Hydrogen production by *Escherichia coli* ΔhycA ΔlacI using cheese whey as substrate. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, 491 - 499, 2010

ROSALES-COLUNGA, L. M.; RAZO-FLORES, E.; RODRÍGUEZ, A. L. Fermentation of lactose and its constituent sugars by *Escherichia coli* WDHL: Impact on hydrogen production. *Bioresource Technology*, v. 111, p. 180–184, 2012.

ROSTRP-NIELSEN, T. Manufacture of hydrogen. *Catalysis Today*, v. 106, p. 293–296, 2005.

SÁ, L. R. V. Produção biológica de hidrogênio por bactérias fermentativas utilizando diferentes carboidratos ou glicerina como substrato. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 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.

SALERNO, M. B.; PARK, W.; ZUO, Y. Inhibition of biohydrogen production by ammonia. *Water Research*, v. 40, p. 1167 - 1172, 2006.

SANSONETTI, S.; CURCIO, S.; CALABRÒ, V.; IORIO, G. Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source. *Biomass and Bioenergy*, v. 33, p. 1687–1692, 2009.

SARAPHIROM, P.; REUNGSANG, A. Biological hydrogen production from sweet sorghum syrup by mixed cultures using an anaerobic sequencing batch reactor (ASBR). *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 8765 - 8773, 2011.

SHEN, W.; WANG, Y.; SHI, X.; SHAH, N.; HUGGINS, F.; BOLLINENI, S. SEEHRA, M. HUFFMAN, G. Catalytic nonoxidative dehydrogenation of ethane over Fe–Ni and Ni catalysts supported on Mg(Al)O to produce hydrogen and easily purified carbon nanotubes. *Energy and Fuels*, v. 21, p. 3520-3529, 2007.

SILVA, L. C. Otimização da produção de hidrogênio pela reforma a vapor do metano em reator com membrana laboratorial. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

SINHA, P.; PANDEY, A. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 7460-7478, 2011.

SIRIWONGRUNGSON, V.; ZENY, R. J.; ANGELIDAKI, I. Homoacetogenesis as the alternative pathway for H₂ sink during thermophilic anaerobic degradation of butyrate under suppressed methanogenesis. *Water research*, v. 41, p. 4204-4210, 2011.

SOCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; BON, E. P. S.; MORAES, L. M. P.; ARAÚJO, J. A.; TORRES, F. A.G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4820 - 4825; 2010.

STIGKA. E. K.; PARAVANTIS, J. A.; MIHALAKAKOU, G. Social acceptance of renewable energy sources: A review of contingent valuation applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 32, p. 100 - 106; 2014.

SUELVE, I.; LÁZARO, M. J.; MOLINER, R.; CORBELLA, B. M.; PALACIOS, J. M. Hydrogen production by thermo catalytic decomposition of methane on Ni-based catalysts: influence of operating conditions on catalyst deactivation and carbon characteristics. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 30, p. 1555 - 1567, 2005.

SYDNEY, E. B.; LARROCHE, C.; NOVAK, A. C.; NOUAILLE, R.; SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; LETTI, L. A. J.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. Economic process to produce biohydrogen and volatile fatty acids by a mixed culture using vinasse from sugarcane ethanol industry as nutrient source. *Bioresource Technology*, v. 159, p. 380 - 386, 2014.

TEMUDO, M. F.; KLEEREBEZEM, R.; LOOSDRECHT, M. V. Influence of the pH on (open) mixed culture fermentation of glucose: a chemostat study. *Biotechnology Bioengineering*, v. 98, p. 69 - 79, 2007.

VALDEZ-VAZQUEZ, I.; RIOSLEAL, E.; ESPARZAGARCIA, F.; CECCHI, F.; POGGIVARALDO, H. Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: mesophilic versus thermophilic regime. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 30, p. 1383–1391, 2005.

VAN-GINKEL, S. W.; OH, S. E.; LOGAN, B. E. Biohydrogen gas production from foodprocessing and domestic wastewaters. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 30, p. 1535 - 1542, 2005.

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.

VIJAYARAGHAVAN, K.; AHMAD, D. Biohydrogen generation from palm oil mill effluent using anaerobic contact filter. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 31, p. 1284-1291, 2006.

XU, J.-F.; REN, N.-Q.; WANG, A.-J.; QIU, J.; ZHAO, Q.-L.; FENG, Y.-J.; LIU, B.-F. Cell growth and hydrogen production on the mixture of xylose and glucose using a novel strain of *Clostridium* sp. HR-1 isolated from cow dung compost. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.35, p. 13467-13474, 2010.

WANG, A.; REN, N.; SHI, Y.; LEE, D. Bioaugmented hydrogen production from microcrystalline cellulose using co-culture-*Clostridium acetobutylicum* X₉ and *Ethanoigenens harbinense* B₄₉. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 912 - 917, 2008.

WANG, B.; WAN, W.; WANG, J. Effect of ammonia concentration on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 1211 - 1213, 2009.

WANG, J.; WAN, W. Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 5392 - 5397, 2008a.

WANG, J.; WAN, W. Effect of Fe²⁺ concentration on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *Int. J. Hydrogen Energy*, v. 33, p. 1215-20, 2008b.

WANG, X. J.; REN, N. Q.; XIANG, W. S.; GUO, W. Q. Influence of gaseous end-products inhibition and nutrient limitations on the growth and hydrogen production by hydrogen-producing fermentative bacterial B49. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 32, p. 748 - 754, 2007.

WANG, X.; ZHAO, Y. A bench scale study of fermentative hydrogen and methane production from food waste in integrated two-stage process. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 245–254, 2009.

WANG, W.; XIE, L.; LUO, G.; ZHOU, Q. Enhanced fermentative hydrogen production from cassava stillage by co-digestion: The effects of different co-substrates. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, 6980-6988, 2013.

WANG, Y. H.; LI, S. L.; CHEN, I. C.; TSENG, I. C.; CHENG, S.S. A study of the process control and hydrolytic characteristics in a thermophilic hydrogen fermentor fed with starch-rich kitchen waste by using molecular-biological methods and amylase assay. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 13004 - 13012, 2010.

WONG, Y. M.; WU, T. Y.; JUANJ. C. A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 34, 471-482, 2014.

YANG, H.; SHEN, J. Effect of ferrous iron concentration on anaerobic bio-hydrogen production from soluble starch. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.31, p. 2137 - 2146, 2006.

YANG, P.; ZHANG, R.; MCGARVEY, J. A.; BENEMANN, J. R. Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 32, p.4761 - 4771, 2007.

YASIN, N. H. M.; MUMTAZ, T.; HASSAN, M. A.; RAHMAN, N. A. Food waste and food processing waste for biohydrogen production: A review. *Journal of Environmental Management*, v. 130, p. 375 - 385, 2013.

YE, N. F.; LU, F.; SHAO, L. M.; GODON, J. J.; HE, P. J. Bacterial community dynamics and product distribution during pH-adjusted fermentation of vegetable wastes. *Journal Applied Microbiology*, v. 103, p. 1055 - 1065, 2007.

YOSSAN, S.; O-THONG , S.; PRASERTSAN, P. Effect of initial pH, nutrients and temperature on hydrogen production from palm oil mill effluent using thermotolerant consortia and corresponding microbial communities. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 13806 - 13814, 2012.

ZHANG, C.; MA, K.; XING, X. H.; Regulation of hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* by external NADH and NAD⁺. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 1226-1232, 2009.

ZHANG, M. L.; FAN, Y.; XING, Y.; PAN, C.; ZHANG, G.; LAY, J. Enhanced biohydrogen production from cornstalk wastes with acidification pretreatment by mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 31, p. 250 - 254, 2007.

ZHANG, Y.; LIU, G.; SHEN, J. Hydrogen production in batch culture of mixed bacteria with sucrose under different iron concentrations *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 30, p. 855–860, 2005.

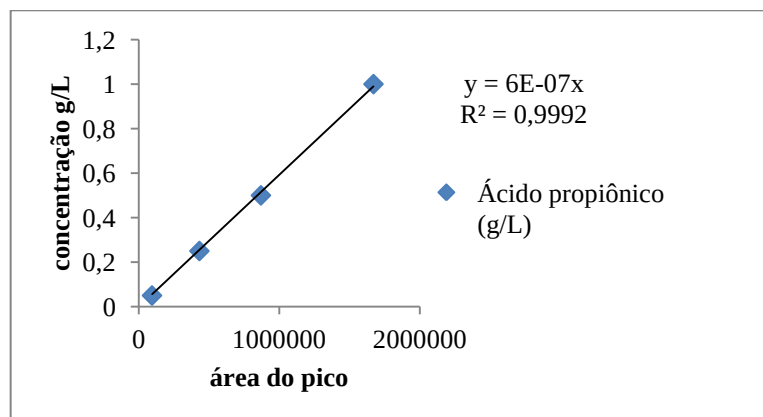
ZHANG, Y.; SHEN, J. Effect of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 31, p. 441 - 446, 2006.

ZHU, H.; PARKER, W.; BASNAR, R.; PRORACKI, A.; FALLETTA, P.; BÉLAND, M., SETO, P. Buffer requirements for enhanced hydrogen production in acidogenic digestion of food wastes. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 5097–5102, 2009.

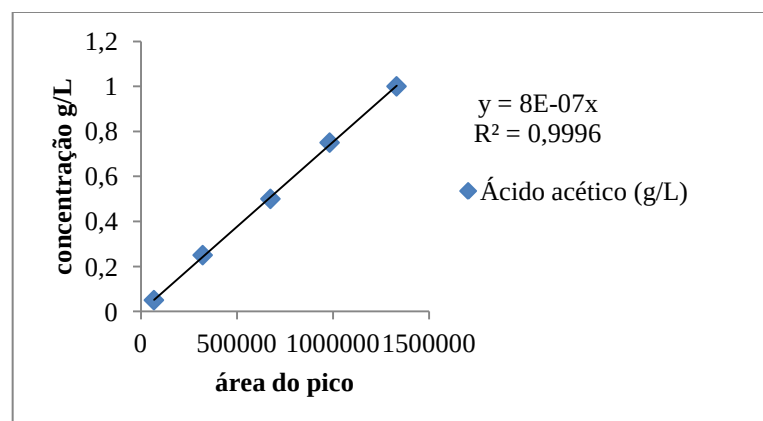
ZONG, W.; YU, R.; ZHANG, P.; FAN, M.; ZHOU, Z. Efficient hydrogen gas production from cassava and food waste by a two-step process of dark fermentation and photo-fermentation. *Biomass and Bioenergy*, v. 33, p. 1458–63, 2009.

CAPÍTULO 8- APÊNDICE A

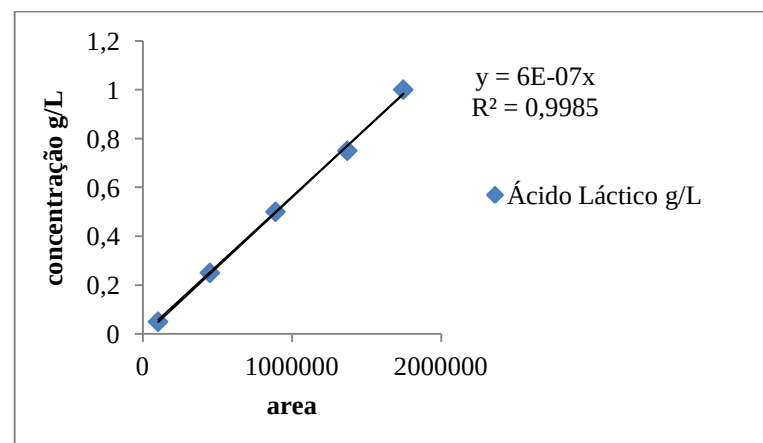
A.1 - Curva de calibração para concentração de ácido propiônico

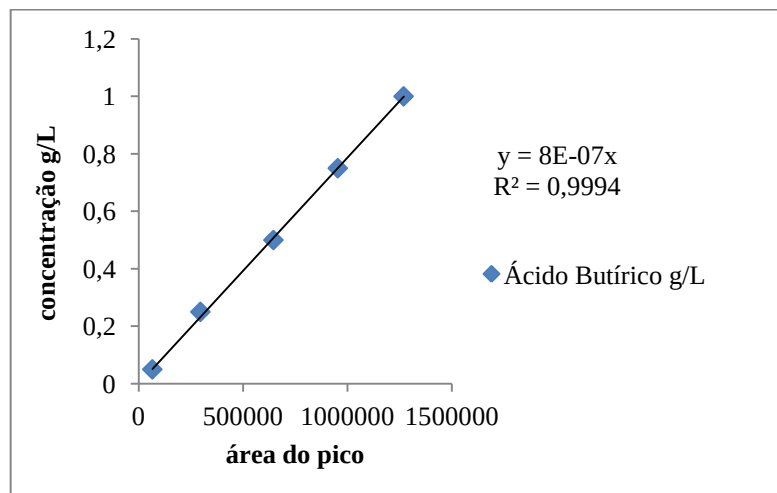
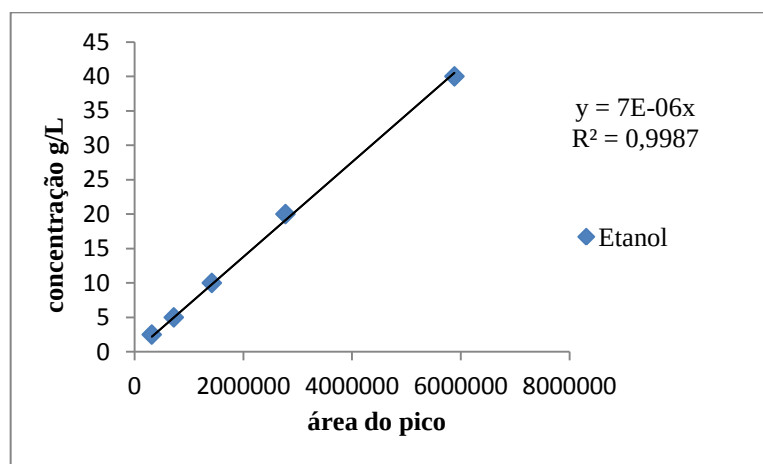
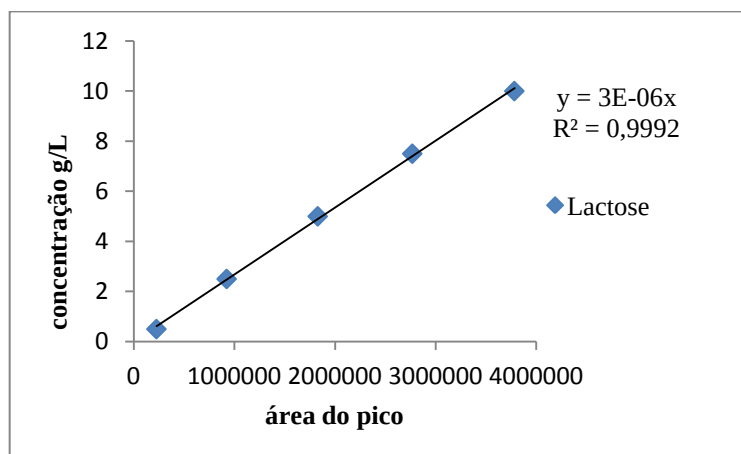


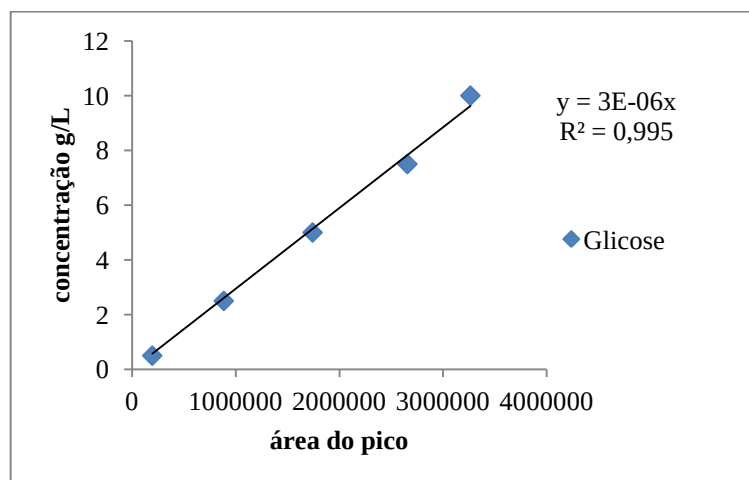
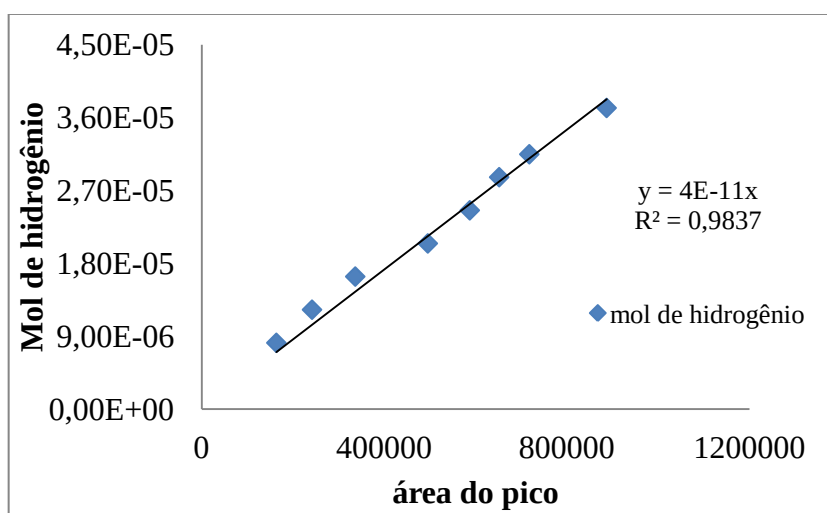
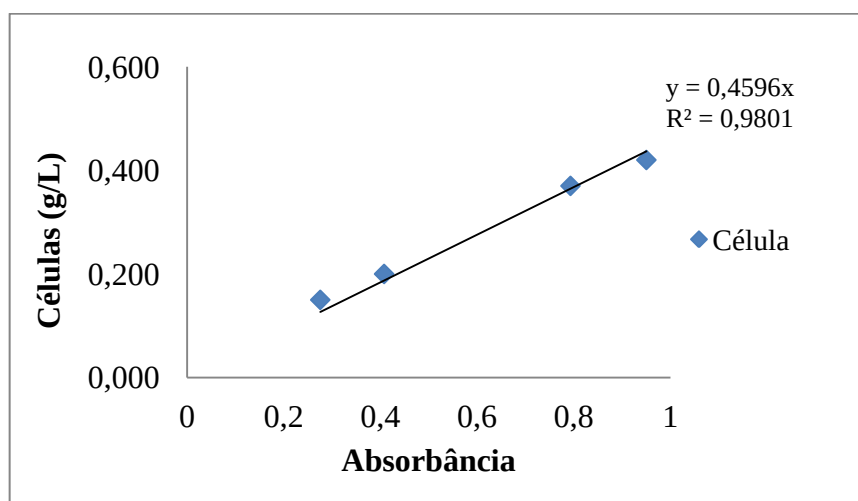
A.2 - Curva de calibração para concentração de ácido acético



A.3 - Curva de calibração para concentração de ácido láctico



A.4 - Curva de calibração para concentração de ácido butírico**A.5** - Curva de calibração para concentração de etanol**A.6** - Curva de calibração para concentração de lactose

A.7 - Curva de calibração para concentração de glicose**A.8** - Curva de calibração para mol de hidrogênio**A.9** - Curva de calibração para concentração de célula

A.10 - Resultados de produção de CO₂ para o procedimento de ampliação de escala

Tempo (h)	Mol de CO ₂
17	3,28E-03
21	3,90E-02
28	9,89E-02
39	8,94E-02
45	2,25E-02
50	1,07E-02
62	5,48E-02

A.11 - Resultados de produção de CO₂ para o procedimento com controle de pH em 6,5

Tempo (h)	Mol de CO ₂
13,5	3,96E-04
16	1,40E-03
18	4,92E-03
21	1,50E-02
26	3,83E-02
37,5	1,37E-01
42	9,24E-02
46	4,96E-02
50	2,65E-02
60	6,79E-02

A.12 - Resultados de produção de CO₂ para o procedimento com controle de pH em 5,5

Tempo (h)	Mol CO ₂
15	1,66E-02
19	6,03E-03
22,5	2,01E+03
27	2,30E+03
39	6,34E+03
43	7,63E+02
48	1,07E+02
61,5	1,38E+03
66	5,27E+02
71	3,07E+03

A.13 - Resultados de produção de CO₂ na fermentação com corte com volume de 233 mL

Tempo (h)	Mol de CO ₂
16	2,15E-02
20,5	3,92E-02
24	3,22E-02
29	3,51E-02
41,5	2,05E-01
48	1,18E-01
60	1,60E-02
69,5	7,22E-02
72	6,56E-02

A.14 - Resultados de produção de CO₂ para a fermentação com corte de 466 mL sendo realizado de a cada 28 h

Tempo (h)	mol de CO ₂
21,5	2,50E-01
28	3,32E-01
33,5	2,40E-02
46	7,84E-02
50,5	1,16E-01
56	1,65E-01
71	8,73E-02
76	9,26E-02
78,5	9,81E-02
87,5	1,17E-01
98,5	3,44E-02
113	7,34E-02
118	7,79E-02
137,5	3,20E-03
142	3,61E-02
147	6,43E-02
158	1,86E-02
162,5	4,18E-02
167	5,18E-02

A.15 - Resultados de produção de CO₂ para a fermentação com corte de 466 mL sendo realizado de a em 24 e 12 h

Tempo (h)	Mol de CO ₂
10	1,81E-03
24	3,77E-02
36,5	4,34E-02
48	6,26E-02
54	1,05E-02
72	2,00E-02
78	6,06E-03
84	1,19E-02
96	8,14E-03
101,5	6,22E-03
108,5	1,04E-02
120,5	9,96E-03
126	8,65E-03
132,5	1,27E-02
144,5	1,67E-02
150	9,71E-03
156,5	1,97E-02
168,5	2,06E-02
174,5	9,42E-03

A.16 - Resultados de produção de CO₂ para a fermentação com reciclo de células

Tempo (h)	Mol de CO ₂
6	2,73E-03
10,5	1,83E-02
24,5	3,56E-02
28	5,51E-03
34	2,01E-02
48	2,24E-02
56	9,34E-03
72	1,37E-02
78	1,74E-02
83	2,68E-02
97	2,78E-02
102	4,10E-02
106,5	5,39E-02
118	4,68E-03
124	1,71E-02
128	5,78E-02
142	3,86E-02
146	0,00E+00

A.17 - Resultados de produção de CO₂ para a fermentação a temperatura de 30 °C para as células tratada termicamente a 93 °C

Tempo (h)	Mol de CO ₂
13	5,02E-04
19	1,52E-02
22	5,37E-03
26	2,83E-02
36	1,42E-02
42	2,25E-02
54	2,65E-02

A.18 - Resultados de produção de CO₂ para a fermentação a temperatura de 50 °C para as células tratada termicamente a 93 °C

Tempo (h)	Mol de CO ₂
12	1,17E-02
16	1,28E-02
25	1,30E-02
36	1,82E-03
44	8,20E-04
58	8,79E-04

A.19 - Resultados de produção de CO₂ para a fermentação a temperatura de 70 °C para as células tratada termicamente a 93 °C

Tempo (h)	Mol de CO ₂
6	2,73E-05
26	1,82E-04
36	2,62E-04
50	3,98E-04

A.20 - Resultados de produção de CO₂ para a fermentação a temperatura de 30 °C para as células tratada termicamente a 50 °C

Tempo (h)	Mol de CO ₂
13	0,00E+00
19	4,69E-04
22,5	4,38E-04
38	5,81E-04
46	9,06E-04

A.21 - Resultados de produção de CO₂ para a fermentação a temperatura de 50 °C para as células tratada termicamente a 50 °C

Tempo (h)	Mol de CO ₂
9	2,69E-04
14	1,39E-03
18	2,83E-03
33	8,13E-03
42	5,52E-03
45	4,68E-03
60	5,36E-03

A.22 - Resultados de produção de CO₂ para a fermentação a temperatura de 70 °C para as células tratada termicamente a 50 °C

Tempo (h)	Mol de CO ₂
5	5,02E-06
10	1,01E-05
24	2,19E-04
35	7,48E-04
48	8,34E-04
53	7,72E-04
60	1,10E-03