UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA INSTITUTO DE QUÍMICA

MARIANA DE OLIVEIRA FABER

APROVEITAMENTO BIOTECNOLÓGICO DA GLICERINA RESIDUAL DO BIODIESEL PARA GERAÇÃO DE HIDROGÊNIO, 1,3-PROPANODIOL E METANO

> Rio de Janeiro 2021

MARIANA DE OLIVEIRA FABER

APROVEITAMENTO BIOTECNOLÓGICO DA GLICERINA RESIDUAL DO BIODIESEL PARA GERAÇÃO DE HIDROGÊNIO, 1,3-PROPANODIOL E METANO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Ciência (Bioquímica).

Orientadora: Viridiana Santana Ferreira-Leitão

Co-orientador: Anderson de Sá Pinheiro

Rio de Janeiro 2021

CIP - Catalogação na Publicação

 de Oliveira Faber, Mariana APROVEITAMENTO BIOTECNOLÓGICO DA GLICERINA RESIDUAL DO BIODIESEL PARA GERAÇÃO DE HIDROGÊNIO, 1,3-PROPANODIOL E METANO / Mariana de Oliveira Faber. -- Rio de Janeiro, 2021. 176 f.
 Orientador: Viridiana Santana Ferreira-Leitão. Coorientador: Anderson de Sá Pinheiro. Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, 2021.
 1. Glicerina. 2. Hidrogênio. 3. Metano. 4. 1,3 propanodiol. 5. digestão anaeróbia. I. Santana Ferreira-Leitão, Viridiana, orient. III. de Sá Pinheiro, Anderson, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

MARIANA DE OLIVEIRA FABER

APROVEITAMENTO BIOTECNOLÓGICO DA GLICERINA RESIDUAL DO BIODIESEL PARA GERAÇÃO DE HIDROGÊNIO, 1,3-PROPANODIOL E METANO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Ciência (Bioquímica).

Aprovada em 25 de março de 2021.

Viridiana Santana Ferreira-Leitão, D.Sc., INT

Anderson de Sá Pinheiro, D.Sc., UFRJ

Luciana Pizzatti Barboza, D.Sc., UFRJ

Alex Enrich Prast, D.Sc., Linköping University

Bruna Soares Fernandes, D.Sc., UFPE

Marcelo Zaiat, D.Sc., USP

Aos meus pais, Márcia e Alexandre, que me proporcionaram a melhor educação possível.

Aos meus professores de toda a vida, por contribuírem ativamente para a minha formação.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Viridiana por tantos ensinamentos sobre ciência, vida, política, por insistir no meu doutoramento e por depositar tanta confiança no meu trabalho; por tantos momentos de descontração, conversas e risadas; e por despertar em mim uma profunda admiração.

À Dra. Ayla pelas discussões em alto nível, pela confiança depositada no meu trabalho e pela parceria ao longo dos últimos anos.

À minha família, que é minha sustentação, meu exemplo e meu conforto. Em especial aos meus pais, Márcia e Alexandre, que sempre apoiaram as minhas escolhas e investiram no meu futuro; e às minhas irmãs, Carolina e Júlia, que são minha parte mais doce, minhas companheiras e minhas inspirações.

Ao meu marido, Tássio, pelo companheirismo, amor e paciência sem limites, principalmente durante o período de escrita da tese combinado com pandemia!

Aos professores Nei Pereira Júnior e Verônica Ferreira pelos ensinamentos no início da minha trajetória acadêmica.

Às meninas superpoderosas que me inspiram, me ensinam, me surpreendem e crescem mais e mais a cada dia: Carol Lázaro, Ingrid Miguez, Marina Tomasini, Raquel Lopes e Stella Buback, pelo carinho, a amizade, a parceria, o aprendizado e tantos momentos especiais. À Roberta Espinheira por ser meu braço direito e meu ombro amigo; por compartilhar alegrias, tristezas e dúvidas; pelos momentos de descontração, samba e karaokê; por ler meus textos e por discutir ciência, política e futebol.

Aos meus estagiários, Vinícius Soares, David Barbosa, Ricardo de Santana e Pérola Meireles, que muitas vezes foram minhas mãos e meus olhos, que me ensinaram a ensinar e a ter paciência. Tenho muito carinho por vocês e fico muito feliz por ter contribuído para a formação de vocês.

A todos os colegas de LABIC, pelo ambiente saudável e produtivo, pelo respeito mútuo e pela troca de conhecimentos: Carinne Borges, Verônica Lopes, Roberta Fernandes, Gabriel Martins, Carolina Reis, Ronaldo Rodrigues, Mariana Mattos, Nadinne Medeiros, Daniel Fasheun, Ramon, Rayssa, PV, Bia Rusenhack, Morgana e tantos outros... Aline Ramalho e Léo Belo, que se tornaram meus grandes amigos para a vida, por tanto aprendizado, carinho e momentos especiais; Lívian Sá, por me auxiliar nos primeiros passos do projeto; Alessandro Garritano pelos *brainstorms*, pelas trocas de aprendizados e pela parceria; Javier Molina e Bruno César pelas conversas, os passeios e os momentos de descontração; Pedro Martins pelo suporte nos últimos experimentos e especialmente Álvaro Monteiro pela ajuda incrível, eficiente e cuidadosa no momento de flexibilização das atividades / escrita da tese.

Aos meus amigos da vida, que sempre torceram por mim, me apoiaram, e me ajudaram a crescer como profissional e como pessoa. Que estão sempre dispostos a ouvir, conversar, que se importam, se preocupam e se fazem presente, cada um da sua forma: Roberta Peixoto, Dico Lopes, Gisele Huguet, Aline Siqueira, Renata Nigri, Jardel Domingos, Camila Gama, Carolina Barcelos, Johanna Arias, Lautaro Vargas, Paulo Iiboshi, Daiana Wischral, Fernando Meireles, Mariana Mello, Vanessa Rocha e Ronaldo Fonseca.

Educar-se é um ato político.

RESUMO

FABER, Mariana de Oliveira. APROVEITAMENTO BIOTECNOLÓGICO DA GLICERINA RESIDUAL DO BIODIESEL PARA GERAÇÃO DE HIDROGÊNIO, 1,3-PROPANODIOL E METANO. Rio de Janeiro, 2021. Tese (Doutorado em Bioquímica). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2021.

Glicerina é o subproduto da produção de biodiesel, correspondente a 10% da massa total da reação de transesterificação. Atualmente, a maior parte a glicerina gerada no Brasil é exportada, porém este produto de baixo valor agregado pode ser utilizado internamente, promovendo a valorização da cadeia produtora de biodiesel como um todo. Por conter altos teores de glicerol em sua composição, a glicerina pode ser processada de diversas formas, inclusive em processos biotecnológicos. Nesta tese, um lote de glicerina proveniente de uma planta industrial de biodiesel foi utilizada como matéria-prima para produção de hidrogênio (H_2) e 1,3-propanodiol (1,3-PDO) por processo fermentativo, e o efluente gerado neste processo foi utilizado como matéria-prima para a produção de metano (CH₄) por digestão anaeróbia. Ambos os processo utilizaram lodo anaeróbio de estação de tratamento de esgoto como inóculo. Primeiramente, selecionou-se um lote de lodo anaeróbio, em função do ponto de coleta na ETE, mais propício para a produção de H₂, bem como o tipo de pré-tratamento deste lodo que promovesse maior produção de H₂ e apresentasse estabilidade do inóculo. Realizou-se então a produção de 1,3-PDO em meio contendo suplementos para a via redutora do metabolismo de glicerol, obtendo-se 3,47 g/L a partir de 10 g/L de glicerol, o que corresponde à eficiência de 61%. Em seguida foram realizadas alterações sequenciais no processo fermentativo para promover o aumento da produção de H₂: aumento na concentração de substrato, volume de headspace e otimização dos componentes do meio, a saber; partindose de 1 g/L de glicerol, em frasco de penicilina com 10% de *headspace* e meio fermentativo não otimizado e alterando-se para 7 g/L de glicerol, em reator manométrico com ajustes no headspace passando para 50% comparativamente em meio composto por Tween 80, ureia e fosfatos, foi possível aumentar o volume específico de H₂ gerado em 10 vezes e a produtividade volumétrica em 17 vezes. O efluente obtido neste processo foi empregado como matéria-prima para a metanogênese, sequencialmente, levando à produção de 822 mL/L de CH₄ em 39 dias. A digestão anaeróbia do efluente da produção de H₂ conduzida em meio não otimizado levou à produção de 857 mL/L em 28 dias, correspondendo à eficiência de 86%. O processo sequencial de produção de H₂ e CH₄ utilizando meio composto apenas por glicerina, lodo anaeróbio e água resultou na produtividade energética de 142 kJ/(d.g_{glicerol}) e remoção de 95% da DQO do efluente em relação à alimentação. A digestão anaeróbia direta da glicerina resultou em uma produção de CH₄ inferior à obtida em processo sequencial, a partir da mesma concentração de glicerol, indicando que a digestão anaeróbia em duas etapas é o processo mais indicado para valorização energética da glicerina. Portanto, nesta tese foram produzidos H₂, 1,3-PDO e CH₄ a partir de glicerina utilizando lodo anaeróbio de ETE como inóculo em processo simples e efetivo. Para produção de H₂ e 1,3-PDO em único reator batelada foi necessário suplementar o meio fermentativo com nitrogênio, fósforo e Tween 80, porém para produção sequencial de H₂ e CH₄ a suplementação dos meios não se fez necessária.

Palavras-chave: glicerina, hidrogênio, metano, 1,3-propanodiol, fermentação, digestão anaeróbia.

ABSTRACT

FABER, Mariana de Oliveira. BIOTECHNOLOGICAL USE OF BIODIESEL RESIDUAL GLYCERIN FOR THE GENERATION OF HYDROGEN, 1,3-PROPANEDIOL, AND METHANE. Rio de Janeiro, 2021. Thesis (PhD in Biochemistry). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2021.

Glycerin is the by-product of biodiesel production, corresponding to 10% of the total mass of the transesterification reaction. Currently, most of the glycerin generated in Brazil is exported, however, this low value-added product can be exploited internally, promoting the valorization of the whole biodiesel production chain. Since it contains high levels of glycerol in its composition, glycerin can be processed in several ways, including biotechnological processes. In this thesis, glycerin from a biodiesel industrial plant was used as a raw material for the production of hydrogen (H₂) and 1,3-propanediol (1,3-PDO) by dark fermentation, and the effluent generated in this process was used as raw material for the production of methane (CH₄) by anaerobic digestion. Both processes used anaerobic sludge from a sewage treatment plant as an inoculum. First of all, the anaerobic sludge, depending on the collect point, most suitable for the production of H₂ was selected, as well as the type of pre-treatment of that sludge that promoted higher H₂ production and inoculum stability. Then, 1,3-PDO was produced using a medium containing supplements for the glycerol metabolism-reductive pathway, obtaining 3.47 g/L from 10 g/L glycerol, which corresponds to the efficiency of 61%. Then, sequential changes were made in the fermentation process to promote an increase in H₂ production, namely; from 1 g/L of glycerol, in a penicillin flask with 10% headspace and non-optimized fermentation medium and changing to 7 g/L of glycerol, in a manometric reactor with 50% headspace and a comparatively medium containing Tween 80, urea and phosphates, it was possible to increase the specific volume of H₂ by 10 times and the volumetric productivity by 17 times. The effluent obtained in this process was used as raw material for methanogenesis, sequentially, leading to the production of 822 mL/L of CH₄ in 39 days. The anaerobic digestion of the effluent from H₂ production carried out in a nonoptimized medium led to the production of 857 mL/L in 28 days, corresponding to an efficiency of 86%. The sequential process of producing H₂ and CH₄ using a medium composed only of glycerin, anaerobic sludge, and water resulted in an energetic productivity of 142 kJ/(d.g_{glycerol}) and 95% COD removal of the effluent comparing to the feed. Direct anaerobic digestion of glycerin resulted in lower CH₄ production than that obtained in a sequential process, from the same concentration of glycerol, indicating that anaerobic digestion in two stages is the most suitable process for the energetic valorization of glycerin. Thus, in this thesis H_2 , 1,3-PDO and CH_4 were produced from glycerin using anaerobic sludge as an inoculum through a simple and effective process. Aming at H₂ and 1,3-PDO in a single batch reactor it was necessary to supplement the fermentative medium with nitrogen, phosphorus, and Tween 80, although to produce H₂ and CH₄, sequentially, the medium supplementation was not necessary.

Keywords: glycerin, hydrogen, methane, 1,3-propanediol, dark fermentation, anaerobic digestion.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. PODER CALORÍFICO SUPERIOR DE DIVERSOS COMBUSTÍVEIS E BIOCOMBUSTÍVEIS. EM
DESTAQUE O H_2 OUE POSSUL PODER CALOPÍELO CEPCA DE 3 VEZES MAJOR OUE OS
COMPLICTIVELS TRADICIONIALS OPHINDOS DE EONTES EÓSSELS FONTE (WONG: WI) IIIAN
2014)
EICUDA 2 MATÉRIAS DRIMAS E TECNOLOCIAS RARA PRODUÇÃO DE HIDROCÊNIO. NA EICURA O
FIGURA 2. MATERIAS-PRIMAS E TECNOLOGIAS PARA PRODUÇAO DE HIDROGENIO. INA FIGURA, O TEDMO CARDON CARTURE STORACE (CCS) É AMPLAMENTE LITULIZADO RADA DESIGNAD
TERMO CARBON CAPTURE STORAGE (CCS) E AMPLAMENTE UTILIZADO PARA DESIGNAR
SISTEMAS DE CAPTURA E ARMAZENAMENTO DE CO $_2$ EM ROCHAS. FONTE: ELABORAÇÃO
PROPRIA A PARTIR DAS REFERENCIAS: HOSSEINI & WAHID, 2016; NIKOLAIDIS &
POULLIKKAS, 2017; THE ROYAL SOCIETY, 2018
FIGURA 3. ROTAS DE PRODUÇÃO DE 1,3-PDO A PARTIR DE ÓXIDO DE ETILENO, ACROLEÍNA OU
GLICEROL. EM VERMELHO ESTÁ REPRESENTADA A ROTA QUÍMICA UTILIZADA PELA SHELL,
EM AZUL A ROTA QUÍMICA DA DEGUSSA-DUPONT, EM VERDE A VIA BIOTECNOLÓGICA E EM
ROXO A CATÁLISE DE GLICEROL (LEE ET AL., 2015B; SILVA ET AL., 2014). CABE
DESTACAR QUE OS PROCESSOS QUÍMICOS SÃO REALIZADOS EM ALTAS PRESSÕES E
TEMPERATURAS, CONSTITUINDO PROCESSOS DE ELEVADA DEMANDA ENERGÉTICA
FIGURA 4. CONVERSÃO MICROBIOLÓGICA DE GLICOSE A GLICEROL
FIGURA 5. PRINCIPAIS MATÉRIAS-PRIMAS, PROCESSAMENTO E APLICAÇÕES DE BIOGÁS E
BIOMETANO NO BRASIL. ADAPTADO DE (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BIOGÁS,
[S.D.]). OUTRAS MATÉRIAS-PRIMAS ORGÂNICAS TAMBÉM PODEM SER UTILIZADAS PARA
GERAÇÃO DE BIOGÁS E BIOMETANO NOS PRÓXIMOS ANOS. O BIOMETANO CERTIFICADO
PELA ANP PODE SER MISTURADO AO GÁS NATURAL, TENDO COMO PRINCIPAL VANTAGEM A
POSSIBILIDADE DE UTILIZAR A ESTRUTURA LOGÍSTICA EXISTENTE
FIGURA 6. PRODUÇÃO BRASILEIRA DE BIODIESEL E GERAÇÃO DE GLICERINA NO PERÍODO DE
2005 A 2019, E MISTURAS DE BIODIESEL AO DIESEL (BX) FACULTATIVAS OU OBRIGATÓRIAS
NESTE PERÍODO, NO BRASIL. ELABORAÇÃO PRÓPRIA COM OS DADOS DE ANP, 2020.
■BIODIESEL (M ³), GLICERINA (M ³), ● ADIÇÃO OBRIGATÓRIA (BX)
FIGURA 7. DIAGRAMA DE BLOCOS DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL VIA TRANSESTERIFICAÇÃO DE
ÓLEOS VEGETAIS
FIGURA 8. EXPORTAÇÃO BRASILEIRA DE GLICEROL BRUTO OU PURIFICADO NO PERÍODO DE 1999
A 2019 (COMEXSTAT, 2020). AS BARRAS INDICAM OS VALORES EM MASSA, ENOUANTO
as linhas indicam os valores negociados em dólar por ouilo (US\$/Kg). Em 2004 o
VALOR NEGOCIADO DE GLICEROL BRUTO FOL US\$7 72/KG \blacksquare GLICEROL PURIFICADO
(MASSA) = GLICEROL BRUTO (MASSA) - GLICEROL PURIFICADO (PRECO) - GLICEROL
RELITO (DECO)
FIGURA 9 GLICEROL COMO "BLOCO DE CONSTRUCÃO" PARA DIVERSOS PRODUTOS 43
FIGURA 10. ETADAS DA DICESTÃO ANAEDÓRIA DE MATÉRIAS ODCÂNICAS DOD LODO ANAEDÓRIO
I IGURA IO. LIAFAS DA DIOESTAO ANAEROBIA DE MATERIAS ORGANICAS FOR LODO ANAEROBIO. A DADTADO DE SÁ-CAMMAROTA- EEDDEIDA I EITÃO S -2014
FIGURA 11 FROMEMA DEDDESENTATIVO DO DEDOCESSO DE ESPODOCÊNESE. EM AMDENTE
I IGURA II. ESQUEINA REFRESENTATIVO DO FROCESSO DE ESPOROUENESE. EM AMBIENTE EAVODÁVEL A CÉLULA SE MANTÉM INTECDA, DODÉM SE ESTE AMBIENTE SE TODNA
FAVORAVEL A CELULA 5E MANTEM INTEGRA, POREM 5E ESTE AMBIENTE 5E TORNA

DESFAVORÁVEL, INICIA-SE O PROCESSO DE ESPOROGÊNESE PARA PROTEÇÃO DAS ORGANELAS VITAIS PARA A CÉLULA. QUANDO O AMBIENTE É NOVAMENTE FAVORÁVEL, A CÉLULA SE REIDRATA VOLTANDO À ATIVIDADE METABÓLICA. ELABORAÇÃO PRÓPRIA. 50 FIGURA 12. VIA DE WOOD-LJUNGDAHL (VIA REDUTORA DA ACETIL CO-A). CFESP: PROTEÍNA DE FERRO-ENXOFRE METILTRANSFERASE; CODH: MONÓXIDO DE CARBONO DESIDROGENASE. ADAPTADO DE: YIKRAZUUL - OWN WORK, CC BY-SA 3.0, HTTPS://COMMONS.WIKIMEDIA.ORG/W/INDEX.PHP?CURID=5622492.....53 FIGURA 13. ROTA METABÓLICA DE GLICEROL EM CLOSTRIDIUM SPP E ENZIMAS ENVOLVIDAS NAS VIAS REDUTORA (EM LARANJA) E OXIDATIVA (EM VERDE), INCLUINDO OS PRINCIPAIS METABÓLITOS COM INTERESSE BIOTECNOLÓGICO. FONTE: ELABORAÇÃO PRÓPRIA A PARTIR DAS REFERÊNCIAS: (DE SÁ ET AL., 2013; JOHNSON; TACONI, 2007; KUBIAK ET AL., 2012; SAINT-AMANS, GIRBAL, ANDRADE, 2001)......56 FIGURA 14. ENZIMAS ENVOLVIDAS NO BALANCO REDOX DO METABOLISMO DE GLICEROL. AS ENZIMAS ENVOLVIDAS NA VIA REDUTORA E OXIDATIVA SÃO: 1: GDHT; 2: PDOR; 3: GDH. O BALANÇO REDOX NAD⁺/NADH É MANTIDO PELAS ENZIMAS PDOR – DA VIA REDUTORA FIGURA 15. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE H₂ E 1,3-PDO EMPREGANDO-SE GLICERINA COMO MATÉRIA-PRIMA E LODO ANAERÓBIO DE ETE COMO FIGURA 16. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE PRODUÇÃO SEQUENCIAL DE H2 E CH4 EMPREGANDO-SE GLICERINA COMO MATÉRIA-PRIMA E LODO ANAERÓBIO DE ETE FIGURA 18. GLICERINA RESIDUAL DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL, FORNECIDA PELA ADM do Brasil (Rondonópolis/MT).64 FIGURA 19. FLUXOGRAMA TÍPICO DE UM SISTEMA DE LODOS ATIVADOS CONVENCIONAL (SPERLING, 2002)(A) E LOCAIS DE COLETA DO LODO ANAERÓBIO DE ETE: ADENSADOR FIGURA 21. PRÉ-TRATAMENTO TÉRMICO DO LODO ANAERÓBIO. UTILIZOU-SE FRASCO FECHADO PARA EVITAR A PERDA DE ÁGUA, TERMÔMETRO ACOPLADO À TAMPA PARA CONTROLE DA TEMPERATURA, BANHO-MARIA E AGITAÇÃO MAGNÉTICA PARA GARANTIR HOMOGENEIDADE FIGURA 22. FRASCO DE PENICILINA UTILIZADO NOS EXPERIMENTOS DE FERMENTAÇÃO. VOLUME FIGURA 23. REATOR MANOMÉTRICO IDEALIZADO E CONSTRUÍDO NO LABORATÓRIO DE BIOCATÁLISE DO INT, DURANTE A ORIENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DO ALUNO RICARDO DE SANTANA (EQ/UFRJ) (SANTANA, 2019). A PRESSÃO INTERNA PODE SER VERIFICADA AO LONGO DO PROCESSO FERMENTATIVO, PERMITINDO MELHOR ACOMPANHAMENTO DO PROCESSO E SIMPLIFICANDO O TRABALHO EXPERIMENTAL, QUANDO COMPARADO À FRASCO-EXCLUSÃO. ALÉM DISSO, O REATOR POSSUI VÁLVULAS PARA

AMOSTRAGEM DE GÁS E DE LÍQUIDO, PERMITINDO O ACOMPANHAMENTO COMPLETO DA
FERMENTAÇÃO AO LONGO DO TEMPO74
FIGURA 24. VOLUME ESPECÍFICO DE BIOGÁS (■ H ₂ ; ■ CH ₄) GERADO APÓS 24 H DE
FERMENTAÇÃO, UTILIZANDO COMO INÓCULO O LODO ANAERÓBIO PROVENIENTE DO LOTE A
(1/3 ADENSADOR; 2/3 DIGESTOR), APÓS PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO E SUBMETIDO A
DIFERENTES TEMPOS DE ACLIMATAÇÃO. O EIXO X REPRESENTA OS TEMPOS DE
ACLIMATAÇÃO AOS QUAIS O LODO PRÉ-TRATADO FOI SUBMETIDO. APÓS ACLIMATAÇÃO O
LODO FOI INOCULADO EM MEIO CONTENDO 1 G/L DE GLICEROL DA GLICERINA E MANTIDO A
35°C e 160 rpm por 24 h. C: controle onde se utilizou como inóculo o lodo
ANAERÓBIO IN NATURA; ◆ CONSUMO DE GLICEROL
FIGURA 25. VOLUME ESPECÍFICO DE BIOGÁS (■ H ₂ ; ■ CH ₄) GERADO APÓS 24 H DE
FERMENTAÇÃO, UTILIZANDO COMO INÓCULO O LODO ANAERÓBIO PROVENIENTE DO LOTE B
(100% ADENSADOR), APÓS PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO E SUBMETIDO A DIFERENTES TEMPOS
DE ACLIMATAÇÃO. O EIXO X REPRESENTA OS TEMPOS DE ACLIMATAÇÃO AOS QUAIS O LODO
PRÉ-TRATADO FOI SUBMETIDO. APÓS ACLIMATAÇÃO O LODO FOI INOCULADO EM MEIO
CONTENDO 1 G/L DE GLICEROL DA GLICERINAE MANTIDO A 35° C e 160 rpm por 24 h. C:
CONTROLE ONDE SE UTILIZOU COMO INÓCULO O LODO ANAERÓBIO <i>IN NATURA</i> ; ◆ CONSUMO
DE GLICEROL
FIGURA 26. CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE H_2 EMPREGANDO LODO ANAERÓBIO DO LOTE A PRÉ-
TRATADO COM ÁCIDO E NÃO ACLIMATADO. $S_0 = 1$ G/L DE GLICEROL; $X_0 = 7,5$ G _{SSV} /L; PH
6,0; ■ H ₂ ; equação de Gompertz modificada; ▲ 1,3-PDO; ■ ácido butírico; ●
ÁCIDO ACÉTICO; ♦ GLICEROL
FIGURA 27.CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE H_2 EMPREGANDO LODO ANAERÓBIO LOTE A PRÉ-
TRATADO COM ÁCIDO E ACLIMATADO POR 24 H.S ₀ = 1 g/L de glicerol; X_0 = 7,5 g _{SSV} /L;
PH 6,0; ■ H2; EQUAÇÃO DE GOMPERTZ MODIFICADA; ▲ 1,3-PDO; ■ ÁCIDO BUTÍRICO; ●
ÁCIDO ACÉTICO; ♦ GLICEROL90
FIGURA 28. CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE H_2 EMPREGANDO LODO ANAERÓBIO LOTE B PRÉ-
TRATADO COM ÁCIDO E NÃO ACLIMATADO. S $_0$ = 1 G/L de glicerol; X $_0$ = 7,5 G $_{ m SSV}$ /L; PH
6,0; ■ H ₂ ; equação de Gompertz modificada; ▲1,3-PDO; ■ ácido butírico; ●
ÁCIDO ACÉTICO; ◆ GLICEROL91
FIGURA 29. VOLUME ESPECÍFICO DE BIOGÁS (\blacksquare H ₂ ; \blacksquare CH ₄) gerado após 24 h de
FERMENTAÇÃO, UTILIZANDO COMO INÓCULO O LODO ANAERÓBIO PROVENIENTE DO LOTE ${ m B}$
(100% ADENSADOR), APÓS PRÉ-TRATAMENTO TÉRMICO E SUBMETIDO A DIFERENTES
TEMPOS DE ACLIMATAÇÃO. O EIXO X REPRESENTA OS TEMPOS DE ACLIMATAÇÃO AOS QUAIS
O LODO PRÉ-TRATADO FOI SUBMETIDO. APÓS ACLIMATAÇÃO O LODO FOI INOCULADO EM
MEIO CONTENDO 1 G/L DE GLICEROL DA GLICERINA E MANTIDO A 35° C e 160 RPM por 24 h.
C: CONTROLE ONDE SE UTILIZOU COMO INÓCULO O LODO ANAERÓBIO IN NATURA; ◆
CONSUMO DE GLICEROL
FIGURA 30. CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE H_2 EMPREGANDO LODO ANAERÓBIO LOTE B PRÉ-
TRATADO TERMICAMENTE E NÃO ACLIMATADO. S $_0 = 1$ G/L de glicerol; X $_0 = 7,5$ G _{SSV} /L;
PH 6,0; ■ H2; EQUAÇÃO DE GOMPERTZ MODIFICADA; ▲ 1,3-PDO; ■ ÁCIDO BUTÍRICO; ●
ÁCIDO ACÉTICO; ◆ GLICEROL

FIGURA 31. CONCENTRAÇÃO FINAL DE 1,3-PDO A PARTIR DE 1 OU 10 G/L DE GLICEROL	
(GLICERINA) EM MEIO SEM SUPLEMENTAÇÃO (■) OU COM SUPLEMENTAÇÃO (■) DE 5 MG/L	
DE VITAMINA B12, 5 MG/L DE COCL ₂ .6H ₂ O, 5 G/L DE K ₂ HPO ₄ , 3 MG/L DE FECL ₃ .6H ₂ O E $\stackrel{?}{\sim}$	l
G/L DE EXTRATO DE LEVEDURA. EXPERIMENTOS REALIZADOS EM TRIPLICATA, EM FRASCOS	\$
de penicilina de 100 mL contendo 90 mL de meio, a pH 6,0, 35°C e 160 rpm. O	
INÓCULO UTILIZADO FOI LODO ANAERÓBIO PRÉ-TRATADO TERMICAMENTE, A UMA	
CONCENTRAÇÃO DE SSV DE 7,5 G/L9	6
FIGURA 32. PRODUÇÃO DE 1,3-PDO (■) EM MEIO SUPLEMENTADO CONTENDO CRESCENTES	
CONCENTRAÇÕES DE GLICEROL (■) (PROVENIENTE DA GLICERINA). VALORES APÓS 24 H DE	,
FERMENTAÇÃO NOS PROCESSOS CONTENDO DE 1 A 30 G/L E APÓS 48 H NOS PROCESSOS	
CONTENDO 35 OU 50 G/L. A EFICIÊNCIA DE CONVERSÃO DE GLICEROL EM 1,3-PDO (■) FOI	
CALCULADA EM RELAÇÃO AO RENDIMENTO MÁXIMO TEÓRICO DE 0,59 G-PDO/G-GLICEROL	
$EFF = [(Y_{P/S}EXP)/(Y_{P/S}TEORICO)]*100\%.$	7
FIGURA 33. GRÁFICO DE PARETO DOS EFEITOS PADRONIZADOS. AS BARRAS À DIREITA DA LINHA	ł
VERMELHA REPRESENTAM AS VARIÁVEIS QUE FORAM ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS	
(P< $0,1$), ou seja, são relevantes para o processo e para o modelo matemático. O	S
VALORES AO LADO DAS BARRAS CORRESPONDEM AOS EFEITOS DE CADA VARIÁVEL E DAS	
INTERAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS, REPRESENTANDO O PESO DE CADA VARIÁVEL SOBRE A	
RESPOSTA10	3
FIGURA 34. VALORES OBSERVADOS (O) VERSUS VALORES PREDITOS PELO MODELO (-).	
OBSERVA-SE QUE HOUVE BOM AJUSTE DO MODELO AOS RESULTADOS OBTIDOS	
EXPERIMENTALMENTE	3
FIGURA 35. GRÁFICO DE PARETO DOS EFEITOS PADRONIZADOS. AS BARRAS À DIREITA DA LINHA	ł
VERMELHA REPRESENTAM AS VARIÁVEIS QUE FORAM ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS	
($P < 0.05$). Os valores ao lado das barras correspondem aos efeitos de cada	
VARIÁVEL E DAS INTERAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS10	7
FIGURA 36. Superfícies de resposta do volume específico de H_2 produzido em função	
DAS CONCENTRAÇÕES DE (A) TWEEN 80 E P, (B) P E N, E (C) TWEEN 80 E N. AS REGIÕES	
VERMELHAS CORRESPONDEM ÀS MÁXIMAS PRODUÇÕES DE ${ m H}_2$, ENQUANTO AS REGIÕES	
VERDES REPRESENTAM OS MENORES VALORES DESTA RESPOSTA 10	9
FIGURA 37. VOLUME ESPECÍFICO DE H_2 ao longo do tempo representada por dados	
EXPERIMENTAIS (\blacksquare) E CURVA MODELADA PELA EQUAÇÃO DE GOMPERTZ MODIFICADA (-);	
N=2. Ensaios conduzidos em reatores manométricos de 300 mL contendo 270 mL	,
DE MEIO DE FERMENTAÇÃO COMPOSTO POR 3 G/L DE GLICEROL PROVENIENTE DA	
GLICERINA, 7,5 $_{ m SSV}$ /L, 6,6 mg/L de N, 2,8 mg/L of P e 5,7 mg/L de Tween 80. As	
FERMENTAÇÕES OCORRERAM EM PH 6,0, A 35°C E 160 RPM11	1
FIGURA 38. VOLUME ESPECÍFICO DE $H_2(\blacksquare)$ e pressão interna no reator (\blacksquare) em diferentes	,
PERCENTUAIS DE <i>HEADSPACE</i> . EXPERIMENTOS REALIZADOS EM DUPLICATA EM REATORES	
manométricos com capacidade total de 300 mL , contendo 3 g/L de glicerol	
proveniente da glicerina, 5,7 mg/L de Tween 80, 6,6 mg/L de N (14,1 mg/L de ureia	.)
2,8 mg/L de P (6,1 mg/L de KH2PO4 e 7,9 mg/L de K2HPO4), 7,5 g_{SSV}/L de lodo	
ANAERÓBIO PRÉ-TRATADO TERMICAMENTE, A PH 6,0, 35°C e 160 RPM POR 24 H11	3

FIGURA 39. VOLUME ESPECÍFICO (\blacksquare) E RENDIMENTO (\blacksquare) DE H₂ EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE GLICEROL PROVENIENTE DA GLICERINA. EXPERIMENTOS REALIZADOS EM DUPLICATA EM REATORES MANOMÉTRICOS COM CAPACIDADE TOTAL DE 300 mL, contendo 150 mL de meio (50% de *headspace*), 7,5 G_{SSV}/L de lodo ANAERÓBIO PRÉ-TRATADO TERMICAMENTE, A PH 6,0, 35°C E 160 RPM. PARA CADA 1G/L DE GLICEROL FORAM ADICIONADOS 1,9 MG/L DE TWEEN 80, 2,2 MG/L DE N (4,7 MG/L DE UREIA) 0,9 MG/L DE P (2,0 MG/L DE KH2PO4 E 2,6 MG/L DE K2HPO4). A FERMENTAÇÃO FIGURA 40. VOLUME ESPECÍFICO DE H₂ EM MEIO NÃO SUPLEMENTADO (\Box) E EM MEIO SUPLEMENTADO COM 13,3 MG/L DE TWEEN 80, 15,4 MG/L DE N (32,9 MG/L DE UREIA) 6,3 MG/L DE P (14,0 MG/L DE KH₂PO₄ E 18,2 MG/L DE K₂HPO₄)(\blacktriangle) EM FUNÇÃO DO TEMPO. EXPERIMENTOS REALIZADOS EM DUPLICATA EM REATORES MANOMÉTRICOS COM CAPACIDADE TOTAL DE 300 ML, CONTENDO 150 ML DE MEIO (50% DE HEADSPACE), 7 G/L DE GLICEROL (GLICERINA), 7,5 GSSV/L DE LODO ANAERÓBIO PRÉ-TRATADO TERMICAMENTE, FIGURA 41. EVOLUÇÃO DOS RESULTADOS DE PRODUÇÃO DE H_2 ao longo do DESENVOLVIMENTO DA TESE EM TERMOS DE VOLUME ESPECÍFICO (■) E PRODUTIVIDADE FIGURA 42. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE CH4 UTILIZANDO EPH COMO MATÉRIA-PRIMA. ENSAIOS REALIZADOS EM REATORES MANOMÉTRICOS, EM PH 7,0, CONTENDO 7,5 G_{SSV}/L DE LODO ANAERÓBIO *IN NATURA* COMO INÓCULO E INCUBADOS A 35°C SEM AGITAÇÃO.□ EFLUENTE DA PRODUÇÃO DE H₂ EM MEIO NÃO SUPLEMENTADO; \blacktriangle EFLUENTE DA PRODUÇÃO DE H₂ EM FIGURA 43. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE CH4 UTILIZANDO GLICERINA COMO MATÉRIA-PRIMA. ENSAIOS REALIZADOS EM REATORES MANOMÉTRICOS, EM PH 7,0, CONTENDO 7,5 G_{SSV}/L DE LODO ANAERÓBIO IN NATURA COMO INÓCULO E 7 G/L DE GLICEROL ORIUNDO DA GLICERINA COMO MATÉRIA-PRIMA, E INCUBADOS A 35°C SEM AGITAÇÃO. DPRODUÇÃO DE CH4 EM MEIO NÃO SUPLEMENTADO; ▲ PRODUÇÃO DE CH₄ EM MEIO COM SUPLEMENTAÇÃO...... 129 FIGURA 44. DIAGRAMA GERAL DOS RESULTADOS OBTIDOS NESTA PESQUISA. A BIORREFINARIA DA GLICERINA PROPOSTA SERIA CONSTITUÍDA DE DOIS SEGMENTOS: NO PRIMEIRO, H₂ E 1,3-PDO SERIAM OBTIDOS EM REATOR ÚNICO MAS EM FASES DIFERENTES, ENQUANTO NO segundo seriam gerados H_2 e CH_4 por processo de digestão separado em duas ETAPAS. Y: RENDIMENTO DO PRODUTO POR SUBSTRATO; EPH: EFLUENTE DA PRODUÇÃO DE H_2 ; E: ENERGIA GERADA POR UNIDADE DE TEMPO; E_{total}: ENERGIA TOTAL GERADA NO

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. VALORES DE CADA VARIÁVEL INDEPENDENTE NOS RESPECTIVOS NÍVEIS AVALIADOS
NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 (1^a parte da otimização do meio de produção de H_2).
TABELA 2. VALORES DE CADA VARIÁVEL INDEPENDENTE NOS RESPECTIVOS NÍVEIS AVALIADOS
NO DCCR (2^a parte da otimização do meio de produção de H ₂). Como os níveis -1, 0
E +1 FORAM OS MESMOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ , APENAS OS NÍVEIS -1,68 E +1,68 SÃO INÉDITOS
TABELA 3. COMPOSIÇÃO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO NOS EXPERIMENTOS REALIZADOS COM
50% de <i>headspace</i> e concentrações crescentes de glicerol. Adicionou-se 7,5
G _{SSV} /L DE LODO ANAERÓBIO PRÉ-TRATADO TERMICAMENTE
TABELA 4. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA GLICERINA UTILIZADA COMO FONTE DE
GLICEROL NESTE TRABALHO. TRATA-SE DE UM SUBPRODUTO INDUSTRIAL, GERADO NA
UNIDADE RONDONÓPOLIS/MT DA PRODUTORA DE BIODIESEL ADM DO BRASIL
TABELA 5. CARACTERIZAÇÃO SIMPLICADA DOS LOTES DE LODO ANAERÓBIO UTILIZADOS COMO
INÓCULO NESTA PESQUISA
TABELA 6. VALORES DE PRODUÇÃO ESPECÍFICA DE H_2 ; CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO ACÉTICO
(HAC), ÁCIDO BUTÍRICO (HBUT) E 1,3-PROPANODIOL (PDO); E CONSUMO DE GLICEROL,
RESULTANTES DA FERMENTAÇÃO DE $1(G/L)$ DE GLICEROL DA GLICERINA POR 24 H,
UTILIZANDO DOIS LOTES DE LODO ANAERÓBIO ACLIMATADOS A 35° POR DIFERENTES
INTERVALOS DE TEMPO
TABELA 7. CONCENTRAÇÃO INICIAL DE GLICEROL (S_i), CONSUMO DE SUBSTRATO (RPS),
CONCENTRAÇÕES FINAIS DE ÁCIDO ACÉTICO (HAC), ÁCIDO BUTÍRICO (HBU), 1,3-PDO,
RENDIMENTO DE 1,3-PDO $(Y_{P/S})$ e eficiência de conversão de glicerol a 1,3-PDO.
VALORES APÓS 24 H DE FERMENTAÇÃO NOS PROCESSOS CONTENDO DE 1 A 30 G/L E APÓS
48 h nos processos contendo 35 ou 50 g/L. A eficiência de conversão de glicerol
EM 1,3-PDO FOI CALCULADA EM RELAÇÃO AO RENDIMENTO MÁXIMO TEÓRICO DE 0,59 G-
PDO/G-GLICEROL. EFF=[$(Y_{P/S}EXP)/(Y_{P/S}TEÓRICO)$]*100%. MEIO NÃO SUPLEMENTADO (\circ); MEIO SUPLEMENTADO (\bullet)
TABELA 8. MATRIZ EXPERIMENTAL DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ E PRODUCÕES ESPECÍFICAS
DE H ₂ EM CADA CONDIÇÃO. OS EXPERIMENTOS 9, 10 E 11 SÃO REPETIÇÕES DO PONTO
CENTRAL (NÍVEL 0)

TABELA 9. ANOVA (ANÁLISE DE VARIÂNCIA) DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ . FATORES EM VERMELHO FORAM ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVOS NO INTERVALO DE CONFIANÇA DE 90%.
TABELA 10. MATRIZ EXPERIMENTAL DO DCCR COM 3 FATORES E PRODUÇÕES ESPECÍFICAS DE H ₂ EM CADA CONDIÇÃO. EM NEGRITO, OS ENSAIOS QUE FORAM ADICIONADOS À MATRIZ ANTERIOR, REFERENTES AOS PONTOS AXIAIS
TABELA 11. ANOVA (ANÁLISE DE VARIÂNCIA) DO DCCR. FATORES EM VERMELHO FORAM ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVOS NO INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (P-VALOR < 0,05).
TABELA 12. VALORES PREDITOS E VALORES OBSERVADOS EXPERIMENTALMENTE PARA A PRODUÇÃO ESPECÍFICA DE H_2 NA CONDIÇÃO OTIMIZADA (6,6 MG/L DE N, 2,8 MG/L OF P E 5,7 MG/L DE TWEEN 80). OS LIMITES -95% E +95% REPRESENTAM A FAIXA ONDE A RESPOSTA EXPERIMENTAL VALIDA O MODELO MATEMÁTICO, CONSIDERANDO-SE UM INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95%, BASEADO EM UMA DISTRIBUIÇÃO NORMAL. N_{FRASCO} =5; N_{REATOR} =3
TABELA 13. CONCENTRAÇÕES DE GLICEROL ORIUNDO DE GLICERINA NO INÍCIO (SI) E NO FINAL (SF) DOS ENSAIOS, FERMENTATIVOS, REDUÇÃO PERCENTUAL DE SUBSTRATO (RPS), PRESSÃO INTERNA DO REATOR NO FINAL DA FERMENTAÇÃO ($P_{INT,F}$) E CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO ACÉTICO (HAC), 1,3-PDO E ÁCIDO BUTÍRICO (HBU) APÓS 24H DE PROCESSO. EXPERIMENTOS REALIZADOS EM DUPLICATA EM REATORES MANOMÉTRICOS COM CAPACIDADE TOTAL DE 300 ML, CONTENDO 150 ML DE MEIO (50% DE <i>HEADSPACE</i>), 7,5 G _{SSV} /L DE LODO ANAERÓBIO PRÉ-TRATADO TERMICAMENTE, A PH 6,0, 35°C E 160 RPM. PARA CADA 1G/L DE GLICEROL FORAM ADICIONADOS 1,9 MG/L DE TWEEN 80, 2,2 MG/L DE N (4,7 MG/L DE UREIA) 0,9 MG/L DE P (2,0 MG/L DE KH ₂ PO ₄ E 2,6 MG/L DE K ₂ HPO ₄) 116
TABELA 14. CONCENTRAÇÕES DE GLICEROL ORIUNDO DE GLICERINA NO INÍCIO (S_I) E NO FINAL (S_F) DOS ENSAIOS, FERMENTATIVOS, REDUÇÃO PERCENTUAL DE SUBSTRATO (RPS) E CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO ACÉTICO (HAC), 1,3-PDO E ÁCIDO BUTÍRICO (HBU) APÓS 28H DE PROCESSO. EXPERIMENTOS REALIZADOS EM DUPLICATA EM REATORES MANOMÉTRICOS COM CAPACIDADE TOTAL DE 300 ML, CONTENDO 150 ML DE MEIO (50% DE <i>HEADSPACE</i>), 7 G/L DE GLICEROL (GLICERINA), 7,5 G _{SSV} /L DE LODO ANAERÓBIO PRÉ-TRATADO TERMICAMENTE, A PH 6,0, 35°C E 160 RPM. SS: MEIO SEM SUPLEMENTAÇÃO; CS: MEIO SUPLEMENTADO COM 13,3 MG/L DE TWEEN 80, 15,4 MG/L DE N (32,9 MG/L DE UREIA) 6,3 MG/L DE P (14,0 MG/L DE KH ₂ PO ₄ E 18,2 MG/L DE K ₂ HPO ₄)
TABELA 15. COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS NESTA TESE, PARA PRODUÇÃO DE H_2 , e outros resultados reportados na literatura, em batelada 120
TABELA 16. DESCRIÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DAS ETAPAS MENCIONADAS NA Figura 41. SI: concentração inicial de glicerol

TABELA 17. COMPOSIÇÃO INICIAL E FINAL DO MEIO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA EMPREGANDO
EPH-SS OU EPH-CS COMO MATÉRIA-PRIMA, INDICADORES DA PRODUÇÃO DE METANO E
parâmetros cinéticos da equação de Gompertz modificada nestas duas
CONDIÇÕES. A EFICIÊNCIA FOI CALCULADA EM RELAÇÃO AO RENDIMENTO MÁXIMO
TEÓRICO DE 350 ML/G _{DQO} 125
TABELA 18. COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS NESTA TESE, PARA PRODUÇÃO
SEQUENCIAL DE H_2 E CH_4 , E OUTROS RESULTADOS REPORTADOS NA LITERATURA, EM
BATELADA
TABELA 19. COMPOSIÇÃO INICIAL E FINAL DO MEIO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA EMPREGANDO
GLICERINA COMO MATÉRIA-PRIMA COM OU SEM ADIÇÃO DE SUPLEMENTOS (CS E SS,
RESPECTIVAMENTE), INDICADORES DA PRODUÇÃO DE METANO E PARÂMETROS CINÉTICOS
DA EQUAÇÃO DE GOMPERTZ MODIFICADA NESTAS DUAS CONDIÇÕES. A EFICIÊNCIA FOI
CALCULADA EM RELAÇÃO AO RENDIMENTO MÁXIMO TEÓRICO DE 350 mL/g_{QQO} 131

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. PROPRIEDADES FISICO-QUÍMICAS DO GÁS HIDROGÊNIO. FONTE: CIPA/USP
QUADRO 2. PRINCIPAIS EMPRESAS PRODUTORAS DE 1,3-PROPANODIOL E SEUS RESPECTIVOS PAÍSES
QUADRO 3. SUBSTRATOS E REAÇÕES DE METANOGÊNESE DE ACORDO COM DIFERENTES TIPOS DE ORGANISMOS (SERRANO-SILVA ET AL., 2014; TAKAI, 1970)
QUADRO 4. DIFERENTES METODOLOGIAS DE PRÉ-TRATAMENTO DO LODO ANAERÓBIO PARA PRODUÇÃO DE H_2 , e os ganhos alcançados frente ao uso de inóculos não submetidos a pré-tratamento (controle)

LISTA DE ABREVIATURAS

1,3-PDO	1,3-propanodiol	
3-HPA	3-hidroxipropionaldeído	
ABIQUIM	Associação Brasileira da Indústria Química	
ANOVA	Análise de variância	
APEC	Cooperação Econômica Ásia-Pacífico (Asia-Pacific Economic Cooperation)	
CBIO	Créditos de descarbonização	
CCS	Captura e armazenamento de carbono (Carbon Capture Storage)	
CH ₄	Metano	
CHIC	Clean Hydrogen in European Cities	
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	
CO ₂	Dióxido de carbono, gás carbônico	
CS	Meio com adição de suplementos	
DCCR	Delineamento composto central rotacional	
DQO	Demanda Química de oxigênio	
EMTU/SP	Empresa Metropolitana de Transportes Urbanos de São Paulo	
EPH	Efluente da produção de hidrogênio	
EPH-CS	Efluente da produção de H ₂ obtido em meio suplementado	
EPH-SS	Efluente da produção de H ₂ obtido em meio não suplementado	
ETE	Estação de tratamento de esgoto	
FAPERJ	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro	
Fd	Ferredoxina	
Finep	Financiadora de Estudos e Projetos	
GDH	Enzima glicerol desidrogenase	
GDHt	Enzima glicerol desidratase	
GEE	Gases causadores do efeito estufa	
GEF	Global Environment Facility	
H ₂	Gás hidrogênio	
H _p	Volume específico máximo de biogás	

HRT	Tempo de retenção hidráulica
METEX	Metabolic Explorer AS
MME	Ministério de Minas e Energia
Ν	Nitrogênio
OGM	Organismo geneticamente modificado
Р	Fósforo
PDOR	Enzima 1,3-propanodiol oxidoredutase
РНА	Polihidroxialcanoato
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel
PNUD	Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento
PTT	Politrimetileno tereftalato
PU	Poliuretano
Q _p	Produtividade volumétrica
R ²	Coeficiente de determinação
RenovaBio	Política Nacional de Biocombustíveis
R _m	Taxa máxima de produção de biogás
SCO	Bioóleo (single cell oil)
S _i	Concentração inicial de substrato
SS	Meio sem adição de suplementos
SSF	Sólidos suspensos fixos
SST	Sólidos suspensos totais
SSV	Sólidos suspensos voláteis
тос	Carbono orgânico total (<i>Total organic carbon</i>)
USP	Universidade de São Paulo
Y _{P/S}	Rendimento de produto em relação ao substrato
λ	Fase adaptativa

SUMÁRIO

1.	INT	RODUÇÃO	24
2.	OB.	IETIVOS	26
	2.1.	Objetivo geral	26
	2.2.	Objetivos específicos	26
3.	REV	VISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
	3.1.	Hidrogênio	27
	3.1.1.	Características e aplicações	27
	3.1.2.	Tecnologias para produção de Hidrogênio	29
	3.2.	1,3-propanodiol	32
	3.2.1.	Características, aplicações e principais produtores de 1,3-PDO	32
	3.2.2.	Tecnologias para produção de 1,3-PDO	34
	3.3.	Metano	37
	3.3.1.	Características, aplicações e vias de produção do metano	37
	3.3.2.	Biogás e biometano	38
	3.4.	A glicerina residual do biodiesel e seu potencial como matéria-prima	39
	3.4.1.	O aproveitamento biotecnológico da glicerina	44
	3.4.2.	Digestão anaeróbia de glicerol por organismos presentes em lodo anaeróbio de estaçã	ăO
	de trat	amento de esgoto	45
	3.5.	Obtenção de H ₂ e 1,3-propanodiol utilizando glicerol como fonte de carbono e lodo	40
	anaero	Controlo de metonogânece	49
	3.5.1.		49
	3.5.2.		52
	3.5.3.	Controle das reduções de nitrato e suirato	55
	3.5.4.	vias metabolicas envolvidas na acidogenese a partir de glicerol	55
	3.6.	Produção de metano utilizando o efluente da produção de H_2 como materia-prima	60
	3./.	A produção sequencial de H_2 e CH_4 e a política de descarbonização	61
4.	MA	TERIAIS E MÉTODOS	63
	4.1.	Glicerina residual da produção de Biodiesel	64
	4.2.	Lodo anaeróbio	64
	4.2.1.	Origem e características do lodo anaeróbio	64

4.2.2.	Pré-tratamento ácido do lodo anaeróbio	66
4.2.3.	Pré-tratamento térmico do lodo anaeróbio	66
4.3.	Seleção do lote de lodo anaeróbio	67
4.4.	Seleção do tipo de pré-tratamento do lodo anaeróbio	68
4.5. reduto	Produção de 1,3-propanodiol em meio suplementado para favorecimento da via ra do glicerol	69
4.6.	Otimização do meio de produção de H ₂	71
4.6.1.	Planejamento fatorial 2 ³	71
4.6.2.	Delineamento composto central rotacional com 3 fatores	72
4.6.3.	Validação experimental	74
4.7. de H ₂	Influência do volume de <i>headspace</i> e da concentração inicial de glicerol sobre a prod 75	ução
4.8.	Produção sequencial de H_2 e CH_4	76
4.9.	Produção direta de CH₄ a partir de glicerina	76
4.10.	Quantificação do biogás	77
4.11.	Modelagem da produção de biogás	79
4.12.	Metodologia analítica	79
4.12.1	. Cromatografia gasosa	79
4.12.2	. Cromatografia Líquida	80
. RES	SULTADOS E DISCUSSÃO	81
5.1.	Caracterização da glicerina residual do Biodiesel	81
5.2.	Caracterização do lodo anaeróbio	82
5.3.	Seleção do lote de lodo anaeróbio	83
5.4.	Seleção do tipo de pré-tratamento do lodo anaeróbio	92
5.5. glicero	Produção de 1,3-propanodiol em meio suplementado para favorecer a via redutora c	do 95
5.6.	Otimização do meio de produção de H ₂	100
5.6.1.	Planejamento fatorial 2 ³	100
5.6.2.	Delineamento composto central rotacional com 3 fatores	104
5.6.3.	Validação experimental	110
5.7. de H₂	Influência do volume de <i>headspace</i> e da concentração inicial de glicerol sobre a prod 112	ução
5.8.	Produção sequencial de H₂ e CH₄	124
	4.2.2. 4.2.3. 4.2.3. 4.3. 4.4. 4.5. reduto 4.6. 4.6.1. 4.6.2. 4.6.3. 4.6.3. 4.7. de H ₂ 4.8. 4.9. 4.10. 4.11. 4.12. 4.12.1. 4.12.1. 4.12.2. 5.1. 5.2. 5.1. 5.2. 5.3. 5.4. 5.5. glicero 5.6.1. 5.6.2. 5.6.3. 5.6.1. 5.6.2. 5.6.3. 5.7. de H ₂ 5.8.	 4.2.2. Pré-tratamento ácido do lodo anaeróbio 4.2.3. Pré-tratamento térmico do lodo anaeróbio 4.4. Seleção do lote de lodo anaeróbio 4.4. Seleção do tipo de pré-tratamento do lodo anaeróbio 4.4. Seleção do tipo de pré-tratamento do lodo anaeróbio 4.5. Produção de 1,3-propanodiol em meio suplementado para favorecimento da via redutora do glicerol 4.6. Otimização do meio de produção de H₂ 4.6.1. Planejamento fatorial 2³ 4.6.2. Delineamento composto central rotacional com 3 fatores 4.6.3. Validação experimental 4.7. Influência do volume de <i>headspace</i> e da concentração inicial de glicerol sobre a prod de H₂ 75 4.8. Produção sequencial de H₂ e CH₄ 4.9. Produção direta de CH₄ a partir de glicerina 4.10. Quantificação do biogás 4.11. Modelagem da produção de biogás 4.12. Cromatografia gasosa 4.12.1. Cromatografia gasosa 4.12.2. Cromatografia líquida RESULTADOS E DISCUSSÃO 5.3. Seleção do loto de onaeróbio 5.4. Seleção do loto de pré-tratamento do lodo anaeróbio 5.5. Produção de pré-tratamento do lodo anaeróbio 5.6. Otimização do meio de produção de H₂ 5.6. Otimização do meio de produção de H₂ 5.6. Delineamento fatorial 2³ 5.6. Delineamento fatorial 2³ 5.6. Delineamento fatorial 2³ 5.6. Delineamento fatorial 2³ 5.6. Delineamento composto central rotacional com 3 fatores 5.6. Juliação do meio de produção de H₂ 5.6. Otimização do meio de produção de H₂ 5.7. Influência do volume de <i>headspace</i> e da concentração inicial de glicerol sobre a prod glicerol 5.8. Produção sequencial d²

5.9.	Produção direta de CH₄ a partir de glicerina	
5.10	Considerações finais	
6. CO	ONCLUSÕES	
7. SU	UGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	
REFE	RÊNCIAS	
ANEX	OS 152	

1. INTRODUÇÃO

A busca por fontes energéticas mais sustentáveis, livres de petróleo e menos poluentes levou ao desenvolvimento de diferentes biocombustíveis, capazes de substituir eficientemente os combustíveis tradicionais, derivados de fontes fósseis. Neste contexto o biodiesel despontou como substituto ao diesel de petróleo, formalizado pela criação do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) em 2004, que previa a mistura do biodiesel ao diesel em proporções crescentes ao longo dos anos seguintes.

O aumento da produção de biodiesel nas últimas décadas no Brasil, impulsionado pelo PNPB, teve como consequência a geração de grandes quantidades de glicerina como subproduto e a redução do valor de mercado do glicerol. Por se tratar de um material com elevado teor de glicerol, porém com baixo valor agregado, a glicerina pode ser empregada como matéria-prima tanto em processos químicos quanto em processos biológicos, para produção de sabão, 1,3-propanodiol, e emolientes e umectantes paras as indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética.

A valorização da glicerina acarreta a redução do custo global da cadeia produtiva deste biodiesel, impactando não só toda a economia brasileira, que é baseada no transporte rodoviário, como também o meio ambiente.

Neste cenário a fermentação e a digestão anaeróbia do glicerol presente na glicerina apresenta-se como tecnologia promissora, considerando a diversa gama de bioprodutos que podem ser obtidos a partir destes processos. Processos biotecnológicos são particularmente atraentes devido à sua baixa demanda energética e sua característica intrinsecamente sustentável, uma vez que são conduzidos a temperatura próxima a ambiente e pressão atmosférica. Dentre os bioprodutos gerados nestes processos destacam-se o hidrogênio (H₂) e o metano (CH₄), por suas elevadas densidades energéticas, e o 1,3-propanodiol (1,3-PDO), por seu mercado em franca expansão.

É importante destacar que o desenvolvimento do biodiesel a partir de oleaginosas cultivadas em solo brasileiro, a aplicação do biodiesel como substituto ao diesel e a ocupação do posto de segundo maior produtor de biodiesel do mundo, pelo Brasil, só foram possíveis devido à ciência, à pesquisa e ao desenvolvimento tecnológico, os quais não são possíveis sem o devido fomento por parte do Estado. Da mesma forma, a produção de novos biocombustíveis e novas fontes de energia sustentável, em escala industrial, só se darão mediante apropriada atenção à pesquisa brasileira. Pesquisa esta que se faz nas universidades e institutos de pesquisa públicos, tendo como mão-de-obra alunos de pósgraduação, que se mantém com bolsas oferecidas principalmente pela Capes e pelo CNPq. Embora economicamente defasadas, são estas bolsas e estas instituições de fomento que mantém a ciência viva no Brasil, apesar de tudo.

Esta tese de doutorado, financiada em parte pela Capes e em parte pela FAPERJ – programa FAPERJ Nota 10, através de bolsas de estudo e pelo CNPq via projeto Universal, teve como objetivo abordar opções biotecnológicas para a valorização da glicerina gerada como subproduto da produção de biodiesel. Três produtos de relevante interesse energético ou industrial – H₂, CH₄ e 1,3-PDO – foram avaliados durante este trabalho utilizando a glicerina como matéria-prima e lodo anaeróbio de estação de tratamento de esgoto como inóculo, resultando em um processo operacionalmente simples.

Este primeiro capítulo tratou de introduzir o tema de estudo, contextualizando-o no cenário atual brasileiro. No capítulo 2 são apresentados os objetivos geral e específicos desta tese de doutorado. O terceiro capítulo contém o levantamento bibliográfico, onde são abordados temas de relevância para o entendimento do presente estudo, baseado em conteúdos de livros e artigos indexados, portais e notícias de fontes confiáveis. No capítulo 4 estão descritas as metodologias empregadas nos ensaios experimentais. O capítulo 5 contém os resultados obtidos experimentalmente ao logo do período de doutoramento, bem como a discussão dos mesmos, frente a outros trabalhos publicados na literatura científica nacional e internacional. No capítulo 6 são pontuadas as conclusões deste estudo, de acordo com os objetivos traçados. Finalmente, no capítulo 7, são apresentadas sugestões para o prosseguimento desta linha de pesquisa, baseadas nos questionamentos surgidos durante a discussão dos resultados gerados. As publicações geradas ao longo dos últimos quatro anos constam no anexo, no final do documento.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral foi investigar um processo biotecnológico para valorização da glicerina residual do biodiesel, através da produção de hidrogênio e 1,3-propanodiol, via fermentação e de metano, via digestão anaeróbia.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

Selecionar o lote de lodo anaeróbio, em função do ponto de coleta, mais adequado à produção de H₂;

Avaliar o tipo de pré-tratamento do lodo anaeróbio mais propício e mais estável para a produção de H₂;

Avaliar a produção de 1,3-PDO a partir de glicerina, empregando lodo anaeróbio como inóculo;

Avaliar a influência da adição de suplementos que favoreçam a via redutora do metabolismo de glicerol sobre a produção de 1,3-PDO;

 Avaliar o efeito da concentração inicial de glicerol sobre a produção de 1,3-PDO a partir de glicerina e tendo lodo anaeróbio como inóculo;

 Otimizar o meio de produção de H₂ em função das concentrações de nitrogênio, fósforo e Tween 80;

Selecionar o volume de headspace empregado no reator batelada para produção de H₂;

Selecionar a concentração inicial de glicerol que leva a maiores produções e rendimentos de H₂;

Avaliar a produção de metano a partir do efluente da produção de H₂ em comparação à produção direta de metano a partir de glicerina.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Hidrogênio

3.1.1. Características e aplicações

O hidrogênio é um gás (nas condições normais de temperatura e pressão) incolor e inodoro, altamente inflamável e com elevado poder calorífico por unidade de massa (120,1 MJ/kg). A forma mais estável do hidrogênio é a molecular, ou seja, H₂. No Quadro 1 estão apresentadas as principais propriedades físico-químicas do H₂.

Parâmetro	Valor
Massa molar	2 g/mol
Ponto de ebulição	-253°C
Ponto de fusão	-259,1°C
Temperatura crítica	-240°C
Pressão crítica	12,8 atm
Temperatura de ignição	574,3°C
Taxa de queima	9,9 mm/min
Pressão de vapor (a -252,5 °C)	760 mmHg
Calor latente de vaporização	105,8 cal/g
Calor de combustão	-27.823 cal/g
Limites de inflamabilidade no ar	4% - 75%
Densidade relativa do vapor	0,067
Densidade relativa do líquido (a -253 °C)	0,071
Solubilidade em água	insolúvel

Quadro 1. Propriedades fisico-químicas do gás hidrogênio. Fonte: CIPA/USP

As principais aplicações do hidrogênio são na síntese de amônia para produção de fertilizantes nitrogenados (49%) e no hidrocraqueamento de petróleo (37%); para a

produção de metanol são utilizados apenas 8% do H₂ produzido no mundo e o restante (6%) se distribui entre as indústrias alimentícia, cosmética e indústrias menores, como as de células a combustível – estacionárias ou para veículos – (PARKINSON et al., 2019). A síntese de amônia é responsável pela emissão de 2% dos gases causadores do efeito estufa (GEE); desta forma, a utilização do hidrogênio proveniente de processo com baixo carbono associado pode reduzir drasticamente a emissão de GEE na cadeia de produção de fertilizantes (THE ROYAL SOCIETY, 2018).

Além dos usos industriais clássicos, o interesse no emprego do hidrogênio como combustível tem aumentado muito nas últimas décadas, fomentado por políticas de baixo carbono em todo o mundo, em atenção às metas definidas no Acordo de Paris. As metas traçadas pelo Brasil neste âmbito incluem a redução das emissões de gases do efeito estufa em 37% até 2025 e 43% até 2030, em comparação às emissões no ano de 2005 (MCTIC; ONU MEIO AMBIENTE, 2017). Para que o Brasil alcance as metas de redução de GEE definidas, já é prevista a "troca de combustíveis" em diferentes setores industriais, como as indústrias de cimento e siderurgia (MCTIC; ONU MEIO AMBIENTE, 2017). Tendo em vista a combustão limpa - cujos produtos são energia e vapor d'água - livre de GEE e altamente energética (120,1 MJ/kg), cerca de 3 vezes superior a dos combustíveis tradicionais (Figura 1) (DING; YANG; HE, 2016), o hidrogênio tem relevante importância na mitigação dos GEE, para que o país alcance os índices de redução pactuados.



Poder Calorífico Superior (MJ.kg-1)

Figura 1. Poder calorífico superior de diversos combustíveis e biocombustíveis. Em destaque o H₂, que possui poder calorífico cerca de 3 vezes maior que os combustíveis tradicionais oriundos de fontes fósseis. Fonte:(WONG; WU; JUAN, 2014)

No âmbito dos transportes, dois projetos mundialmente pioneiros na criação de ônibus movidos a hidrogênio foram desenvolvidos no Brasil - o "ônibus brasileiro a hidrogênio" e o "ônibus híbrido elétrico-hidrogênio". O ônibus brasileiro a hidrogênio, desenvolvido pela parceria entre o Ministério de Minas e Energia (MME), a Empresa Metropolitana de Transportes Urbanos de São Paulo (EMTU/SP), o Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD) e a Universidade de São Paulo (USP), com recursos financeiros da Financiadora de Estudos e Projetos (Finep) e da Global Environment Facility (GEF), teve seu lançamento na cidade de São Paulo em 2009 e começou a circular no ano seguinte, com consumo de 15 kg_{H2}/100 km e autonomia de 300 Km (EMTU/SP, 2018). O ônibus híbrido desenvolvido pela COPPE/UFRJ em parceria com a Finep, a Petrobrás, o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj) é o único com tecnologia 100% brasileira (COPPE, 2018). O primeiro protótipo foi lançado para testes em 2010, o segundo em 2012, na Rio +20, e o terceiro protótipo, mais eficiente e com o consumo de 5 $Kg_{H2}/100$ Km e autonomia de 500 Km, foi demonstrado durante os Jogos Olímpicos Rio 2016 (COPPE, 2018). Desde 2014 estes ônibus são utilizados no transporte público universitário na UFRJ (COPPE, 2018). Ambos os ônibus brasileiros utilizam sistema de tração elétrica e célula combustível de hidrogênio (EMTU/SP, 2018; COPPE, 2018).

No contexto mundial existem diferentes iniciativas envolvendo o emprego de células combustíveis de hidrogênio no transporte público. Um exemplo de sucesso é o programa *Clean Hydrogen in European Cities* (CHIC), que promoveu a difusão de 58 ônibus a hidrogênio na Europa e no Canadá, de 2010 a 2016. Nos primeiros 5 anos de programa 1,4 milhões de litros de diesel deixaram de ser consumidos (CHIC, 2017). O hidrogênio utilizado por estes ônibus é produzido majoritariamente por eletrólise da água, utilizando a combinação de energias solar, eólica e hidroelétrica (CHIC, 2017).

3.1.2. Tecnologias para produção de Hidrogênio

O hidrogênio pode ser produzido tanto a partir de matérias-primas fósseis quanto de recursos renováveis, conforme apresentado na Figura 2. Atualmente 95% do hidrogênio é

produzido a partir de fontes fósseis, majoritariamente gás natural, produtos do craqueamento de petróleo e carvão; os 5% restantes são obtidos principalmente por eletrólise, como subproduto da produção de cloro (OECD/IEA, 2017).



Figura 2. Matérias-primas e tecnologias para produção de hidrogênio. Na figura, o termo *Carbon Capture Storage* (CCS) é amplamente utilizado para designar sistemas de captura e armazenamento de CO₂ em rochas. Fonte: Elaboração própria a partir das referências: HOSSEINI & WAHID, 2016; NIKOLAIDIS & POULLIKKAS, 2017; THE ROYAL SOCIETY, 2018.

A reforma do gás natural além de ser a tecnologia mais utilizada, é também a forma mais econômica de produção de H₂ atualmente (OECD/IEA, 2017), custando entre 2,08 e 2,27 US\$/kg em processos sem ou com sistema de captura e armazenamento de carbono

(CCS – do inglês, *Carbon Capture and Storage*), respectivamente, considerando o custo do gás natural de US\$ 10/MMBtu (NIKOLAIDIS; POULLIKKAS, 2017). Além do custo, outras vantagens da reforma a vapor são a alta conversão, entre 74 e 85%, e a pureza do H₂ obtido (99,99%); contudo, esta tecnologia demanda o emprego de elevadas temperaturas, entre 850 e 900°C, e resulta em emissões de CO₂ para a atmosfera na ordem de 0,3 - 0,4 m_{CO2}^3/m_{H2}^3 , apontando para a necessidade de um sistema de CCS acoplado à planta de produção de H₂ (NIKOLAIDIS; POULLIKKAS, 2017; THE ROYAL SOCIETY, 2018).

O processo de eletrólise da água têm se mostrado viável apenas em locais onde o custo da eletricidade não ultrapassa US\$ 30/MWh (OECD/IEA, 2017), visto que constitui o principal impacto sobre o preço do H₂ proveniente de eletrólise.

Neste cenário observa-se a necessidade de desenvolvimento de processos sustentáveis e renováveis para produção de H₂. Processos fermentativos são particularmente atraentes devido à sua baixa demanda energética e sua característica intrinsecamente sustentável, uma vez que são conduzidos a temperatura próxima à ambiente e pressão atmosférica. Adicionalmente, estes processos possuem maiores conversões quando comparados a outros bioprocessos, como os de biofotólise da água (SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO S., 2014). A produção de H₂ por fermentação pode ocorrer tanto em presença (foto-fermentação) quanto em ausência de luz (fermentação escura, ou simplesmente fermentação).

No caso da foto-fermentação são utilizadas bactérias púrpuras não-sulfurosas, as quais promovem a fotossíntese anaeróbia utilizando energia solar e compostos orgânicos – principalmente ácidos orgânicos – para produção de H₂ (TRCHOUNIAN; SAWERS; TRCHOUNIAN, 2018). As vantagens desse processo são a completa conversão dos ácidos orgânicos a H₂ e CO₂, resultando em elevados rendimentos. Por outro lado, é um processo de elevada demanda energética e que depende de reatores modificados para maximizar a captação de luz (HALLENBECK; GHOSH, 2009).

A fermentação consiste no consumo de fontes de carbono, como carboidratos, álcoois e lipídeos por fungos e bactérias anaeróbias na ausência de oxigênio, resultando na produção de ácidos orgânicos, álcoois e H₂. Devido à formação de outros produtos o rendimento em H₂ é inferior àquele obtido por foto-fermentação, porém estes produtos podem ser recuperados ou utilizados como matéria-prima em um processo sequencial (GARRITANO et al., 2018). Além disso, este processo possui baixa demanda energética, pois não depende de iluminação, e pode ser realizado em reatores convencionais (HALLENBECK; GHOSH, 2009). O inóculo da fermentação pode ser composto tanto por cultura pura de bactérias, quanto por consórcios microbianos. Quando população mista é empregada como inóculo, materiais complexos podem ser utilizados como matéria-prima, como resíduos agroindustriais, alimentícios e sólidos urbanos, e a demanda energética é menor, pois as etapas de esterilização de equipamentos e meios não é necessária (SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO S., 2014). A produção de H₂ por fermentação empregando população mista de microrganismos será abordada na seção 3.5.

3.2. 1,3-propanodiol

3.2.1. Características, aplicações e principais produtores de 1,3-PDO

O 1,3-propanodiol, ou trimetileno glicol, ou 1,3-dihidroxipropano é um di-álcool, composto por uma cadeia linear de 3 carbonos, com uma hidroxila em cada extremidade. Possui fórmula química $C_3H_8O_2$ e massa molar 76,10 g/mol. É líquido em temperatura ambiente (ponto de fusão: -32°C; ponto de ebulição: 213 - 215°C) e miscível em água (solubilidade: 100 g/L).

Constitui um suprimento importante para a indústria de polímeros, tendo como principais produtos o politrimetileno tereftalato (PTT) e o poliuretano (PU). Também é utilizado como insumo nas indústrias de cosméticos, cuidados pessoais e produtos de limpeza (LEE et al., 2015a). O Mercado do 1,3-PDO tem crescido rapidamente, atingindo o valor de US\$ 402 milhões em 2020 com projeção de alcançar os US\$ 691 milhões em 2025, devido ao aumento da demanda por produtos de base biotecnológica associado a menores emissões de gases causadores do efeito estufa e menor consumo de energia, além da expansão do mercado de PTT (MARKETSANDMARKETS[™], 2020).

O maior mercado consumidor de 1,3-PDO é constituído pelos países das Américas, seguido pelos países da APEC (Cooperação Econômica Ásia-Pacífico do inglês: *Asia-Pacific Economic Cooperation*). Algumas das principais empresas produtoras de 1,3-PDO estão relacionadas no Quadro 2.

Nome	País da sede
DuPont Tate & Lyle Bio Products Company, LLC ^{[1][2][3][4][5][6]}	Estados Unidos
Royal Dutch Shell ^{[2][4]}	Países Baixos
Metabolic Explorer AS ^{[1][2][4][5][6]}	França
Zhangjiagang Glory Biomaterial Co. Ltd; ^{[1][2][3][4][6]} Zouping Mingxing Chemical Co., Ltd; ^{[1][2][3][4][5][6]} Haihang Industry Company Ltd. ^[1] Hunan Rivers Bioengineering Co., Ltd. ^[1] Zhangjiagang Huamei Biomaterial Co., Ltd. ^[1] Sheng Hong Group Holdings Ltd. ^[1] Shanghai Jinjinle Industry Co., Ltd; ^{[4][5]} Chongqing Kunlun Chemical Co., Ltd. ^{[4][5]}	China
Merck KGgA ^{[1][3]}	Alemanha
Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. ^[1]	Japão
Salicylates And Chemicals Pvt. Ltd ^{[4][5]}	Índia

Quadro 2. Principais empresas produtoras de 1,3-propanodiol e seus respectivos países.

Fontes:[1]https://www.marketsandmarkets.com/pdfdownloadNew.asp?id=760;[2]https://www.grandviewrese arch.com/industry-analysis/1-3-propanediol-pdo-market; [3]https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/1-3-propanediol-pdo-market-760.html; [4]https://www.themarketreports.com/report/global-1-3-propanediol-market-research-report; [5]https://www.marketresearchfuture.com/reports/1-3-propanediol-market-5722;[6]https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-1-3-propanediol-market

Além de ser a maior empresa produtora de 1,3-PDO, recentemente a empresa DuPont Tate & Lyle Bio Products Company anunciou que irá ampliar sua capacidade de produção para atender à crescente demanda (MARKETSANDMARKETSTM, 2020). Esta empresa possui uma ampla rede de distribuição, incluindo para o Brasil, dos produtos ZEMEA[®] e SUSTERRA[®]. ZEMEA[®] é o 1,3-PDO de maior pureza, direcionado para a fabricação de cosméticos, produtos de higiene pessoal e produtos farmacêuticos; SUSTERRA[®] é empregado como modificador de viscosidade, estabilizante e fluido trocador de calor, é o monômero para a fabricação do PTT Sonora[®], que por sua vez é utilizado na fabricação de roupas esportivas e carpetes ("DuPont Tate & Lyle BioProducts", 2020).

A Shell foi uma das primeiras indústrias a produzir 1,3-PDO, na década de 1970. Em 1996 iniciou a produção do PTT CORTERRA[®] (SHELL, 2020).

Metabolic Explorer AS (METEX) é uma spin-off da Université d'Auvergne fundada em 1999. Em 2010 começou a produzir 1,3-PDO em escala industrial utilizando organismo geneticamente modificado (OGM), sendo pioneira na produção biotecnológica de 1,3-PDO. Recentemente, anunciou o início da produção de uma planta para produção de 1,3-PDO e ácido butírico a partir de óleo de colza utilizando inóculo livre de OGM para meados de 2021 (METEX, 2020). O produto TILAMAR[®] tem como consumidores-alvo as empresas de cosméticos e cuidados pessoais com foco em sustentabilidade (DSM, 2020).

Outra empresa de relevância mundial no mercado de 1,3-PDO é a chinesa Glory, que iniciou a produção de 1,3-PDO em 2011. No Brasil não foram encontradas empresas produtoras de 1,3-PDO associadas à ABIQUIM (Associação Brasileira da Indústria Química). Foi realizada uma busca no portal COMEX STAT em busca do comércio exterior brasileiro de 1,3-PDO nos últimos 20 anos, porém este é extremamente inconstante, com importações descontínuas e sem uma tendência definida, indicando que o Brasil deve importar os produtos resultantes da cadeia do 1,3-PDO, como PTT, fibras e produtos acabados. Por não possuírem um NCM próprio é difícil rastrear esse comércio.

3.2.2. Tecnologias para produção de 1,3-PDO

As rotas químicas de produção do 1,3-PDO são as seguintes: reação de óxido de etileno com CO, seguida por redução com H₂; hidratação da acroleína, seguida por hidrogenação; ou hidrogenólise do glicerol.

A hidroformilação do óxido de etileno é a rota adotada pela Shell, e ocorre em duas etapas, conforme ilustrado na rota vermelha da Figura 3 (SILVA et al., 2014). Neste processo o óxido de etileno reage com monóxido de carbono em atmosfera de H₂, em presença de catalisador organometálico, para a formação de 3-hidroxipropionaldeído (3-HPA), o qual é hidrogenado a 1,3-PDO em seguida, em reação a 135 atm e 100°C.

A rota adotada pela Degussa-DuPont utilizava acroleína como matéria-prima e ocorria em duas etapas: na primeira etapa a acroleína era hidratada a 3-HPA, o qual era hidrogenado a 1,3-PDO em reação catalisada por níquel, a 135 atm e de 75 a 145°C, conforme representado pelas linhas azuis da Figura 3 (LEE et al., 2015b).

Outra rota química que leva à geração de 1,3-PDO é a hidrogenólise do glicerol, através da catálise dessa molécula a um intermediário catiônico, que é desidratado e, em seguida, hidrogenado em presença de catalisador organometálico. Durante as décadas de 1980 e 1990 as empresas Celanese e Shell empregavam essa rota, utilizando catalisadores homogêneos com Rh e Pd, a temperaturas entre 180 e 350°C e pressões variando entre 1 e 8 MPa (PRIYA SAMUDRALA, 2019).



Figura 3. Rotas de produção de 1,3-PDO a partir de óxido de etileno, acroleína ou glicerol. Em vermelho está representada a rota química utilizada pela Shell, em azul a rota química da Degussa-DuPont, em verde a via biotecnológica e em roxo a catálise de glicerol (LEE et al., 2015b; SILVA et al., 2014). Cabe destacar que os processos químicos são realizados em altas pressões e temperaturas, constituindo processos de elevada demanda energética.

Estes processos possuem inconvenientes, como a necessidade de alta pressão e temperatura, uso de catalisadores caros, formação de intermediários tóxicos e dependência de materiais não renováveis. Por outro lado, o 1,3-PDO também pode ser obtido por rota biotecnológica, em processo mais sustentável e inserido nos preceitos da bioeconomia.

O glicerol é o único substrato conhecido atualmente para a produção biológica de 1,3-PDO por organismos não modificados geneticamente (VIVEK et al., 2017a). A produção biológica deste composto orgânico é realizada principalmente por bactérias anaeróbias do gênero Clostridium, vastamente presentes no lodo anaeróbio (GALLARDO et al., 2014; GUNGORMUSLER et al., 2010; MOON et al., 2011). O 1,3-PDO produzido pela *Joint Venture* DuPont Tate & Lyle Bio Products tem como matéria-prima xarope de glicose de milho, porém o processo se baseia na conversão de glicose a glicerol (Figura 4) para posterior dismutação deste glicerol pela via redutiva até 1,3-PDO, por *E. coli* modificada (SILVA et al., 2014).



Figura 4. Conversão microbiológica de glicose a glicerol.

A empresa METEX já produzia 1,3-PDO por fermentação, porém utilizando OGM. A partir de 2021 será iniciada a produção deste álcool utilizando inóculo não modificado geneticamente. Foi anunciado o início das operações de uma planta para produção de 1,3-PDO e ácido butírico a partir de óleo de colza pela subsidiária METEX NOOVISTA. A METEX possui depósito de 12 patentes em diferentes países que protege o processo de mutações direcionadas e sequenciais de uma cepa de *C. acetobutylicum* sp e sua aplicação como inóculo para produção de 1,3-PDO e ácido butírico em alta concentração de glicerina, em torno de 120 g/L de glicerol (FIGGE, 2012).

Desta forma, existem diferentes estratégias para a produção de 1,3-PDO, onde as rotas biológicas se destacam pela utilização de matérias-primas renováveis, baixa demanda
energética e rendimentos mais elevados, tornando a produção biológica de 1,3-PDO economicamente mais atrativa. Vale destacar que no processo proposto nesse trabalho o 1,3-PDO é produzido de forma concomitante ao H₂, o que a princípio pode parecer uma desvantagem pela competição entre as vias oxidativa e redutiva vem sendo avaliado como uma oportunidade. A produção de 1,3-PDO através da fermentação do glicerol será abordada de forma mais completa na seção 3.5.4.

3.3. Metano

3.3.1. Características, aplicações e vias de produção do metano

O metano é um gás (ponto de fusão: -182°C; ponto de ebulição: -161°C) inodoro de fórmula química CH_4 e massa molar 16,04 g/mol. Seus limites de inflamabilidade são 4,4% e 17%, e sua temperatura de autoignição é 595°C. É um gás altamente energético, com poder calorífico inferior de 50 kJ/g.

Devido à sua densidade energética, o metano é um gás de grande interesse, com aplicações tanto industriais quanto residenciais. Este compõe mais de 70% (v/v) do gás natural (http://www.anp.gov.br/gas-natural), permitindo substituí-lo em suas aplicações como combustível doméstico, industrial ou automotivo, para geração de gás de síntese ou para sínteses de produtos químicos, fertilizantes e gás hidrogênio (U.S. ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION, 2020).

As tecnologias de produção de metano englobam a digestão anaeróbia de compostos orgânicos – via biotecnológica (BHARATHIRAJA et al., 2018), a gaseificação de materiais fósseis ou renováveis (ZHAO; XU; WANG, 2019; ZOU et al., 2019) – via termoquímica, e a tecnologia conhecida como *Power-to-gas* (HIDALGO; MARTÍN-MARROQUÍN, 2020) – via química. Tendo em vista a necessidade de se ter uma matriz energética cada vez mais sustentável, renovável e que utilize processos com baixa demanda energética, a produção de metano por via biotecnológica se destaca no cenário global atual.

3.3.2.Biogás e biometano

O produto gasoso obtido na digestão anaeróbia de materiais orgânicos é denominado biogás, contendo (v/v) entre 50% e 75% de CH₄, de 25% a 45% de CO₂ e pequenas quantidades de H₂(<1%), H₂S (20 – 20.000 ppm) e outros gases-traço (FRIEHE, J; WEILAND, P; SCHATTAUER, 2010). Na Figura 5 estão representadas as principais matériasprimas e o processamento para produção de biogás e biometano, além das aplicações destes.



Figura 5. Principais matérias-primas, processamento e aplicações de biogás e biometano no Brasil. Adaptado de (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BIOGÁS, [s.d.]). Outras matérias-primas orgânicas também podem ser utilizadas para geração de biogás e biometano nos próximos anos. O biometano certificado pela ANP pode ser misturado ao gás natural, tendo como principal vantagem a possibilidade de utilizar a estrutura logística existente.

O biometano certificado pode ser misturado ao gás natural e comercializado utilizando a rede de distribuição de gás canalizado já existente (gasodutos), ou então, na forma de gás comprimido (caminhões-feixe) (ANP, 2019). A qualidade do biometano é regulamentada por meio das resoluções ANP n° 8/2015, nº 685/2017 e nº 685/2017.

O interesse pela produção de biogás tem crescido exponencialmente no Brasil. Nos últimos 10 anos o número de usinas produtoras de biogás aumentou de 100, em 2009, para 550, em 2019; alcançando a potência instalada de 42,8 MW em 2020, capacidade suficiente para suprir 34,5% da demanda por energia elétrica ou 70% da demanda de diesel no país, de forma sustentável e renovável (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BIOGÁS, [s.d.]).

3.4. A glicerina residual do biodiesel e seu potencial como matéria-prima

A produção de biodiesel cresceu substancialmente nas últimas décadas em todo o mundo, movida pela busca por combustíveis mais sustentáveis e renováveis, capazes de gerar menos poluentes decorrentes tanto de sua queima quanto de seu processo produtivo e exploratório. Neste sentido, diversos países ao redor do mundo desenvolveram políticas públicas de incentivo ao uso e à produção de biodiesel. Nos Estados Unidos, maior produtor de biodiesel do mundo, motivados pela redução da dependência de petróleo estrangeiro e pela diminuição da emissão de gases do efeito estufa, foram produzidos 6,5 milhões de m³ de biodiesel em 2019 (EIA, 2020). O Brasil ocupa o posto de segundo maior produtor mundial de biodiesel, tendo produzido 5,9 milhões de m³ deste biocombustível em 2019 (ANP, 2020), fortemente influenciado pela obrigatoriedade de adição de biodiesel ao diesel a partir de 2008, no âmbito do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB).

O PNPB foi criado em 2004 com a finalidade de inserir o biodiesel na matriz energética brasileira, promovendo inclusão social e desenvolvimento regional (MME, 2020). No que tange ao fomento à produção de biodiesel, a adição de biodiesel ao diesel foi autorizada em 2004, na proporção de 2% (B2) em caráter facultativo. A adição obrigatória se iniciou em 2008, sob a lei 11.097/2005; a partir de então foram autorizadas misturas crescentes de biodiesel ao diesel, conforme apresentado na Figura 6. Atualmente, a mistura obrigatória é a B13, ou seja, 13% de biodiesel no diesel de petróleo (ANP,2021). Como consequência dessas adições obrigatórias crescentes a produção brasileira de biodiesel saltou de 736 m³ em 2005 para 5,9 milhões de m³ em 2019, diretamente acompanhada pela geração de glicerina - principal subproduto da indústria de biodiesel - como pode ser observado na Figura 6.



Figura 6. Produção brasileira de Biodiesel e geração de glicerina no período de 2005 a 2019, e misturas de biodiesel ao diesel (BX) facultativas ou obrigatórias neste período, no Brasil. Elaboração própria com os dados de ANP, 2020. ■Biodiesel (m³), --- Glicerina (m³), • Adição obrigatória (BX).

O biodiesel é produzido majoritariamente a partir de reação de transesterificação e/ou esterificação de triglicerídeos de ácidos graxos, respectivamente, presentes em óleos animais e vegetais (RESOLUÇÃO ANP № 45, DE 25.8.2014 - DOU 26.8.2014), com um álcool primário (geralmente metanol ou etanol). Nesta reação, além do biodiesel, é gerado um subproduto rico em glicerol, denominado glicerina, na proporção de 1 mol de glicerina para cada 3 mols de biodiesel, representando 10% em massa (JOHNSON; TACONI, 2007; POTT; HOWE; DENNIS, 2014). Na Figura 7 é apresentado um diagrama de blocos do processo de

produção de biodiesel via transesterificação de óleos vegetais, e geração de glicerina, principal processo realizado nas plantas produtoras de biodiesel no Brasil.



Figura 7. Diagrama de blocos da produção de biodiesel via transesterificação de óleos vegetais.

Apesar de conter elevados teores de glicerol em sua composição, a glicerina proveniente da produção de biodiesel não é facilmente assimilada pelo mercado do glicerol, em virtude da presença de resquícios de metanol (ou etanol), sabão, sais e ácidos graxos resultantes do processo de transesterificação (JOHNSON; TACONI, 2007; KONG et al., 2016).

A aplicação da glicerina nas indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêutica somente é possível mediante o refino e a purificação deste material, alcançando a pureza de 99,5% a 99,7% exigida pelas indústrias em questão (CIRIMINNA et al., 2014; SCHULTZ; DE

SOUZA; DAMASO, 2014). Segundo ISAHAK e colaboradores (2015), o menor custo de purificação da glicerina é de US\$ 0,15/kg, combinando neutralização, centrifugação, evaporação e destilação para recuperação do excesso de metanol.

Devido à grande produção de biodiesel, um excedente de glicerina é formado. Apenas em 2019, cerca de 650 mil m³ de glicerina foram gerados no Brasil (ANP, 2020); neste mesmo ano o Brasil exportou 430 mil toneladas de glicerina (COMEX STAT, 2020). Porém, o excesso de oferta pode desvalorizar a glicerina economicamente, tendo como consequências o desequilíbrio da balança comercial deste produto e o aumento do preço do biodiesel (ANITHA; KAMARUDIN; KOFLI, 2016; GARLAPATI; SHANKAR; BUDHIRAJA, 2016; QUISPE; CORONADO; CARVALHO, 2013).

Em virtude do aumento da oferta, o preço da glicerina sofreu desvalorização drástica nos últimos anos, conforme apresentado na Figura 8. Em 2019 o valor médio de exportação de glicerina bruta foi US\$ 0,16/Kg, 6,6 vezes menor que a média de preços praticada nos 5 anos que antecederam o PNPB (COMEX STAT, 2020).



Figura 8. Exportação brasileira de glicerol bruto ou purificado no período de 1999 a 2019 (COMEXSTAT, 2020). As barras indicam os valores em massa, enquanto as linhas indicam os valores negociados em dólar por quilo (US\$/Kg). Em 2004 o valor negociado de glicerol bruto foi US\$7,72/Kg. Glicerol purificado (massa), Glicerol bruto (massa), – glicerol purificado (preço), – glicerol bruto (preço).

Como a glicerina é comercializada, ela não pode ser considerada um resíduo, mas sim um subproduto da indústria de biodiesel. Devido à sua grande desvalorização, pode-se considerar a glicerina um produto de baixo valor agregado, embora possua grande potencial como matéria-prima. Neste cenário, o desenvolvimento de processos que utilizem a glicerina residual do biodiesel como matéria-prima é essencial. Uma vasta gama de produtos pode ser obtida a partir de glicerol, empregando glicerina como matéria-prima em processos químicos ou bioquímicos, como pode ser observado na Figura 9.



Figura 9. Glicerol como "bloco de construção" para diversos produtos. Fonte: Elaboração própria a partir das referências:(BAGHERI; JULKAPLI; YEHYE, 2015; GARLAPATI; SHANKAR; BUDHIRAJA, 2016; KONG et al., 2016).

Dentre as diversas aplicações da glicerina, os processos fermentativos se destacam por sua baixa demanda energética, sua versatilidade e por seu caráter sustentável, intimamente alinhado às diretrizes da Bioeconomia.

3.4.1.O aproveitamento biotecnológico da glicerina

O glicerol presente na glicerina residual do biodiesel é uma fonte de carbono muito promissora para processos biotecnológicos, visto que seu transporte para o interior das células microbianas é independente de energia. Tanto microrganismos aeróbios quanto microrganismos anaeróbios são capazes de metabolizar glicerol, tendo como resultado um amplo espectro de bioprodutos passíveis de produção a partir deste substrato.

O bioóleo, ou SCO (*single cell oil*), utilizado como matéria-prima alternativa aos óleos vegetais para produção de biodiesel pode ser sintetizado por microalgas e leveduras, a partir de glicerol (CHEN; WALKER, 2011; DOBROWOLSKI et al., 2016). Etanol pode ser produzido por bactérias, geneticamente modificadas ou não, e por leveduras utilizando glicerol como fonte de carbono (COFRÈ et al., 2011; STEPANOV; EFREMENKO, 2016; SUZUKI et al., 2015). Diversos ácidos orgânicos de interesse industrial, como ácido succínico, ácido propiônico, ácido cítrico, ácido glicérico e ácido lático são produzidos por bactérias mediante metabolismo de glicerol (VIVEK et al., 2017b). Polihidroxialcanoatos (PHAs), biopolímeros biodegradáveis, podem ser obtidos a partir de glicerol por bactérias (KOLLER et al., 2016). Outro produto de grande interesse industrial que pode ser obtido através da fermentação de glicerol por bactérias é o 1,3-PDO, vastamente empregado na fabricação de fibras sintéticas e poliésteres (WISCHRAL et al., 2015). Muitos destes produtos resultantes da fermentação do glicerol são produzidos concomitantemente à geração de biogás (H₂ + CH₄ + CO₂), que é um produto valioso devido à sua alta densidade energética (HE; MCNUTT; YANG, 2017).

As bactérias constituem o principal tipo de microrganismo capaz de metabolizar glicerol para a formação de produtos de interesse industrial, comercial e energético. Neste universo, um dos principais gêneros de bactéria empregados é o Clostridium. Bactérias deste gênero são reconhecidas por sua capacidade de produzir H₂, ácidos orgânicos e álcoois.

Uma possibilidade interessante para o aproveitamento biotecnológico da glicerina residual do biodiesel é a produção de hidrogênio. Neste processo, o gás de interesse, presente na fração gasosa é direcionado para diferentes fins, como reações de hidrocraqueamento de petróleo, reações de hidrogenação (indústrias de alimentos e cosméticos), produção de fertilizantes ou geração de energia através de células a combustível (RAMACHANDRAN, 1998). A fração líquida, designada efluente da produção de hidrogênio (EPH), é rica em diferentes produtos finais de fermentação, como 1,3-PDO e ácido butírico, que podem ser separados do meio agregando valor ao processo global de fermentação da glicerina (SARMA et al., 2015). Atenção especial deve ser dada ao 1,3-PDO, visto que este álcool de elevado valor de mercado somente é produzido quando glicerol é utilizado como substrato, reforçando o interesse na aplicação da glicerina como matéria-prima (VIVEK et al., 2017a).

A glicerina é um material viscoso, o que pode dificultar seu acesso ao interior das células microbianas. Neste sentido, o uso de surfactante no meio de fermentação/digestão anaeróbia leva à redução da viscosidade do meio e ao aumento do consumo de glicerol, conforme descrito por PACHAPUR e colaboradores (2016), que também observaram aumento da produção de H₂ em sistemas contendo Tween 80 como surfactante. Decorrente da geração de H₂ são formados dois principais co-produtos, os ácidos acético e butírico, que podem ser direcionados para a produção de metano por digestão anaeróbia, elevando o potencial de aproveitamento da glicerina residual do biodiesel.

3.4.2.Digestão anaeróbia de glicerol por organismos presentes em lodo anaeróbio de estação de tratamento de esgoto

O processo de digestão anaeróbia, como o nome sugere, ocorre na ausência de oxigênio, sendo mediado por microrganismos capazes de degradar matéria orgânica nestas condições. Em ausência de oxigênio as células podem utilizar aceptores de elétrons inorgânicos, como nitrato (NO_3^{-}), sulfato ($SO_4^{2^{-}}$) e carbonato ($CO_3^{2^{-}}$); a depender do aceptor final de elétrons diferentes produtos são gerados, como ácido nitroso/óxido nitroso/nitrogênio ($HNO_2/N_2O/N_2$), sulfeto de hidrogênio (H_2S) e metano (CH_4), respectivamente (TORTORA, FUNKE, 2012). Este tipo de processo ocorre naturalmente nos solos, pântanos, sedimentos de rios e fundos de lagos ou mares – ambientes tipicamente anaeróbios – mas também podem ser conduzidos em reatores, promovendo o tratamento

de efluentes com presença de matéria orgânica e geração de uma mistura de gases como resultado desta digestão (CHERNICHARO, 1997).

Lodos anaeróbios são vastamente empregados como inóculo para digestão anaeróbia, contudo culturas de microrganismos, puras ou mistas, também podem ser utilizadas neste tipo de processo. As principais vantagens de se utilizar os lodos anaeróbios provenientes de estação de tratamento de esgoto (ETE) são a fácil manipulação, não exigindo condição estéril durante o processo nem infraestrutura específica para manutenção e propagação do inóculo, impactando diretamente no custo global do processo; por serem consórcios naturalmente desenvolvidos são mais estáveis e adaptados a condições adversas; e possibilitam o uso de matérias-primas mais complexas, por conterem em sua composição uma ampla gama de microrganismos que variam desde hidrolíticos até metanogênicos (DE SÁ et al., 2013; FALOYE; GUEGUIM KANA; SCHMIDT, 2014; WANG; WAN, 2008; WONG; WU; JUAN, 2014).

A utilização de lodos anaeróbios como inóculo para o processo de digestão anaeróbia envolve a atuação dos diferentes microrganismos ali presentes sobre os diferentes substratos que constituem a matéria-prima. De forma geral, a digestão anaeróbia de compostos orgânicos ocorre em 4 etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, onde em cada etapa uma classe de microrganismo presente no lodo anaeróbio exerce seu protagonismo, conforme ilustrado na Figura 10 (SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO S., 2014). A matéria orgânica é metabolizada em moléculas menos complexas, resultando na geração de CH₄ e CO₂ ao final do processo.

O processo de digestão de matéria orgânica se inicia com a hidrólise de moléculas maiores, como particulados, fibras e polímeros, geralmente catalisada por enzimas secretadas por bactérias hidrolíticas, e resulta em moléculas menores, solúveis e permeáveis nas membranas celulares (CHERNICHARO, 1997; PATINVOH et al., 2017).

Como o glicerol é uma molécula simples, a etapa de hidrólise não ocorre durante sua digestão anaeróbia, a qual é iniciada diretamente na etapa de acidogênese, tornando o processo mais rápido quando comparado à digestão de matérias-primas mais complexas.



Figura 10. Etapas da digestão anaeróbia de matérias orgânicas por lodo anaeróbio. Adaptado de SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO S., 2014.

Os compostos solúveis resultantes da etapa de hidrólise são metabolizados no interior de células bacterianas, como as dos gêneros Clostridium e Enterobacter (HUNG; CHANG; CHANG, 2011; RUGGERI; TOMMASI; SANFILIPPO, 2015), durante a etapa denominada acidogênese. Os produtos da acidogênese são H₂, CO₂, ácidos orgânicos voláteis (principalmente ácido acético e ácido butírico) e alcoóis de cadeia curta (SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO S., 2014), os quais são excretados pelas bactérias.

Os produtos gerados durante a acidogênese são consumidos na próxima etapa de digestão, seja durante a acetogênese, seja durante a homoacetogênese, com o objetivo de fornecer as moléculas orgânicas na forma adequada para o consumo pelas arqueias metanogênicas acetoclásticas na etapa final do processo de digestão. A acetogênese consiste na geração de ácido acético a partir do consumo de açúcares, da oxidação de álcoois ou pela degradação de ácidos graxos, sendo resultante do metabolismo das bactérias acetogênicas heterotróficas (BUNDHOO; MOHEE, 2016; SAADY, 2013). Na homoacetogênese ocorre o consumo de H₂ e CO₂, gerados na acidogênese, para síntese de ácido acético, pela ação de bactérias homoacetogênicas autotróficas (SAADY, 2013).

Por fim, na etapa final da digestão anaeróbia, as arqueias metanogênicas atuam sobre as moléculas restantes no meio para sua transformação em CH₄ e CO₂. Com o desprendimento desses gases, há grande redução da demanda química de oxigênio do meio, e por isso o processo de digestão anaeróbia é amplamente empregado no tratamento de esgoto e efluentes (CHERNICHARO, 1997).

No Quadro 3, constam os principais organismos metanogênicos, os principais substratos utilizados por cada um deles e as respectivas reações de metanogênese.

Quadro 3. Substratos e reações de metanogênese de acordo com diferentes tipos de organismos (SERRANO-SILVA et al., 2014; TAKAI, 1970).

Organismo	Substratos	Reação
Arqueia hidrogenotrófica	H ₂ e CO ₂	$4 H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2 H_2O$
Arqueia formatotrófica	ácido fórmico	4 HCOOH → CH ₄ + 3 CO ₂ + 2 H ₂ O
Arqueia acetoclástica	ácido acético	$CH_3COOH \rightarrow CO_2 + CH_4$
Arqueia metanogênica	Ácido butírico	2 CH ₃ CH ₂ CH ₂ COOH + 2 H ₂ O + CO ₂ → 4 CH ₃ COOH + CH ₄

Paralelamente à metanogênese, podem ocorrer reações de redução de nitrato e sulfato, mediadas por bactérias redutoras de nitrato autotróficas e bactérias redutoras de sulfato hidrogenotróficas, respectivamente. Essas reações ocorrem na presença dos íons nitrato ou sulfato, tendo como agente redutor – doador de elétron – o H₂ presente no meio, gerado na acidogênese. Os produtos gerados nas reações de redução em meio aquoso são geralmente H₂S e amônia (BUNDHOO; MOHEE, 2016), as reações de redução de nitrato a nitrito e de sulfato a sulfito estão representadas nas reações 1 e 2, a seguir (GONZÁLEZ et al., 2006; MIZUNO; LI; NOIKE, 1998):

$$O_3^- + H_2 \Leftrightarrow NO_2^- + H_2O(1)$$

$$4 H_2 + SO_4^- + H^+ \Leftrightarrow HS^- + 4 H_2O$$
 (2)

De forma geral, ao final da digestão anaeróbia a matéria orgânica é convertida em células microbianas – que permanecem na fase líquida – e biogás (CH₄/CO₂/H₂S) – que se desprende para a fase gasosa. Como há desprendimento de carbono da fase líquida para a fase gasosa, há redução da demanda química de oxigênio no meio digerido.

3.5. Obtenção de H₂ e 1,3-propanodiol utilizando glicerol como fonte de carbono e lodo anaeróbio de ETE como inóculo

Pode-se observar que ao longo do processo de digestão anaeróbia de glicerol pelos organismos presentes no lodo anaeróbio de ETE existem tanto etapas de produção de H₂ (acidogênese) quanto de consumo deste gás (metanogênese, homoacetogênese e reações de redução de nitrato/sulfato), como pode ser observado de forma geral na Figura 10. Para que haja acúmulo de H₂ ao final da fermentação realizada por lodo anaeróbio, é necessário que as etapas envolvidas no seu consumo sejam evitadas ou inibidas. Quanto à produção de 1,3-PDO, as arqueias metanogênicas são capazes de oxidá-lo a CH₄ e CO₂, portanto é necessário que se eliminem estes microrganismos do inóculo para que haja acúmulo também deste produto no meio de fermentação.

3.5.1.Controle da metanogênese

As arqueias metanogênicas hidrogenotróficas consomem H_2 e CO_2 para formação de CH_4 , resultando no esgotamento do H_2 produzido pelas bactérias acidogênicas. Portanto, é necessário que a ação destas arqueias seja evitada.

Alguns gêneros de bactérias produtoras de H₂, como Clostridium, têm a capacidade de formar endosporos quando submetidos a condições hostis, ao contrário das arqueias metanogênicas que não resistem a condições ambientais desfavoráveis. Endosporos são estruturas dormentes que se formam dentro das células bacterianas, de modo a proteger

suas organelas vitais e promover a resistência microbiana em ambientes adversos (TORTORA GJ, FUNKE BR, 2012).

Os pré-tratamentos do lodo se baseiam em submeter o lodo a condições severas (de temperatura, pH, tensão de oxigênio, presença de substâncias tóxicas ou inibidoras de metabolismo, por exemplo (WANG; WAN, 2008)) com a finalidade de estimular a esporogênese bacteriana e a inibição das arqueias consumidoras de H₂. Assim, quando expostos a um ambiente favorável, os endosporos podem se reidratar e as bactérias retomam seu metabolismo natural (Figura 11), enquanto as arqueias metanogênicas não possuem esta capacidade, sendo eliminadas total ou parcialmente. Desta forma, após o pré-tratamento o lodo anaeróbio fica enriquecido em bactérias formadoras de endosporos (BUNDHOO; MOHEE; HASSAN, 2015a), não havendo consumo de H₂ pelas arqueias metanogênicas hidrogenotróficas.



Figura 11. Esquema representativo do processo de esporogênese. Em ambiente favorável a célula se mantém integra, porém se este ambiente se torna desfavorável, inicia-se o processo de esporogênese para proteção das organelas vitais para a célula. Quando o ambiente é novamente favorável, a célula se reidrata voltando à atividade metabólica. Elaboração própria.

Existem diversas estratégias descritas na literatura para promover a inibição das arqueias metanogênicas, incluindo métodos físicos e químicos (GHIMIRE et al., 2015; KUMARI; DAS, 2016). Segundo WANG; YIN (2017) os tipos de pré-tratamento mais investigados na literatura são o térmico e os baseados em alterações de pH, sejam ácidos ou alcalinos. No Quadro 4 estão apresentadas diferentes metodologias de pré-tratamento de lodo anaeróbio e os aumentos obtidos na produção de H₂, em relação ao emprego de inóculo sem pré-tratamento.

Quadro 4. Diferentes metodologias de pré-tratamento do lodo anaeróbio para produção de H₂, e os ganhos alcançados frente ao uso de inóculos não submetidos a pré-tratamento (controle).

Tipo de pré-tratamento	Fonte de carbono	Condições Experimentais	Ganho ⁽¹⁾	Referência
Térmico		90°C; 10min.	250%	
Ácido	Glicerina	pH 3; 24h	150%	viana et
Adição de clorofórmio		0,05% (v/v)	425%	al., 2019
Térmico	Efluente de cultura de camarão marinho	70°C; 30 min.	380%	WANG et al., 2018
Térmico		100°C; 15min.	100%	
Ácido		pH 3; 24h	27%	YIN; HU;
Alcalino	Glicose	pH10; 24h	125%	WANG,
Radiação ionizante Gama		5 kGy; 3,6x10 ¹⁴ Bq; 286 Gy/min	194%	2014
Térmico		100°C; 1h	33%	
Ultrassônico	hidrolicado	400 W; 25,000 Hz; 15 min	38%	ZHANG,
Ultravioleta	de milho	25 W; 15 min	-6%	MANG
Ácido		pH 3; 24h	19%	2014
Alcalino		pH 12; 24h	5%	2014
Microondas	Glicose	pH 11; 2 min.; 860 W	32%	FALOYE; KANA; SCHMIDT, 2014
Térmico		100°C; 60 min.	101%	DE SÁ ot
Ácido	Sacarose	pH 2; 60 min.	54%	DE 3A EL
Alcalino		pH 12; 60 min.	71%	
Térmico		90°C; 30min.	84%	CHAGANTI;
Ácido	Glicoso	pH 3; 24h	95%	KIM;
Alcalino	Gilcose	pH 11; 24h	82%	LALMAN,
Adição de ácido linoleico		2 g/L	121%	2012

Térmico		105°C; 45min.	543%		
Ácido		pH 3; 24h	686%		
Alcalino	Glicose	pH 12; 24h	493%	PENDYALA	
Adição de sacarose		80 g _{DQO} /L; 200 rpm; 2 dias	-86%	et al., 2012	
Adição de ácido linoleico		2 g/L	736%		
Adição de BESA ⁽²⁾		50mM	779%		
Térmico		95°C; 30min.	213%		
Ácido		pH 3; 24h	424%		
Alcalino	Clicoso	pH 10; 24h	346%	CHANG; LI;	
Aeração	Gilcose	ar; 24h	125%	LIU, 2011	
Adição de Clorofórmio		1%; 24h	61%		
Adição de BES ⁽³⁾		10 mM; 24h	-11%		
Térmico		100°C; 15min.	339%		
Calor seco (estufa)		105°C; 2h + 2h dessecador	161%		
Ácido	Glicerina	pH 3,0; 24h	-59%	al 2011	
Alcalino		pH 10,0; 24h	-98%	al., 2011	
Choque térmico		-10°C; 24h / 30°C; 6h	12%		
Térmico		100°C; 15min.	228%		
Ácido		pH 3; 24h	47%	WANG	
Alcalino Glicose		pH 10; 24h	92%		
Aeração		ar; 24h	22%	WAN, 2008	
Adição de Clorofórmio		2%, 24h	-19%		

⁽¹⁾Ganho: aumento da produção ou do rendimento em H_2 em comparação com o controle (sem tratamento). ⁽²⁾BESA: ácido 2-bromo etano sulfônico

⁽³⁾BES: 2-bromo etano sulfonato

3.5.2.Controle da homoacetogênese

Bactérias homoacetogênicas utilizam a via de Wood–Ljungdahl (Figura 12), ou via redutora da acetil coenzima A, para sintetizar acetato a partir de CO_2 utilizando H_2 como doador de elétrons. Esta via pode ser representada pela reação 3 (RAGSDALE; PIERCE, 2008).

$$2 CO_2 + 4 H_2 \Leftrightarrow CH_3 COO^- + H^+ + 2 H_2 O \quad (3)$$

De acordo com SAADY (2013) a homoacetogênese é responsável pelo de consumo de 11% a 43% do H₂ presente em reatores operados em regime de batelada simples e bateladas sequenciais, respectivamente. As bactérias homoacetogênicas são estritamente anaeróbias, sobrevivem em ampla faixa de temperatura e muitas delas possuem a capacidade de formar endosporos, o que torna o controle da homoacetogênese mais complicado.



Figura 12. Via de Wood-Ljungdahl (via redutora da acetil Co-A). CFeSP: proteína de ferro-enxofre metiltransferase; CODH: monóxido de carbono desidrogenase. Adaptado de: Yikrazuul - Own work, CC BY-SA 3.0, <u>https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=5622492</u>.

Como o controle da homoacetogênese não pode ser realizado a partir da inibição das bactérias homoacetogênicas, muitos autores têm descrito metodologias alternativas como o controle cinético, o controle termodinâmico, o controle da agitação e a retirada de CO₂ do *headspace* (WOOSHIN PARK, SEUNG H. HYUN, SANG-EUN OH, BRUCE E. LOGAN, 2005), porém ainda é difícil identificar e quantificar a homoacetogênese, visto que o consumo de H₂ ocorre concomitantemente à sua produção.

PAUSS e colaboradores (1990) demonstraram que em reatores biológicos, independentemente do tipo de alimentação realizada, há grande limitação na transferência de massa de H₂, podendo acarretar uma superconcentração deste gás no meio líquido, porém o oposto ocorre com o CO₂. Como o aumento da agitação promove a melhoria da transferência de massa, aumentando a taxa de produção de H₂ e a liberação deste gás do meio líquido para o meio gasoso, esta é uma estratégia para a redução da ocorrência de homoacetogênese a curto prazo (FONTES LIMA; ZAIAT, 2012), porém a longo prazo pode haver ressolubilização de H₂ e CO₂ no meio devido ao aumento da pressão interna do reator, principalmente em reatores batelada. Neste sentido, a retirada de biogás do reator constitui uma das possibilidades para o controle da homoacetogênese. CHANG e colaboradores (2012) avaliaram três diferentes metodologias de retirada de gás do *headspace* e notaram um aumento de 5 vezes na produção de H₂ quando o gás foi retirado continuamente, seguido de absorção do CO₂ em solução de NaOH 1M, o que foi relacionado à supressão da homoacetogênese.

Em uma abordagem diferente, LIU e colaboradores (2020) avaliaram uma ampla faixa de pH (4 – 11) e relacionaram com a abundância de espécies, concluindo que pH 5 é o ideal para reduzir o consumo de H₂ via homoacetogênese, enquanto em pH 7 - 8 ocorre o contrário. Em estudo recente WANG e colaboradores (2020) mostraram a eliminação de bactérias homoacetogênicas do gênero Acetobacterium através da adição de clorofórmio e obtiveram um aumento de cerca de 4 vezes no volume de H₂ produzido.

Em processo contínuo, CAROSIA e colaboradores (2021) mostraram que as relações C/N e C/P de 100 - 200 e 300, respectivamente favorecem o processo fermentativo para geração de H₂, ácido acético e etanol; além disso o tempo de retenção hidráulica (HRT) também interfere na produção e no consumo do H₂, onde menores valores de HRT acarretam maiores produções de H₂ e predominância de bactérias *Ethanoligenens* sp. e *Clostridium* sp.

3.5.3.Controle das reduções de nitrato e sulfato

As reduções de nitrato e sulfato a nitrito e sulfito são realizadas por bactérias redutoras de nitrato e sulfato, respectivamente. Estas bactérias, presentes na população microbiana de lodo anaeróbio, utilizam hidrogênio como doador de elétrons, competindo com as bactérias produtoras de H₂ e levando à depleção deste gás no meio de fermentação (BUNDHOO; MOHEE, 2016).

Concentrações de sulfato acima de 3 g/L foram relatadas como suficientes para promover a competição entre bactérias produtoras de H₂ e bactérias redutoras de sulfato em populações mistas, resultando na diminuição do H₂ acumulado no reator em até 90% enquanto em culturas puras, não há relatos de redução da produção de H₂ decorrente da presença de sulfato (CHEN; YIN; WANG, 2021; ELBESHBISHY et al., 2017).

A adição de nitrato também impacta a produção de H_2 negativamente, podendo levar a nenhuma produção de H_2 em meio contendo 4 g/L de nitrato e glicose como fonte de carbono (LEE et al., 2015c).

As reações de redução de nitrato/sulfato podem ser evitadas através da não disponibilização destes íons no meio fermentativo (SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO S., 2014). Outra abordagem é o ajuste do pH para valores menores que 6, apontados como inibitórios para essas bactérias (CHEN; YIN; WANG, 2021).

3.5.4. Vias metabólicas envolvidas na acidogênese a partir de glicerol

O metabolismo do glicerol por bactérias do gênero Clostridium (Figura 13) se divide em duas vias – redutora (em laranja) e oxidativa (em verde).



Figura 13. Rota Metabólica de glicerol em *Clostridium* spp e enzimas envolvidas nas vias redutora (em laranja) e oxidativa (em verde), incluindo os principais metabólitos com interesse biotecnológico. Fonte: Elaboração própria a partir das referências: (DE SÁ et al., 2013; JOHNSON; TACONI, 2007; KUBIAK et al., 2012; SAINT-AMANS, GIRBAL, ANDRADE, 2001).

 Glicerol desidratase (GDHt); 2. 1,3-propanodiol oxidoredutase (PDOR); 3. Glicerol desidrogenase (GDH); 4. Dihidroxiacetona quinase; 5. Triosefosfato isomerase; 6. Glicoquinase; 7. Succinato desidrogenase; 8. Piruvato quinase; 9. D-lactato desidrogenase; 10. Piruvato-ferredoxina oxidoredutase; 11. Hidrogenase; 12. NADH-ferredoxina oxidoredutase; 13. NADPH-ferredoxina oxidoredutase; 14. Fosfotransacetilase; 15. Acetato quinase; 16. Tiolase; 17. Butiril-CoA desidrogenase; 18. Fosfotransbutilase; 19. Butirato quinase; 20. Acetaldeído desidrogenase; 21. Etanol desidrogenase; 22. Butiraldeído desidrogenase; 23. Butanol desidrogenase. Na via oxidativa, o glicerol sofre diferentes reações até a geração de fosfoenolpiruvato, NADH e ATP. O fosfoenolpiruvato é convertido em piruvato, que por sua vez vai a acetil-CoA, levando à redução da ferredoxina (Fd) (piruvato + CoA + Fd_{ox} \leftrightarrow acetil-CoA + CO₂ + Fd_{red}) (NTAIKOU; ANTONOPOULOU; LYBERATOS, 2010). A ferredoxina reduzida fornece elétrons para as enzimas hidrogenases, que catalisam a reação de formação de H₂ (2H⁺ + 2e⁻ \leftrightarrow H₂) (DE SÁ et al., 2011). Os produtos finais da conversão de acetil-CoA são os ácidos acético e butírico. Desta forma, a produção de H₂ é associada às produções de ácido acético e ácido butírico, durante a etapa denominada acidogênese.

Estequiometricamente, o rendimento máximo de H₂ é associado à produção de ácido acético correspondendo a 3 mol_{H2}/mol_{glicerol}, enquanto o rendimento associado à produção de ácido butírico é 2 mol_{H2}/mol_{glicerol}, de acordo com as reações a seguir (PACHAPUR et al., 2015):

 $C_3H_8O_3 + H_2O \rightarrow C_2H_4O_2 + CO_2 + 3 H_2$ (4)

$$C_3H_8O_3 \rightarrow \frac{1}{2}C_4H_8O_2 + CO_2 + 2H_2$$
 (5)

A via redutora consiste em apenas duas etapas, porém depende da ação de três enzimas. Na primeira etapa da via redutora, e também a etapa limitante deste metabolismo (LIU et al., 2016), o glicerol é desidratado a 3-HPA sob ação da enzima GDHt (glicerol desidratase). Esta enzima pode ser independente ou dependente de vitamina B12; inativada ou não por glicerol; sensível ou não a oxigênio (JIANG et al., 2016). Geralmente, as enzimas GDHt de organismos produtores de 1,3-PDO naturalmente ocorrentes são dependentes de vitamina B12; apesar de estimular a produção de 1,3-PDO, a adição de vitamina B12 não é um fator limitante para o processo, pois alguns organismos são capazes de sintetizar esta vitamina (LIU et al., 2016), mas para isso necessitam da presença de íons cobalto no meio (HUANG; GONG; TSAO, 2002). A presença de íons K⁺ no sítio ativo da enzima GDHt possui papel importante para a desidratação do glicerol, pois mantém o substrato na posição e na orientação adequadas e também aumenta a energia de ligação do mesmo (LIU et al., 2016; YAMANISHI et al., 2002).

Como a GDHt pode ser inibida por seu produto (3-HPA), é importante que a segunda etapa da via redutora ocorra, pois envolve a redução do 3-HPA em 1,3-PDO

catalisada pela enzima PDOR (1,3-propanodiol oxidoredutase). PDOR é ativada na presença de íons metálicos, como Fe²⁺ e K⁺ (JIANG et al., 2016). A PDOR é uma álcool desidrogenase Fe-NAD dependente, logo utiliza o NADH produzido na primeira etapa da via oxidativa, e por isso a enzima GDH (glicerol desidrogenase), que converte glicerol a dihidroxiacetona (DHA), é importante para o bom funcionamento da via redutora, mesmo fazendo parte da via oxidativa. As enzimas PDOR e GDH dependem uma da outra, para que o balanço redox seja mantido (Figura 14).



Figura 14. Enzimas envolvidas no balanço redox do metabolismo de glicerol. As enzimas envolvidas na via redutora e oxidativa são: 1: GDHt; 2: PDOR; 3: GDH. O balanço redox NAD⁺/NADH é mantido pelas enzimas PDOR – da via redutora – e GDH – da via oxidativa.

O NADH gerado na via oxidativa alimenta preferencialmente a via redutora, que culmina na produção de 1,3-PDO (SARMA et al., 2017); mas também pode ser consumido para produção de etanol, butanol, succinato, lactato e propionato (Figura 13). Desta forma, ao final da fermentação para produção de H₂, resta um efluente rico em ácidos orgânicos, alcoóis e 1,3-PDO (SARMA et al., 2015).

A grande vantagem da coprodução de H₂ e 1,3-PDO é a diferença entre os estados físicos dos dois produtos. Ao final do processo o H₂ encontra-se na fração gasosa, enquanto o 1,3-PDO permanece na fase líquida, fisicamente separados. De toda forma, o 1,3-PDO precisa ser separado dos demais produtos finais de fermentação, como ácidos orgânicos e alcoóis. Contudo, a etapa de separação do 1,3-PDO proveniente de rota biológica pode representar de 50 a 70% do custo global do processo (XIU; ZENG, 2008). A recuperação do 1,3-PDO pode ser dificultada devido às baixas concentrações do produto no meio, ao caráter hidrofóbico do 1,3-PDO e ao elevado ponto de ebulição do mesmo. Os principais métodos de

separação de 1,3-PDO de meios fermentados são evaporação, destilação, filtração com membrana, pervaporação, cromatografia de troca iônica, extração liquido–liquido, extração reativa e *salting-out* (HERMANN; PATEL, 2007; WISCHRAL, 2016; XIU; ZENG, 2008).

Na Figura 15 está representado o processo de produção de H₂ e 1,3-PDO quando se emprega glicerina como matéria-prima e lodo anaeróbio de ETE como inóculo, conforme proposto nesta pesquisa.



* Principais produtos gasosos.

Figura 15. Representação esquemática do processo de produção de H₂ e 1,3-PDO empregando-se glicerina como matéria-prima e lodo anaeróbio de ETE como inóculo.

O segundo princípio da Química Verde, denominado Economia de Átomos, sinaliza sobre a necessidade de minimização da geração de resíduos através da incorporação do maior número de átomos dos reagentes no produto final. A utilização da glicerina para geração de H₂ possibilita a incorporação de apenas 6 átomos de H dos 8 presentes no substrato em questão, considerando o rendimento máximo teórico, sem nenhuma incorporação dos átomos de carbono e oxigênio também presentes na molécula de glicerol, totalizando a incorporação de apenas 42,8% dos átomos da molécula precursora no produto final. Além disso, com maior utilização dos átomos constituintes da matéria-prima nos produtos finais, o efluente do processo provoca menor impacto ambiental. Uma maneira de se aproveitar melhor os átomos da molécula de glicerol é através da utilização do EPH como matéria-prima para a geração ou a recuperação de outros produtos de interesse, como o metano. Neste caso há incorporação do carbono no gás, resultando na redução da DQO do

efluente, que pode ser tratado de forma mais simples antes da sua destinação em corpos hídricos.

3.6. Produção de metano utilizando o efluente da produção de H₂ como matériaprima

O metano é um gás de grande interesse energético com aplicações tanto industriais quanto residenciais, que pode contribuir para a diversificação da matriz energética brasileira de maneira sustentável. O biometano pode ser misturado ao gás natural e comercializado utilizando a rede de distribuição de gás canalizado já existente, ou então, na forma de gás comprimido.

Uma alternativa promissora para o aproveitamento do efluente da produção de H₂ é o emprego deste, como matéria-prima, para a produção de CH₄. Desta forma, os ácidos acético e butírico podem ser convertidos ao gás de interesse, mediante digestão anaeróbia completa, sob ação das arqueias metanogênicas acetoclásticas. Neste processo, o ácido acético é convertido a metano por ação das arqueias acetoclásticas, enquanto o ácido butírico é convertido a metano e ácido acético por arqueias metanogênicas utilizando CO₂ como aceptor de prótons (vide Quadro 3); o ácido acético gerado pode ser convertido novamente a metano, pela via anterior (TAKAI, 1970).

A partir de populações microbianas mistas, como o lodo anaeróbio oriundo de ETE, de 70 a 90% do metano é produzido via acetato e apenas 10 a 30% via H₂/CO₂ e/ou formato (SERRANO-SILVA et al., 2014). Ou seja, o processo de produção de CH₄ sequencial à produção de H₂ resulta em uma pequena perda de produção em relação à produção direta de CH₄, porém com grande ganho energético devido à geração de H₂. Além disso, a produção de metano leva à redução da demanda química de oxigênio (DQO), promovendo o tratamento do efluente da produção de H₂. Ao final deste processo restam o lodo anaeróbio residual, o qual pode ser utilizado como fertilizante (quando devidamente processado para o devido fim) ou enviado para aterros sanitários (como é feito nas ETE), e o efluente com DQO reduzida, o qual demanda apenas um polimento antes de poder ser despejado em corpos hídricos, desde que atenda às resoluções ambientais vigentes. Na Figura 16 encontra-se representado o processo sequencial para produção de H_2 e CH_4 a partir de glicerina e utilizando lodo anaeróbio de ETE como inóculo.



Figura 16. Representação esquemática do processo de produção sequencial de H₂ e CH₄ empregando-se glicerina como matéria-prima e lodo anaeróbio de ETE como inóculo. DQO_R: DQO residual

Assim sendo, o processo sequencial para produção de H₂ e CH₄ a partir de glicerina engloba utilização de matéria-prima renovável, aproveitamento de resíduo industrial, tratamento de efluente, economia de átomos e eficiência energética, em um processo renovável e sustentável.

3.7. A produção sequencial de H₂ e CH₄ e a política de descarbonização

A Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio), criada do âmbito do cumprimento das metas brasileiras no Acordo de Paris, tem como principais objetivos a expansão dos biocombustíveis no Brasil e a redução das emissões de gases causadores do efeito estufa, tendo metas anuais de descarbonização e emissão de créditos de descarbonização (CBIOs) para tal (Lei nº 13.576/2017). Para o cálculo dos CBIOs, de um determinado biocombustível, são considerados a matéria-prima utilizada e a redução de GEE

decorrentes da queima, em comparação com o substituto fóssil daquele biocombustível, em toneladas de CO₂ equivalente.

Neste cenário a produção de biodiesel tende a crescer, em substituição ao diesel de petróleo, disponibilizando mais glicerina ao mercado. Por constituir um produto de baixo valor agregado, a utilização desta glicerina como matéria-prima para a produção de outros biocombustíveis, como o H₂ e o CH₄, torna-se ainda mais atrativa.

O H₂ proveniente de fonte renovável, como a glicerina, pode ser enquadrado tanto na utilização de matéria-prima renovável, quanto na redução da emissão de GEE, visto que sua combustão gera apenas vapor d'água e energia como produtos. Desta forma, a produção biológica de H₂ ganha mais uma vantagem frente aos demais processos. Como os CBIOs podem ser comercializados na bolsa de valores, o custo global do processo sofre redução. Esta redução pode ser ainda maior se a produção de H₂ for associada à produção de CH₄, sequencialmente. Isto porque o CH₄ também gera CBIOs, devido à sua matéria-prima residual (efluente da produção de H₂). Assim sendo, o presente trabalho traz uma abordagem biotecnológica relevante para a cadeia produtiva do biodiesel com claras vantagens econômicas e ambientais. É importante destacar que as características produtivas do Brasil, com grande foco no agronegócio, abrem diferentes oportunidades similares. Dessa forma, o correto investimento e a aplicação de uma visão estratégica nesta temática podem trazer além dos ganhos ambientais e econômicos, desenvolvimento regional e humano.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Na Figura 17 estão esquematizadas as principais informações sobre cada etapa do desenvolvimento experimental desta tese, e o principal produto obtido em cada uma delas.



Figura 17. Representação simplificada das etapas desta pesquisa.

4.1. Glicerina residual da produção de Biodiesel

A glicerina residual do processo de produção de biodiesel, utilizada como matériaprima neste trabalho, foi gentilmente cedida pela empresa ADM do Brasil (unidade Rondonópolis/MT). Trata-se, portanto, de um subproduto industrial real. Poucas informações acerca do processo industrial foram fornecidas pela empresa; sabe-se que se trata de uma glicerina loira, como pode ser observado na Figura 18. Os resultados da caracterização da glicerina estão contidos no item 5.1.



Figura 18. Glicerina residual do processo de produção de biodiesel, fornecida pela ADM do Brasil (Rondonópolis/MT).

4.2. Lodo anaeróbio

4.2.1.Origem e características do lodo anaeróbio

O lodo anaeróbio, utilizado como inóculo neste trabalho, foi coletado em uma estação de tratamento de esgoto (ETE) localizada na cidade do Rio de Janeiro/RJ (Figura 19 e Figura 20), que utiliza o processo de lodos ativados e promove os tratamentos primário e secundário do esgoto urbano.

Foram coletados dois lotes de lodo, contendo lodo oriundo do digestor anaeróbio e/ou do adensador, conforme indicado na Figura 19, de acordo com as seguintes proporções:

Lote A: 1/3 adensador; 2/3 digestor (v/v)



> Lote B: 100% adensador

Figura 19. Fluxograma típico de um sistema de lodos ativados convencional (SPERLING, 2002)(A) e locais de coleta do lodo anaeróbio de ETE: adensador (B) e digestor (C).



Figura 20.Lodo anaeróbio coletado em uma ETE (Rio de Janeiro/RJ).

O volume de lodo utilizado como inóculo foi tal que fornecesse 7,5 g/L de sólidos suspensos voláteis (SSV), um indicador indireto da matéria orgânica contida no lodo que, neste caso, representa o teor de células microbianas no mesmo.

O inóculo empregado para produção de H₂ foi composto por lodo anaeróbio prétratado, enquanto o inóculo para a produção de CH₄ foi o lodo anaeróbio *in natura*.

O pré-tratamento do lodo anaeróbio tem a finalidade de inibir a ação das arqueias metanogênicas, consumidoras de H₂. Foram investigados dois tipos de pré-tratamento: ácido e térmico, conforme descrito nas seções seguintes (4.2.2 e 4.2.3).

4.2.2. Pré-tratamento ácido do lodo anaeróbio

Adicionou-se HCl 10 mol/L ao lodo anaeróbio até que o pH do mesmo alcançasse o valor de 2,0. O lodo anaeróbio foi mantido em pH 2,0 sob agitação constante por 60 minutos, após este período adicionou-se NaOH 5 mol/L até que o pH atingisse o valor de 5,5 (DE SÁ et al., 2013).

4.2.3. Pré-tratamento térmico do lodo anaeróbio

Submeteu-se o lodo anaeróbio à temperatura de 65°C por 30 minutos (BAGHCHEHSARAEE et al., 2008). O pré-tratamento foi conduzido em frasco fechado, em

banho-maria e sob agitação magnética constante (Figura 21). As rampas de aquecimento (~15°C – 65°C) e resfriamento (65°C – 35°C) duraram, em média, 10 minutos. Após o resfriamento o pH do lodo foi ajustado para 5,5, utilizando as soluções de HCl 10 mol/L e/ou NaOH 5mol/L.



Figura 21. Pré-tratamento térmico do lodo anaeróbio. Utilizou-se frasco fechado para evitar a perda de água, termômetro acoplado à tampa para controle da temperatura, banho-maria e agitação magnética para garantir homogeneidade de temperatura.

4.3. Seleção do lote de lodo anaeróbio

Inicialmente, ambos os lotes de lodo anaeróbio coletados foram submetidos a um pré-tratamento ácido. Em seguida, os lodos anaeróbios pré-tratados foram aclimatados em estufa a 35°C por tempos variados, em frasco fechado e sem agitação. Após aclimatação o lodo foi empregado como inóculo em ensaio fermentativo para produção de H₂, em meio contendo 1 g/L de glicerol proveniente da glicerina. A quantidade de lodo anaeróbio adicionada ao meio de fermentação foi calculada com base nos sólidos suspensos voláteis

(SSV), de forma a se alimentar o reator com 7,5 g_{SSV}/L. Estes ensaios foram realizados em triplicata, em frascos de penicilina de 100 mL, contendo 90 mL de meio reacional (Figura 22). Após a adição dos componentes do meio de fermentação (lodo anaeróbio pré-tratado, glicerina e água) e do ajuste do pH a 6,0, os frascos foram purgados com N₂ por 45 s a fim de se garantir um ambiente anaeróbio. Os frascos foram lacrados e encubados a 35°C e 160 rpm por 24 h. Foi realizado um experimento controle tendo como inóculo o lodo anaeróbio não pré-tratado.



Figura 22. Frasco de penicilina utilizado nos experimentos de fermentação. Volume total: 100 mL, volume de meio: 90 mL.

Adicionalmente, foi realizado o acompanhamento da produção de H₂ ao longo do tempo, tendo os lodos anaeróbios pré-tratados não aclimatados como inóculo. Os ensaios realizados em frasco de penicilina foram feitos por frasco-exclusão. A pressão interna do frasco foi medida com auxílio de um manômetro, inserido na tampa do frasco antes da amostragem do gás e do líquido.

4.4. Seleção do tipo de pré-tratamento do lodo anaeróbio

Foram realizados estudos de aclimatação nos dois lotes de lodo anaeróbio, após pré-tratamento ácido, a fim de se selecionar o lote mais adequado para a produção de H₂

(seção 4.3). Em seguida, utilizou-se o lote de lodo anaeróbio selecionado para a definição do tipo de pré-tratamento (ácido ou térmico) que propicia maior estabilidade ao lodo pré-tratado.

Para tanto, o lodo anaeróbio pré-tratado foi mantido em estufa a 35°C por tempos variados, em frasco fechado e sem agitação. Este lodo anaeróbio pré-tratado e aclimatado foi utilizado como inóculo em fermentações contendo 1 g/L de glicerol proveniente da glicerina residual do biodiesel. Após a adição do lodo anaeróbio pré-tratado, da glicerina e da água, o pH foi ajustado para 6,0 e os frascos foram purgados com N₂ por 45 s a fim de se garantir um ambiente anaeróbio. Os frascos foram lacrados e encubados a 35°C e 160 rpm por 24 h. Após 24 h de fermentação, mediu-se as pressões internas dos frascos e retirou-se amostras gasosas e líquidas. Os ensaios foram conduzidos em triplicata, em frascos de penicilina de 100 mL contendo 90 mL de meio de fermentação. A produção de H₂ por lodo anaeróbio submetido ao pré-tratamento térmico e não aclimatado foi acompanhada por 37 h para melhor entendimento do processo fermentativo. Estes experimentos foram realizados por frasco-exclusão.

4.5. Produção de 1,3-propanodiol em meio suplementado para favorecimento da via redutora do glicerol

Como mencionado anteriormente (seção 3.5) bactérias do gênero Clostridium, presentes no lodo anaeróbio, são capazes de consumir glicerol com consequente geração de ácidos orgânicos, álcoois, CO_2 e H₂. O glicerol é metabolizado em duas vias concorrentes, a via oxidativa – de produção de ácidos orgânicos, álcoois, CO_2 e H₂ – e a via redutora – que culmina na produção de 1,3-PDO.

Com a finalidade de favorecer a via redutora adicionou-se alguns suplementos ao meio de fermentação, listados a seguir:

- Para melhor funcionamento da enzima glicerol desidratase (1ª etapa da via redutora): vitamina B12 (5 mg/L), CoCl₂.6H₂O (5 mg/L) e K₂HPO₄ (5 g/L)(HUANG; GONG; TSAO, 2002; WISCHRAL et al., 2015);
- Para melhor funcionamento da enzima 1,3-propanodiol oxidoredutase (2ª etapa da via redutora): FeCl₃.6H₂O (3 mg/L) (JIANG et al., 2017);
- Para estimular a síntese de enzimas e o crescimento celular: extrato de levedura (1 g/L) como fonte de nitrogênio.

Os ensaios foram realizados em triplicata em frascos de penicilina de 100 mL contendo 90 mL de meio fermentativo, a pH 6,0, 35°C e 160 rpm. O inóculo utilizado foi lodo anaeróbio pré-tratado termicamente padronizado para se atingir o valor de 7,5 g_{SSV}/L no meio de fermentação. A fonte de carbono utilizada foi a glicerina, padronizada para que o meio de fermentação contivesse de 1 a 50 g/L de glicerol, a depender do ensaio. Os frascos contendo o meio de fermentação foram purgados com N₂ por 45 s para garantir a anaerobiose e então lacrados.

Numa primeira etapa a produção de 1,3-PDO foi avaliada em 4 condições: 1 g/L de glicerol com e sem suplementação e 10 g/L de glicerol com e sem suplementação; estes ensaios foram realizados por frasco-exclusão, com tempo fixo de 24 h, totalizando 12 frascos. Em seguida, avaliou-se a produção de 1,3-PDO em meios suplementados e contendo 1, 10, 20, 30, 35 e 50 g/L de glicerol; estes ensaios foram realizados por frasco-exclusão, com tempos de 24 h e 48 h, totalizando 36 frascos.

A eficiência de conversão do glicerol a 1,3-PDO foi calculada a partir do rendimento obtido experimentalmente em relação ao rendimento máximo teórico para esta conversão (Equação 1). O rendimento máximo teórico (Y_{P/Smáx}) de 1,3-PDO a partir de glicerol é 0,72 mol/mol, correspondendo a 0,59 g/g (CHEN et al., 2018; VIVEK et al., 2017a; WISCHRAL et al., 2016). Desta forma:

$$Eff.(\%) = \frac{Y_{P/Sexp}}{Y_{P/Smáx}} \times 100\%$$

(Equação 1)

Na qual,

Eff.: eficiência de conversão do glicerol a 1,3-PDO

 $Y_{P/S exp}$: rendimento obtido experimentalmente $Y_{P/S máx}$: rendimento máximo teórico

4.6. Otimização do meio de produção de H₂

Foram realizados dois planejamentos experimentais em sequência: um planejamento fatorial 2³ seguido de um delineamento composto central rotacional (DCCR), com 3 parâmetros. Nestes planejamentos experimentais foram utilizadas como variáveis independentes as concentrações de nitrogênio (N), fósforo (P) e Tween 80, como surfactante, no meio de fermentação, tendo-se como variável dependente (variável de resposta) a produção específica de H₂. Para o delineamento dos experimentos, o tratamento estatístico dos dados e a geração do modelo matemático foi utilizado o Software Statistica[®] 13.0 (TIBCO Software).

Os experimentos foram conduzidos em frascos de penicilina de 100 mL, contendo 90 mL de meio. Foram fixados os seguintes parâmetros: concentração inicial de glicerol (3 g/L), inóculo (7,5 g_{SSV}/L), pH 6,0, 35°C e 160 rpm. Glicerina (3g/L) foi utilizada como fonte de glicerol, lodo anaeróbio de ETE submetido ao pré-tratamento térmico foi utilizado como inóculo (7,5 g_{SSV}/L), ureia foi utilizada com fonte de nitrogênio e uma mistura equimolar de K₂HPO₄ e KH₂PO₄ foi utilizada como fonte de fósforo. Um experimento controle foi realizado em triplicata, substituindo-se as soluções de fonte de nitrogênio, fontes de fósforo e Tween 80 por água destilada.

4.6.1.Planejamento fatorial 2³

No planejamento fatorial 2^3 cada variável independente foi avaliada em 2 níveis, codificados como -1 e +1, totalizando 8 corridas experimentais. Adicionalmente, foram

realizadas 3 réplicas do ponto central, codificado como nível 0. As condições experimentais de cada nível estão expostas na Tabela 1.

Variáveis Independentes	Níveis			
	-1	0	+1	
N (mg/L)	5,0	6,5	8,0	
P (mg/L)	1,5	2,0	2,5	
Tween 80 (mg/L)	5,0	10,0	15,0	

Tabela 1. Valores de cada variável independente nos respectivos níveis avaliados no planejamento fatorial 2³ (1ª parte da otimização do meio de produção de H₂).

As significâncias estatísticas de cada variável e das interações entre variáveis foram analisadas por ANOVA (análise de variância). O intervalo de confiança adotado para as análises estatísticas foi de 90% (p-valor < 0,1), apontado como adequado para a 1ª etapa de otimização envolvendo processos biotecnológicos (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

4.6.2. Delineamento composto central rotacional com 3 fatores

O DCCR foi realizado a partir da adição de níveis axiais (α), codificados como -1,68 e +1,68, à matriz de experimentos do planejamento fatorial 2³ (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de cada variável independente nos respectivos níveis avaliados no DCCR (2ª parte da otimização do meio de produção de H₂). Como os níveis -1, 0 e +1 foram os mesmos do planejamento fatorial 2³, apenas os níveis -1,68 e +1,68 são inéditos.

Variáveis Independentes			Níveis		
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
N (mg/L)	4,0	5,0	6,5	8,0	9,0
P (mg/L)	1,2	1,5	2,0	2,5	2,8
Tween 80 (mg/L)	1,6	5,0	10,0	15,0	18,4
Desta forma, 6 novas condições experimentais foram empregadas para produção de H₂, correspondendo aos níveis axiais, tornando possível a geração de um modelo matemático quadrático que descreva a produção de H₂ em função das concentrações de N, P e Tween 80. As significâncias estatísticas de cada variável e das interações entre variáveis foram analisadas por ANOVA (análise de variância). O intervalo de confiança adotado para as análises estatísticas do DCCR foi de 95% (p-valor < 0,05), apontado como adequado para a etapa final de otimização envolvendo processos biotecnológicos (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

A Equação 2 a seguir representa um modelo matemático quadrático genérico usado para descrever variável de resposta em função das variáveis independentes. A partir da análise dos efeitos de cada variável é possível obter os valores de cada coeficiente, transformando o modelo genérico em um modelo específico para a descrição do volume específico de H₂ nas faixas estudadas.

$$R = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_1^2 + \beta_2 \cdot X_2^2 + \beta_3 \cdot X_3^2 + \beta_4 \cdot X_1 + \beta_5 \cdot X_2 + \beta_6 \cdot X_3 + \beta_7 \cdot X_1 \cdot X_2 + \beta_8 \cdot X_1 \cdot X_3 + \beta_9 \cdot X_2 \cdot X_3$$

Equação 2

Na qual,

R: Resposta;
β_n: Coeficientes
X_n: Variáveis independentes

Para o entendimento da interação das variáveis entre si e das variáveis com a resposta, foram geradas superfícies de resposta, sendo possível visualizar a região onde se encontra a máxima resposta. O ponto de máximo foi obtido através da derivação do modelo matemático, obtendo-se os coeficientes de regressão. Assim, obteve-se o valor de cada variável independente que leva à otimização da resposta, ou seja, as concentrações de N, P e Tween 80 que levam ao maior volume específico de H₂.

4.6.3. Validação experimental

Determinadas as concentrações ótimas de N, P e Tween 80, dois ensaios experimentais foram realizados para a confirmação, ou validação, da produção específica de H₂ máxima predita pela regressão do modelo matemático quadrático. Cinco replicatas da condição ótima foram conduzidas em frascos de penicilina, enquanto 3 replicatas da mesma condição foram conduzidas em reatores manométricos de 300 mL, contendo 270 mL de meio de fermentação (Figura 23).



Figura 23. Reator manométrico idealizado e construído no Laboratório de Biocatálise do INT, durante a orientação do trabalho de conclusão de curso do aluno Ricardo de Santana (EQ/UFRJ) (SANTANA, 2019). A pressão interna pode ser verificada ao longo do processo fermentativo, permitindo melhor acompanhamento do processo e simplificando o trabalho experimental, quando comparado à frasco-exclusão. Além disso, o reator possui válvulas para amostragem de gás e de líquido, permitindo o acompanhamento completo da fermentação ao longo do tempo.

4.7. Influência do volume de *headspace* e da concentração inicial de glicerol sobre a produção de H₂

Foram realizados três ensaios fermentativos contendo 3 g/L de glicerol (da glicerina) e volumes de *headspace* de 15%, 50% e 75% do volume total do reator, no qual:

 $V_{total} = V_{meio} + V_{headspace.}$

O aumento do volume de *headspace* ocasiona redução da pressão interna do reator, a qual foi verificada por manômetro. Estes experimentos foram realizados em duplicata em pH 6,0 a 35°C e 160 rpm por 24 h (ou até que a pressão interna do reator se mantivesse constante). Além da glicerina, o meio de fermentação continha 5,7 mg/L de Tween 80, 6,6 mg/L de N (14,1 mg/L de ureia) 2,8 mg/L de P (6,1 mg/L de KH₂PO₄ e 7,9 mg/L de K₂HPO₄), 7,5 g_{SSV}/L de lodo anaeróbio pré-tratado termicamente. Os reatores foram purgados com N₂ por 1,5 min.

Observada a influência do volume de *headspace*, este foi fixado em 50% do volume total do reator, enquanto a concentração inicial de substrato foi variada entre 3 g/L e 9 g/L. Foram mantidas as mesmas condições anteriores, porém à medida que se aumentou a concentração de glicerol, aumentou-se as concentrações dos suplementos proporcionalmente, de acordo com o apresentado na Tabela 3.

	Concentração (mg/L)						
Glicerol	3000,0	5000,0	7000,0	9000,0			
Tween 80	5,7	9 <i>,</i> 5	13,3	17,1			
Ureia	14,1	23,6	33,0	42,4			
KH ₂ PO ₄	6,1	10,2	14,3	18,4			
K ₂ HPO ₄	7,9	13,1	18,3	23,6			

As concentrações de Tween 80, ureia e fosfatos foram aumentadas proporcionalmente ao aumento da concentração de glicerol.

Tabela 3. Composição do meio de fermentação nos experimentos realizados com 50% de *headspace* e concentrações crescentes de glicerol. Adicionou-se 7,5 g_{ssv}/L de lodo anaeróbio pré-tratado termicamente.

4.8. Produção sequencial de H₂ e CH₄

A produção sequencial de H_2 e CH_4 foi realizada de forma a se utilizar o efluente da produção de H_2 como matéria-prima para a produção de CH_4 .

Na primeira etapa do processo realizou-se a fermentação de glicerina com lodo anaeróbio pré-tratado termicamente, para produção de H₂. O meio de fermentação foi composto por 7 g/L de glicerol, 7,5 g_{SSV}/L de lodo anaeróbio pré-tratado, 13,3 mg/L de Tween 80, 33 mg/L de ureia, 14,3 mg/L de KH₂PO₄ e 18,3 mg/L de K₂HPO₄; o pH do meio foi ajustado para 6,0 e o *headspace* inicial correspondeu a 50% do volume total. O meio de fermentação foi distribuído em 4 reatores manométricos, os quais foram purgados com N₂ por 90 s antes de serem incubados a 35°C sob agitação de 160 rpm por 24h. O meio fermentado foi filtrado em papel de filtro Whatman n° 4 (20-25 µm) para remoção grosseira dos sólidos em suspensão. O líquido resultante da filtração foi utilizado como matéria-prima para produção de CH₄, na etapa subsequente. A título de comparação, o mesmo ensaio foi realizado sem a adição dos suplementos (Tween 80, ureia, KH₂PO₄ e K₂HPO₄), adicionandose água destilada em substituição.

Para produção de metano utilizou-se o mesmo *headspace* e a mesma concentração de SSV empregados na produção de H₂, completando-se o volume com os efluentes obtidos nas fermentações de glicerina com e sem suplementação. Neste caso, o lodo anaeróbio foi utilizado *in natura*, ou seja, não foi submetido a nenhum tipo de pré-tratamento. O pH do meio de digestão foi ajustado para 7,0 e distribuído em reatores manométricos, os quais foram purgados com N₂ por 90 s antes de serem incubados a 35°C sem agitação. Cada condição foi avaliada em duplicata.

4.9. Produção direta de CH₄ a partir de glicerina

Ensaios de digestão anaeróbia da glicerina foram realizados para se obter a produção direta de CH₄. Nestes ensaios utilizou-se a glicerina residual do biodiesel como fonte de glicerol, fixando-se a concentração inicial deste substrato em 7 g/L, e empregou-se

lodo anaeróbio *in natura* como inóculo, a 7,5 g_{SSV}/L . Os ensaios foram conduzidos em pH 7,0, em duplicata, utilizando-se reatores manométricos contendo *headspace* correspondente a 50% do volume total. Os reatores contendo os meios de digestão foram purgados com N₂ por 90 s e então incubados a 35°C, sem agitação, por 41 dias.

Avaliou-se a digestão em meio suplementado (mesmas condições da fermentação para produção de H_2 - seção 4.8) e em meio não suplementado, comparativamente.

4.10. Quantificação do biogás

Tanto em frascos de penicilina, quanto em reatores manométricos, a pressão interna dos reatores foi medida com auxílio de manômetro. Nos experimentos conduzidos em frascos de penicilina, o manômetro foi inserido no septo de borracha antes da abertura do frasco; nos reatores manométricos foi possível realizar o acompanhamento da pressão ao longo do processo.

Tendo-se o valor da pressão, é possível se calcular o volume ocupado pelo biogás em pressão atmosférica, e o número de mols de biogás presente na amostra.

O volume equalizado de biogás foi calculado pela equação de expansão isotérmica para gases ideais, simplificada como:

$$(P \times V)_{reator} = (P \times V)_{atm}$$

Equação 3

$$(P_{man} + P_{atm}) \times V_{HS} = P_{atm} \times V_{biogás}$$

Equação 4

Assim,

$$V_{biog\acute{a}s} = \frac{(P_{man} + P_{atm}) \times V_{HS}}{P_{atm}}$$

Equação 5

Em que:

P_{man}: pressão manométrica

P_{atm}: pressão atmosférica

V_{HS}: volume do *headspace*

V_{biogás}: volume de biogás

O número de mols de biogás foi calculado pela equação dos gases ideais:

$$P \times V = n \times R \times T$$

Equação 6

Assim,

$$n = \frac{(P_{man} + P_{atm}) \times V_{HS}}{R \times T}$$

Equação 7

Em que:

n: número de mols de biogás

R: constante universal dos gases ideais

T: temperatura de fermentação

Amostras gasosas foram analisadas por cromatografia gasosa para quantificação das concentrações de H_2 , CH_4 e CO_2 . Desta forma, calculou-se o volume e o número de mols de cada um destes componentes na amostra, de acordo com as equações a seguir:

$$V_c = V_{biogás} \times y_c$$

Equação 8

$$n_c = n_{biogás} \times y_c$$

Equação 9

Em que:

V_c: volume do componente

*y*_c: fração molar do componente

n_c: número de mols do componente

Componente: H₂, CH₄ ou CO₂

4.11. Modelagem da produção de biogás

Nos ensaios cinéticos, onde a produção de biogás foi acompanhada ao longo do tempo, as modelagens dos perfis de geração de H_2 e CH_4 para predição dos parâmetros cinéticos foram realizadas segundo a equação de Gompertz modificada (BARRERA-QUINTERO et al., 2017a):

$$H(t) = H_{m\acute{a}x} e^{-e^{\left[\frac{R_{m\acute{a}x}*e}{H_{m\acute{a}x}}(\lambda_0-t)+1\right]}}$$

Equação 10

Onde:

H: volume específico de biogás, em mL/L H_{máx}: volume específico máximo de biogás, em mL/L R_{máx}: taxa máxima de produção de biogás, em mL/(L.h) ou mL/(L.d) λ_0 : fase adaptativa, em h ou d.

A equação de Gompertz modificada é amplamente utilizada para descrever a cinética de produção de biogás e pode ser empregada para predição de parâmetros tanto para H_2 quanto para CH_4 (BARRERA-QUINTERO et al., 2017b; PAN et al., 2016).

4.12. Metodologia analítica

4.12.1. Cromatografia gasosa

As análises do biogás com relação às concentrações de H_2 , CH_4 e CO_2 foram realizadas em micro-cromatógrafo gasoso (Agilent Technologies[®]) equipado com dois canais e um detector de condutividade térmica. As colunas cromatográficas utilizadas foram: HP-PLOT U (3 m x 0,32 mm x 30 µm) e HP-PLOT Molecular sieve 5A (10 m x 0,32 mm x 12 µm), a

60 e 100°C, respectivamente e tendo como gás de arraste He e N_2 , respectivamente. A temperatura do injetor foi de 90 °C e a temperatura de entrada da amostra foi de 110 °C.

4.12.2. Cromatografia Líquida

As análises de glicerol, 1,3-propanodiol e ácidos acético e butírico foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu[®]) equipado com detector de índice de refração e detector UV-Vis. Foi utilizada a coluna Aminex HPX-87H (BioRad), em modo isocrático a 55°C, utilizando como fase móvel H₂SO₄ a 0,005 mol/L a um fluxo de 0,6 mL/min. O volume de injeção das amostras foi de 10 µL.

Todas as amostras líquidas foram previamente filtradas em membrana de PTFE hidrofílico com porosidade de 0,22 μ m.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da glicerina residual do Biodiesel

A glicerina utilizada como fonte de glicerol, proveniente de processo industrial de produção de biodiesel, foi caracterizada segundo metodologias-padrão. As características físico-químicas da mesma estão dispostas na Tabela 4.

Tabela 4. Características físico-químicas da glicerina utilizada como fonte de glicerol neste trabalho. Trata-se de um subproduto industrial, gerado na unidade Rondonópolis/MT da produtora de biodiesel ADM do Brasil.

Parâmetro	Valor		Metodologia
рН		4,01	medida direta
DQO	626,13	g _{O2} /L	АРНА, 2005
Glicerol	66,00	% m/m	HPLC
Metanol	0,029	%m/m	CG
Umidade	13,33	% m/m	medida direta
Enxofre	8	mg/kg	ASTM D5453:2016 ^{E1}
Carbono	32	% (m/m)	ASTM D5291:2016
Hidrogênio	9,2	% (m/m)	ASTM D5291:2016
Nitrogênio	0,105	% (m/m)	ASTM D5291:2016
Sódio	74,99	mg/kg	ABNT NBR 15553:2015
Potássio	3,56	mg/kg	ABNT NBR 15553:2015
Cálcio	<0,1	mg/kg	ABNT NBR 15553:2015
Magnésio	<0,1	mg/kg	ABNT NBR 15553:2015
Fósforo	13,11	mg/kg	ABNT NBR 15553:2015
Índice de acidez	0,74	mgKOH/g	EN 14104
Massa específica a 20 °C	1,2509	g/cm³	ABNT NBR 14065:2013
Massa específica a 35 °C	1,2419	g/cm³	ABNT NBR 14065:2013
Viscosidade cinemática a 35°C	43,7	mm²/s	ASTM D445
Viscosidade cinemática a 40°C	32,57	mm²/s	ASTM D445

Poucas informações acerca deste material foram fornecidas pela empresa, porém sabe-se que a ADM do Brasil utiliza óleo de soja como matéria-prima para produção do biodiesel (https://www.biodieselbr.com/usinas_brasil/fabrica/adm-2; http://www5.sefaz.mt.gov.br/-/mato-grosso-tera-a-maior-fabrica-de-biodiesel-do-mundo). Com base nos teores de glicerol e metanol, a glicerina em questão foi destilada para recuperação do álcool, porém não foi purificada.

As relações C/N e C/P desta glicerina são 304 e 24.409, respectivamente, indicando baixos teores de nitrogênio e fósforo nesta matéria-prima. Porém a demanda química de oxigênio (DQO) é elevada (0,6 kg₀₂/L), apontando seu potencial poluidor, mas também seu potencial como matéria-prima para produção de biogás.

5.2. Caracterização do lodo anaeróbio

O lodo aneróbio, coletado em dois lotes, foi brevemente caracterizado em termos de sólidos suspensos, valores estes que são usados para padronizar a quantidade de lodo que deve ser empregada como inóculo. Os valores obtidos estão presentes na Tabela 5

Tabela 5. Caracterização simplificada dos lotes de lodo anaeróbio utilizados como inóculo nesta pesquisa. SST: sólidos suspensos totais; SSF: sólidos suspensos fixos; SSV: sólidos suspensos voláteis. Os SSV representam uma medida indireta da matéria orgânica no lodo e, portanto, foram utilizados a título de padronização do tamanho do inóculo.

	Lote A	Lote B
	1/3 adensador	100% adapted at
	2/3 digestor	100% adensador
SST (g/L)	18,28	15,95
SSF (g/L)	6,95	5,57
SSV (g/L)	11,33	10,40
SSV/SST	62%	65%

Observa-se que o lodo anaeróbio utilizado neste trabalho continha baixo teor de sólidos totais (SST), quando comparado a alguns trabalhos da literatura (FLORES-LARIOS et al., 2015; VIANA et al., 2019), porém condizente com outros (FALOYE; GUEGUIM KANA; SCHMIDT, 2014; FARHAT et al., 2018). O teor de sólidos de um lodo anaeróbio depende da sua origem, logo, pode variar bastante. Por este motivo, fixou-se o teor de sólidos suspensos voláteis inoculado nos reatores, de forma a padronizar o tamanho do inóculo.

Cabe destacar que de 62 a 65% dos sólidos suspensos correspondiam aos sólidos suspensos voláteis (SSV), que representam indiretamente a quantidade de células ali presentes. Como é um lodo anaeróbio, é esperado que contenha baixo teor de matéria orgânica. Os sólidos suspensos fixos correspondem ao teor de componentes inorgânicos no material.

De forma geral, o teor de componentes orgânicos decresce com o tempo, enquanto o teor de componentes inorgânicos aumenta, devido à mineralização do lodo que é resultado da morte celular de alguns organismos por falta de nutrientes. Ao longo deste trabalho acompanhou-se a composição de sólidos do lodo a fim de evitar o uso de um inóculo mineralizado. A última análise do lodo anaeróbio revelou uma redução de 4,4% nos sólidos suspensos voláteis, revelando que o lodo pôde ser bem preservado ao longo dos 4 anos de desenvolvimento da tese.

5.3. Seleção do lote de lodo anaeróbio

A coleta de lodo anaeróbio em uma ETE que emprega tecnologia de lodos ativados pode ser realizada tanto diretamente do digestor, quanto do adensador. Com a finalidade de identificar o tipo de lodo mais propício para a produção de H₂, foram coletados dois lotes de lodo anaeróbio: o lote A, composto por aproximadamente 1/3 de lodo do digestor e 2/3 de lodo do adensador, em volume; e o lote B, composto somente por lodo do adensador. Para tornar possível a comparação entre os lotes, a concentração de sólidos suspensos voláteis foi fixada em 7,5 g/L no início das fermentações.

Como a primeira etapa do processo desenvolvido nesta tese consistia na produção de H₂, os lodos foram submetidos a um pré-tratamento ácido. Os lodos pré-tratados foram aclimatados e empregados como inóculo para a fermentação por 24 h.

O pré-tratamento se baseia na exposição do lodo anaeróbio a um ambiente hostil, de modo que os microrganismos incapazes de esporular sejam inibidos, enquanto os formadores de esporos resistem na forma de endosporos. A maioria das espécies produtoras de H₂, como *Clostridium* spp. e *Bacillus* spp. esporula quando submetida a uma condição hostil, enquanto os principais consumidores de H₂ – arqueias metanogênicas hidrogenotróficas – não possuem este mecanismo (RAFIEENIA; LAVAGNOLO; PIVATO, 2017). Portanto, ao final do pré-tratamento as bactérias produtoras de H₂, encontram-se na forma de endosporos, morfologia celular desidratada formada como meio de proteção às organelas vitais do organismo e que não apresenta atividade metabólica (PIGGOT et al., 1976). Para germinação do endosporo em célula metabolicamente ativa, é necessário que o meio torne-se novamente favorável (temperatura, pH, nutrientes...) (BUNDHOO; MOHEE; HASSAN, 2015b). A germinação do endósporo pode ocorrer, portanto, durante a etapa de aclimatação.

Corroborando esta teoria, LEE; SONG & HWANG, (2009) mostraram uma drástica redução no número de células viáveis em lodo anaeróbio pré-tratado com ácido; foi mostrado também o aumento do número destas células viáveis 24 h após o pré-tratamento ácido, das quais a maioria foi identificada como pertencente ao gênero *Clostridium*, indicando a resistência dessas bactérias ao pré-tratamento.

Na Figura 24 estão apresentados os resultados de volume específico de biogás quando se utilizou o lodo anaeróbio do lote A pré-tratado e submetido a diferentes tempos de aclimatação, bem como o consumo de substrato. No ensaio controle, no qual foi utilizado o lodo A *in natura*, observou-se baixo consumo de substrato e produção de CH₄, enquanto nos demais ensaios a composição do biogás era de H₂, CO₂ e N₂ (da purga).

Houve uma progressão da produção de H₂ conforme o tempo de aclimatação foi prolongado, entre 0 e 24 h, o mesmo ocorreu com o consumo de substrato, indicando que os microrganismos produtores de H₂ presentes no lodo A necessitaram de um tempo de adaptação após o pré-tratamento.



Figura 24. Volume específico de Biogás (■ H₂; ■ CH₄) gerado após 24 h de fermentação, utilizando como inóculo o lodo anaeróbio proveniente do Lote A (1/3 adensador; 2/3 digestor), após pré-tratamento ácido e submetido a diferentes tempos de aclimatação. O eixo x representa os tempos de aclimatação aos quais o lodo pré-tratado foi submetido. Após aclimatação o lodo foi inoculado em meio contendo 1 g/L de glicerol da glicerina e mantido a 35°C e 160 rpm por 24 h. C: controle onde se utilizou como inóculo o lodo anaeróbio *in natura*; ◆ consumo de glicerol.

Os resultados obtidos nas fermentações em que o lodo B foi empregado (Figura 25) não acompanharam a mesma tendência daqueles obtidos em fermentações onde se utilizou o lodo A como inóculo. Não houve diferença estatística significativa (teste t com 95% de confiança) entre as médias das produções de H₂ obtidas com o lodo B não aclimatado (0 h) e o lodo B aclimatado por até 8 h. Depois de 8 h, pode-se observar uma redução da produção de biogás apesar de o consumo de substrato permanecer total. Novamente, houve baixo consumo de substrato e baixa produção de metano ao se utilizar o lodo *in natura* (C).



Figura 25. Volume específico de Biogás (■ H₂; ■ CH₄) gerado após 24 h de fermentação, utilizando como inóculo o lodo anaeróbio proveniente do Lote B (100% adensador), após pré-tratamento ácido e submetido a diferentes tempos de aclimatação. O eixo x representa os tempos de aclimatação aos quais o lodo pré-tratado foi submetido. Após aclimatação o lodo foi inoculado em meio contendo 1 g/L de glicerol da glicerinae mantido a 35°C e 160 rpm por 24 h. C: controle onde se utilizou como inóculo o lodo anaeróbio *in natura*; ◆ consumo de glicerol.

Na Tabela 6 encontram-se sumarizadas as produções específicas de H₂, e as concentrações de ácido acético, ácido butírico e 1,3-PDO, bem como o percentual de consumo de glicerol, obtidos nos ensaios de aclimatação dos lodos anaeróbios dos lotes A e B após pré-tratamento ácido. Os valores que constam nesta tabela correspondem ao final da fermentação (24 h).

				•		
Aclimata	ação (h)	H ₂ (mL/L)	Hac (g/L)	Hbut (g/L)	PDO (g/L)	Consumo de glicerol
	0	8,76 ± 0,51	0,21 ± 0,01	0,12 ± 0,05	0,44 ± 0,01	39,54% ± 0,76%
	2	11,15 ± 1,03	0,35 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,52 ± 0,02	53,60% ± 2,21%
A	6	14,47 ± 2,12	0,22 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,34 ± 0,00	53,48% ± 0,00%
Lote	8	17,91 ± 0,02	0,24 ± 0,01	0,24 ± 0,02	0,29 ± 0,08	80,80% ± 3,64%
	24	24,62 ± 0,58	0,27 ± 0,01	0,27 ± 0,03	0,29 ± 0,02	91,93% ± 0,01%
	48	11,42 ± 4,16	0,27 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,22 ± 0,03	89,52% ± 0,51%
	0	19,74 ± 1,83	0,07 ± 0,01	0,15 ± 0,03	0,22 ± 0,03	99,04% ± 1,17%
	4	18,86 ± 1,07	0,07 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,27 ± 0,05	100,00% ± 0,00%
	8	24,84 ± 5,05	0,08 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,23 ± 0,02	100,00% ± 0,00%
ote B	15	14,86 ± 1,17	0,10 ± 0,00	0,21 ± 0,01	0,35 ± 0,00	100,00% ± 0,00%
Ľ	18	14,64 ± 0,58	0,12 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,37 ± 0,02	100,00% ± 0,00%
	21	10,31 ± 0,58	0,12 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,31 ± 0,01	100,00% ± 0,00%
	24	9,65 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,44 ± 0,00	100,00% ± 0,00%

Tabela 6. Valores de volume específico de H₂; concentrações de ácido acético (Hac), ácido butírico (Hbut) e 1,3-propanodiol (PDO); e consumo de glicerol, resultantes da fermentação de 1(g/L) de glicerol da glicerina por 24h, utilizando dois lotes de lodo anaeróbio aclimatados a 35° por diferentes intervalos de

tempo.

Observa-se que a fermentação realizada pelo consórcio microbiano do lodo A foi do tipo acética. De 0 h a 24 h de aclimatação, à medida que o consumo de substrato aumentou as concentrações de ácidos acético e butírico também aumentaram, com consequente aumento da produção de H₂, indicando que os microrganismos selecionados pelo prétratamento ácido necessitaram da aclimatação para serem capazes de metabolizar o glicerol na etapa de fermentação. Adicionalmente, observa-se uma redução da produção de 1,3propanodiol, indicando que o lodo não aclimatado tem preferência pela via redutora, que é uma via mais direta, porém sem geração de energia para a célula. Em tempos mais longos de aclimatação a produção de 1,3-PDO diminui, enquanto a concentração dos ácidos aumenta. O lodo aclimatado por 48 h quando utilizado no processo fermentativo por 24 h mostrou baixa produção de H₂ e consequentemente dos ácidos associados ao seu metabolismo. Como esperado, a concentração de 1,3-PDO também foi baixa ao final de 24 h. Nesta condição, o lodo permaneceu em ausência de substrato por muito tempo, podendo ter ocorrido morte celular. Desta forma, o inóculo utilizado na fermentação poderia conter menor quantidade de células viáveis.

O emprego do lote B como inóculo para a fermentação mostra um perfil diferente daquele observado anteriormente, com o lote A, visto que os microrganismos ali presentes são capazes de consumir o glicerol sem a necessidade de aclimatação e o principal ácido produzido foi o butírico. Neste caso houve acúmulo crescente de H₂ quando se utilizou lodo aclimatado entre 0 h e 8 h. O uso de lodo aclimatado por tempos mais longos levou à redução do H₂ acumulado, porém com concentrações maiores de ácidos, o que pode ser resultado da ação de bactérias homoacetogênicas, que consomem CO₂ e H₂ para formação de ácido acético. O lodo aclimatado por mais tempo levou à formação de 1,3-PDO, ao contrário do que se observou com a utilização do lote A de lodo.

Como a constituição de microrganismos no lodo anaeróbio é muito variada e complexa, os metabólitos analisados são resultado da ação de diferentes gêneros de microrganismos, cada um com suas características metabólicas particulares. A análise realizada neste trabalho é macroscópica e fenomenológica, e tem como objetivo a seleção do consórcio mais promissor para a produção de H₂. Para melhor entendimento do processo de fermentação, três ensaios fermentativos foram acompanhados ao longo do tempo

(Figura 26, Figura 27 e Figura 28), tendo como inóculos: lote A não aclimatado, lote A aclimatado por 24 h e lote B não aclimatado. Foram acompanhados os seguintes parâmetros: concentrações de glicerol, ácido acético, ácido butírico e 1,3-propanodiol; e volume específico de H₂.

O uso do lote A não aclimatado (Figura 26) levou a uma produção mais baixa de H₂, bem como de ácidos acético e butírico, visto que estes ácidos são produzidos concomitantemente à produção de H₂. Além disso, a produção de 1,3-PDO se iniciou antes da produção de H₂, e houve maior geração de 1,3-PDO ao longo do processo fermentativo, em comparação com o ensaio fermentativo em que o lodo foi aclimatado (Figura 27), indicando uma preferência das bactérias pela via redutora quando não há aclimatação e preferência pela via oxidativa quando há aclimatação, conforme apontado anteriormente.



Figura 26. Cinética da produção de H₂ empregando lodo anaeróbio do Lote A pré-tratado com ácido e não aclimatado.S₀ = 1 g/L de glicerol; X₀ = 7,5 g_{ssv}/L; pH 6,0; ■ H₂; -- equação de Gompertz modificada; ▲ 1,3-PDO; ■ ácido butírico; ● ácido acético; ◆ glicerol.



Figura 27.Cinética da produção de H₂ empregando lodo anaeróbio Lote A pré-tratado com ácido e aclimatado por 24 h.S₀ = 1 g/L de glicerol; X₀ = 7,5 g_{SSV}/L; pH 6,0; ■ H₂; -- equação de Gompertz modificada; ▲ 1,3-PDO; ■ ácido butírico; ● ácido acético; ◆ glicerol.

Os parâmetros da equação de Gompertz modificada indicaram 17 h de fase adaptativa e volume específico máximo de H₂ de 11 mL/L, com coeficiente de determinação (R²) de 0,9754 para a cinética com lodo não aclimatado e 12 h de fase adaptativa e volume específico máximo de H₂ de 30 mL/L, com R² de 0,9949 para a cinética com lodo aclimatado. Verificou-se que o lodo do lote A demanda menos tempo de adaptação, porém necessita de uma etapa de aclimatação para que sejam alcançados valores mais expressivos na produção de H₂. Na fermentação em que se utilizou o lodo A não aclimatado, após 48 h de fermentação ainda havia uma tendência de aumento da produção de H₂, porém o processo foi interrompido, visto que não seria interessante um processo tão longo. Quando o lodo A foi aclimatado por 24 h foi possível atingir a estabilidade de produção após 21 h. Considerando-se o tempo global do processo, ou seja, o tempo de aclimatação somado ao tempo de fermentação, a produtividade volumétrica máxima (Qp_{máx}) alcançada com o lodo anaeróbio do lote A não aclimatado foi 0,41 mL/(L.h) em 0 h + 23 h (tempo total: 23 h), enquanto a Qp_{max} obtida aclimatando-se este lodo por 24 h foi 0,64 mL/(L.h) em 24 h + 21 h (tempo total: 45 h), correspondendo a um aumento de 58%.

O emprego do lote B de lodo anaeróbio como inóculo mostrou que o lodo não aclimatado possui maior fase adaptativa (17 h), porém neste caso a taxa de produção de H₂ foi mais elevada, levando à produção de 20 mL/L em 24 h de fermentação. Observa-se que as vias redutora e oxidativa de metabolismo do glicerol ocorrem paralelamente e tem maior atividade entre 17 h e 24 h. Adicionalmente, foram produzidos 0,4 g/L de 1,3-PDO, o que é interessante para a próxima etapa do processo global da biorefinaria.



Figura 28. Cinética da produção de H₂ empregando lodo anaeróbio Lote B pré-tratado com ácido e não aclimatado. S₀ = 1 g/L de glicerol; X₀ = 7,5 g_{ssv}/L; pH 6,0; \blacksquare H₂; -- equação de Gompertz modificada; \blacktriangle 1,3-PDO; \blacksquare ácido butírico; \blacklozenge ácido acético; \blacklozenge glicerol.

A produção de H₂ pelos organismos do lodo do lote B foi associada à produção de ácido butírico, enquanto a do lodo do lote A foi associada ao ácido acético. A via do ácido acético leva a maiores rendimentos de H₂, porém as produtividades alcançadas utilizando-se o lodo A ($Qp_{máx} = 0.64 \text{ mL/(L.h)}$) foram inferiores àquelas alcançadas utilizando-se o lodo B (Qp_{max} = 0,80 mL/(L.h)), considerando-se o tempo total de processo (tempo de aclimatação + tempo de fermentação). Adicionalmente, houve consumo total do substrato adicionado ao lodo B, indicando que a população microbiana encontrava-se mais ativa após o pré-tratamento. Por estes motivos selecionou-se o lote B de lodo anaeróbio para o prosseguimento da pesquisa.

5.4. Seleção do tipo de pré-tratamento do lodo anaeróbio

Foram avaliados os pré-tratamentos térmico e ácido do lodo anaeróbio do lote B. Os resultados do pré-tratamento ácido estão contidos na seção anterior, portanto realizouse uma avaliação da necessidade de aclimatação do lodo B pré-tratado termicamente (Figura 29).



Figura 29. Volume específico de biogás (■ H₂; ■ CH₄) gerado após 24 h de fermentação, utilizando como inóculo o lodo anaeróbio proveniente do Lote B (100% adensador), após pré-tratamento térmico e submetido a diferentes tempos de aclimatação. O eixo x representa os tempos de aclimatação aos quais o lodo pré-tratado foi submetido. Após aclimatação o lodo foi inoculado em meio contendo 1 g/L de glicerol da glicerina e mantido a 35°C e 160 rpm por 24 h. C: controle onde se utilizou como inóculo o lodo anaeróbio *in natura*; ◆ consumo de glicerol.

Observa-se que o lodo B quando submetido ao pré-tratamento térmico não demandou aclimatação, corroborando os resultados anteriores após o pré-tratamento ácido. A principal vantagem de se utilizar o lodo do lote B pré-tratado termicamente é a sua estabilidade após o pré-tratamento, visto que a produção de H₂ se manteve no mesmo patamar independentemente do tempo de aclimatação. Considerando-se um intervalo de confiança de 95% o tempo em que o lodo B pré-tratado termicamente manteve seu potencial de produção de H₂ foi 2,6 vezes mais longo que seu tempo de estabilidade após pré-tratamento ácido.

Desta forma, foi realizada uma cinética de produção de H₂ utilizando-se o lodo B pré-tratado termicamente e não aclimatado, na qual se acompanhou também as concentrações de glicerol, 1,3-propanodiol e ácidos acético e butírico ao longo do tempo (Figura 30).



Figura 30. Cinética da produção de H₂ empregando lodo anaeróbio Lote B pré-tratado termicamente e não aclimatado. S₀ = 1 g/L de glicerol; X₀ = 7,5 g_{SSV}/L; pH 6,0; ■ H₂; -- equação de Gompertz modificada; ▲ 1,3-PDO; ■ ácido butírico; ● ácido acético; ◆ glicerol.

A produção de H₂ se iniciou após 13 h de processo, atingindo o volume específico máximo de 20 mL/L após 21 h, segundo a equação de Gompertz modificada ajustada com R² = 0,9813. A produção de H₂ inicialmente ocorreu associada à de ácido acético (8 h – 15 h) e posteriormente (15 h – 21h) à de ácido butírico, mostrando um perfil de fermentação acético-butírica. O H₂ produzido permaneceu acumulado no *headspace* de 21 h até 37 h de processo; adicionalmente, a concentração de ácido acético se manteve constante neste intervalo de tempo, indicando que não houve atividade homoacetogênica relevante após o pré-tratamento térmico realizado. É possível observar ainda que a produção de 1,3-PDO se iniciou antes da produção de ácidos e H₂, o que seria natural visto que a via redutora é mais simples e envolve menos etapas se comparada à via oxidativa. Esta produção cessou após a estabilização da produção de H₂, quando ainda havia cerca de 10% do substrato inicial no meio fermentativo, os quais foram utilizados para produção de 1,3-PDO.

A produtividade volumétrica máxima de H_2 alcançada nesta etapa foi 0,95 mL/(L.h), 20% superior àquela obtida empregando-se o lodo B pré-tratado com ácido. Considerandose o perfil cinético de produção de H_2 , a não necessidade de aclimatação e a estabilidade do lodo B pré-tratado termicamente, este foi selecionado para o prosseguimento da pesquisa.

As seleções do lote de lodo anaeróbio e do tipo de pré-tratamento a ser empregado constituíram etapas fundamentais para o início do processo de produção de H₂, tendo sido possível aumentar a produtividade de H₂ em 48%, comparando-se os resultados obtidos com o lote B pré-tratado termicamente com aqueles obtidos com o lote A pré-tratado com ácido e aclimatado por 24 h. Adicionalmente, foi possível utilizar um lodo que não demande a etapa de aclimatação e que seja estável, resultando em maior liberdade prática na execução dos experimentos. Deste ponto em diante o lodo aneróbio do lote B será mencionado apenas como lodo anaeróbio.

O objetivo desta etapa da pesquisa foi selecionar o lote de lodo anaeróbio e o tipo pré-tratamento que resultassem na melhor produção de H₂. Portanto não foram realizadas análises microbiológicas dos lodos utilizados, o que seria de grande valor para a elucidação de questões levantadas aqui. A análise metagenômica dos diferentes lotes de lodo anaeróbio e em diferentes estágios do processo (antes e após os pré-tratamentos, em diferentes etapas da aclimatação e da fermentação, por exemplo) complementaria a

discussão e contribuiria no aprofundamento dos resultados do ponto de vista microbiano e bioquímico, mas estas análises não puderam ser realizadas e ficam como sugestão para trabalhos futuros dentro desta linha de pesquisa.

5.5. Produção de 1,3-propanodiol em meio suplementado para favorecer a via redutora do glicerol

A produção biológica de 1,3-PDO, realizada por bactérias, ocorre pela via redutora do metabolismo de glicerol. Esta via consiste em apenas duas etapas: a desidratação de glicerol a 3-hidroxi-propionaldeído, catalisada pela enzima glicerol desidratase; e a redução de 3-hidroxi-propionaldeído a 1,3-propanodiol, mediada pela enzima 1,3-propanodiol oxidoredutase. A via redutora ocorre paralelamente à via oxidativa e com o objetivo de favorecer a via redutora, foram adicionados alguns elementos ao meio de fermentação identificados como ativadores das enzimas glicerol desidratase e 1,3-propanodiol oxidoredutase, além de uma fonte de nitrogênio.

Inicialmente, utilizou-se 1 e 10 g/L de glicerol proveniente da glicerina como fonte de carbono, em meios contendo ou não a suplementação de vitamina B12, COCl₂.6H₂O, K₂HPO₄, FeCl₃.6H₂O e extrato de levedura. As concentrações obtidas de 1,3-PDO estão apresentadas na Figura 31.

É possível observar que nos meios contendo a concentração inicial de 1 g/L de glicerol, os resultados de produção de 1,3-PDO são estatisticamente iguais (teste t com 95% de intervalo de confiança) nos meios suplementados ou não. Os rendimentos obtidos foram de 0,41 e 0,35 g/g, respectivamente, correspondendo às eficiências de 68% e 60%. Estes resultados indicam que não houve inibição das enzimas da via redutora, ou um grande desvio da fonte de carbono para a via oxidativa, visto que as concentrações finais de ácidos foram baixas (0,11 g/L de ácido acético e 0,10 g/L de ácido butírico; e 0,07 g/L de ácido acético e 0,10 g/L de ácido butírico; e 0,07 g/L de ácido

O aumento da concentração inicial de glicerol em 10 vezes resultou no aumento de 4,4 vezes na produção de 1,3-PDO em meio não suplementado e 7,5 vezes em meio

suplementado; as eficiências de conversão de glicerol a 1,3-PDO foram 30% e 61%, respectivamente. Desta forma, percebe-se uma diferença significativa de conversão do glicerol a 1,3-PDO. Adicionalmente, as concentrações finais de ácido acético e ácido butírico foram similares nas duas condições (respectivamente: 0,46 e 0,62 g/L em meio não suplementado contra 0,37 e 0,86 g/L em meio suplementado), indicando que houve favorecimento da via redutora mediante suplementação com B12, CO²⁺, Fe²⁺, K⁺ e extrato de levedura.



Figura 31. Concentração final de 1,3-PDO a partir de 1 ou 10 g/L de glicerol (glicerina) em meio sem suplementação (a) ou com suplementação (a) de 5 mg/L de vitamina B12, 5 mg/L de CoCl₂.6H₂O, 5 g/L de K₂HPO₄, 3 mg/L de FeCl₃.6H₂O e 1 g/L de extrato de levedura. Experimentos realizados em triplicata, em frascos de penicilina de 100 mL contendo 90 mL de meio, a pH 6,0, 35°C e 160 rpm. O inóculo utilizado foi lodo anaeróbio pré-tratado termicamente, a uma concentração de SSV de 7,5 g/L.

Estes resultados corroboram o estudo de HUANG; GONG e TSAO(2002), o qual mostrou que a adição de vitamina B12 e COCl₂ tem efeito positivo sobre a produção de 1,3-PDO a partir de glicerol, mesmo em concentrações reduzidas (5 mg/L), utilizando cultura pura de *Klebsiella pneumoniae* como inóculo. Em outro estudo, VIVEK e colaboradores (2017c) incluíram vitamina B12 como componente importante para o meio de produção de 1,3-PDO por *Lactobacillus brevis*. Adicionalmente, empregando lodo anaeróbio, PARANHOS e SILVA (2018) confirmaram que K⁺ e vitamina B12 exercem influência positiva significativa sobre a produção de 1,3-PDO a partir de glicerina. Utilizando cultivo de *Clostridium sp*.(1) WISCHRAL e colaboradores (2015) apontaram que K₂HPO₄ foi um dos componentes que mais influenciou positivamente a produção de 1,3-PDO, dentre 20 componentes investigados; (2) MARTINS e colaboradores (2020) selecionaram KH₂PO₄ entre os 6 principais componentes dentre 15 estudados para a composição do meio de produção de 1,3-PDO; isto provavelmente porque a enzima glicerol desidratase é ativada por K⁺ (JIANG et al., 2016). Outro componente apontado como estatisticamente significativo foi o FeSO₄ (MARTINS et al., 2020; MOON et al., 2011), o qual fornece Fe²⁺ ao meio, íon presente no sítio catalítico da enzima 1,3-propanodiol oxidoredutase. Extrato de levedura foi amplamente utilizado como fonte de nitrogênio, sendo apontado como fator significativo para a produção de 1,3-PDO a partir de glicerol (MARTINS et al., 2020; MOON et al., 2020; MOON et al., 2020; MOON et al., 2020; MOON et al., 2011; VIVEK et al., 2017c; WISCHRAL et al., 2015).

Para que se obtenha concentrações elevadas do produto de interesse e que se aproveite de forma eficiente o material empregado como matéria-prima no processo, há de se buscar a aplicação da maior concentração de substrato possível na alimentação. Por isso, foi realizada a produção de 1,3-PDO em meios suplementados contendo concentrações crescentes de glicerol, na faixa de 1 a 50 g/L, conforme apresentado na Figura 32.



Figura 32. Produção de 1,3-PDO (■) em meio suplementado contendo crescentes concentrações de glicerol
(■) (proveniente da glicerina). Valores após 24 h de fermentação nos processos contendo de 1 a 30 g/L e após 48 h nos processos contendo 35 ou 50 g/L. A eficiência de conversão de glicerol em 1,3-PDO (■) foi calculada em relação ao rendimento máximo teórico de 0,59 g-PDO/g-glicerol.
Eff=[(Y_{P/S}exp)/(Y_{P/S}teórico)]*100%.

Tabela 7. Concentração inicial de glicerol (S_i), consumo de substrato (RPS), concentrações finais de ácido acético (Hac), ácido butírico (Hbu), 1,3-PDO, rendimento de 1,3-PDO (Y_{P/S}) e eficiência de conversão de glicerol a 1,3-PDO. Valores após 24 h de fermentação nos processos contendo de 1 a 30 g/L e após 48 h nos processos contendo 35 ou 50 g/L. A eficiência de conversão de glicerol em 1,3-PDO foi calculada em relação ao rendimento máximo teórico de 0,59 g-PDO/g-glicerol. Eff=[(Y_{P/S}exp)/(Y_{P/S}teórico)]*100%. Meio não suplementado (○); meio suplementado (●).

S	Si	RPS	Hac (g/L)	Hbu (g/L)	1,3-PDO (g/L)	Y _{P/S} (g/g)	Eff. (%)
0	1 g/L	100,0% ± 0,0%	0,07 ± 0,01	0,12 ± 0,00	0,39 ± 0,02	0,35 ± 0,02	59,99 ± 0,02
0	10 g/L	98,9% ± 0,1%	0,46 ± 0,04	0,62 ± 0,04	1,74 ± 0,23	0,18 ± 0,02	30,10 ± 0,03
•	1 g/L	100,0% ± 0,0%	0,11 ± 0,05	0,10 ± 0,05	0,46 ± 0,03	0,41 ± 0,02	68,34 ± 0,04
•	10 g/L	95,7% ± 3,4%	0,37 ± 0,03	0,86 ± 0,13	3,47 ± 0,46	0,36 ± 0,05	60,82 ± 8,42
٠	20 g/L	59,6% ± 6,7%	0,45 ± 0,04	0,73 ± 0,11	3,40 ± 0,40	0,18 ± 0,01	30,70 ± 1,53
•	30 g/L	28,5% ± 0,0%	0,58 ± 0,05	0,63 ± 0,13	3,54 ± 0,40	0,12 ± 0,02	20,69 ± 2,95
٠	35 g/L	54,1% ± 1,3%	0,52 ± 0,09	0,79 ± 0,40	4,14 ± 0,25	0,12 ± 0,01	20,63 ± 1,26
•	50 g/L	52,7% ± 6,2%	0,63 ± 0,26	0,78 ± 0,01	4,96 ± 0,60	0,10 ± 0,01	16,35 ± 1,98

Houve um grande crescimento na produção de 1,3-PDO decorrente do aumento da concentração de glicerol de 1 g/L para 10 g/L, porém nas concentrações superiores a 10 g/L a produção de 1,3-PDO não acompanhou o teor de substrato disponível no meio. Dessa forma, os rendimentos decresceram com o aumento da concentração inicial de glicerol, resultando em eficiências cada vez menores.

Na Tabela 7 pode-se observar que o consumo de glicerol (RPS) decaiu com o aumento da concentração inicial de glicerol, de 96% em meio contendo 10 g/L para 53% em meio contendo 50 g/L, indicando uma possível inibição do metabolismo em função da concentração de substrato. Além disso, as concentrações de ácido acético e, principalmente, de ácido butírico sofreram pouca alteração frente à alteração da concentração inicial de substrato. Após aumento de 400% na concentração inicial de substrato, a produção de ácido acético cresceu apenas 69% e a de ácido butírico sofreu redução de 10%, reforçando os indícios de inibição por substrato.

WISCHRAL e colaboradores (2015) relataram 8 g/L de glicerol como a concentração ótima para produção de 1,3-PDO e consumo de substrato obtendo 3,85 g/L de 1,3-PDO; concentrações menores proporcionavam rendimentos similares ao ótimo, porém valores maiores levavam à redução do rendimento, resultado similar ao obtido neste estudo.

Existem trabalhos na literatura que apontam o consumo de concentrações de glicerol superiores a 50g/L, porém são utilizadas culturas puras de microrganismos précultivadas (MARTINS et al., 2020; VIVEK et al., 2017c). Utilizando lodo anaeróbio, PARANHOS e SILVA (2018) alcançaram 16,4 g/L de 1,3-PDO a partir de 30 g/L de glicerol ($Y_{P/S} = 0,57$ g/g) em batelada utilizando meio suplementado com K⁺, vitamina B12 além de sais e extrato de levedura, contudo o processo foi conduzido por 168 h, o que resulta em uma produtividade volumétrica de 0,097 g/(L.h), ou seja, 45% menor que a obtida neste trabalho ao se empregar 30 g/L (24 h); DIETZ e ZENG (2014) relataram a produção de 70 g/L ($Q_p = 2,6$ g/(L.h)) utilizando lodo anaeróbio de uma planta de biogás, porém em batelada alimentada.

Neste contexto, a abordagem mais promissora para produção de 1,3-PDO a partir de glicerol é o processo em batelada alimentada ou contínuo (CHEN et al., 2018), diminuindo assim a inibição do metabolismo pelo aumento da concentração do substrato ao mesmo tempo que promove a adaptação do inóculo ao meio de fermentação (DIETZ; ZENG, 2014). A concentração de 10 g/L é promissora para o início da alimentação, como ponto de partida para a avaliação das estratégias dos processos citados.

5.6. Otimização do meio de produção de H₂

A glicerina utilizada neste trabalho continha baixíssimos teores de nitrogênio e fósforo, conforme abordado na seção 5.1, contudo estes elementos são, de maneira geral, fundamentais para os processos fermentativos. O nitrogênio é essencial para a síntese de proteínas, de parede celular e de ácidos nucléicos (CAROSIA et al., 2017). O fósforo é requerido para síntese de ATP e de membrana celular, sendo crucial para a manutenção e o crescimento celular (CAROSIA et al., 2017; LIU et al., 2015).

Outro fator que pode limitar o metabolismo do glicerol é sua viscosidade, mais elevada que a do meio aquoso. A adição de surfactante ao meio de fermentação contendo glicerol leva à redução da tensão superficial e, consequentemente, da viscosidade do glicerol, tornando-o mais disponível, o que resulta no maior consumo de glicerol pelos microrganismos e no aumento da produção de H₂ (PACHAPUR et al., 2016).

Desta forma, as variáveis independentes escolhidas para a otimização do meio de produção de H₂ foram: a concentração de N, a concentração de P e a concentração de Tween 80.

5.6.1.Planejamento fatorial 2³

O planejamento fatorial 2³ (2 níveis e 3 variáveis independentes) foi escolhido como 1^ª etapa da otimização, devido ao número de parâmetros que se desejava avaliar (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Como foram selecionadas 3 variáveis independentes, é possível realizar um planejamento fatorial completo em 11 corridas experimentais (incluindo as 3 repetições do ponto central), conforme apresentado na Tabela 8. Foram realizadas réplicas do ponto central para viabilizar o cálculo do erro puro e a estimativa dos efeitos das variáveis, possibilitando assim a análise de variância e o ajuste do modelo linear proposto

Ensaio	N P		Twoon 80	H ₂
LIISalo		r	i ween oo	(mL/L)
1	-1	-1	-1	16,7
2	+1	-1	-1	29,1
3	-1	+1	-1	40,7
4	+1	+1	-1	41,0
5	-1	-1	+1	20,4
6	+1	-1	+1	32,6
7	-1	+1	+1	19,8
8	+1	+1	+1	36,3
9	0	0	0	41,0
10	0	0	0	45,5
11	0	0	0	43,9
Controle*	-	-	-	20,1

Tabela 8. Matriz experimental do planejamento fatorial 2³ e os resultados de volume específico de H₂ gerado em cada condição avaliada. Os experimentos 9, 10 e 11 são repetições do ponto central (nível 0).

* sem adição de fontes de N, P ou surfactante

Na Tabela 8 é possível observar que o volume específico de H₂ variou entre 16,7 mL/L e 45,5 mL/L, indicando que as diferenças de composição dos meios de fermentação afetam a produção de H₂. O volume específico de H₂ obtido no experimento controle (sem adição de fontes de N, P ou surfactante) foi de 20,1 ± 2,8 mL/L, este valor foi superior àquele obtido no ensaio 1 (16,7 mL/L), porém são muito próximos quando se considera o desvio experimental obtido nos pontos centrais. As réplicas do ponto central apresentaram variância pequena, indicando boa repetibilidade do processo.

De acordo com a ANOVA (Tabela 9) e com o gráfico de Pareto (Figura 33) as concentrações de N e P foram as variáveis com maior significância estatística, ou seja, com maior efeito sobre a produção de H₂. Ambas as contribuições dessas variáveis foram positivas, o que significa que o aumento das respectivas concentrações no meio de produção pode levar ao aumento da produção de H₂. Portanto, estas variáveis são importantes para o processo e, logo, devem constar no modelo matemático de predição da produção de H₂.

Fator	Soma dos	Grau de	Quadrado	F	n-valor
	Quadrados	Liberdade	Médio	•	P
Curvatura	423,2630	1	423,2633	82,26528	0,011939
(1) N	214,8170	1	214,8167	41,75169	0,023124
(2) P	190,0890	1	190,0891	36,94564	0,026015
(3) Tween 80	42,2450	1	42,2447	8,21066	0,103269
Interação 1x2	7,6860	1	7,6857	1,49379	0,346122
Interação 1x3	31,8880	1	31,8879	6,19772	0,130500
Interação 2x3	133,8880	1	133,8885	26,02250	0,036346
Falta de Ajuste	33,3080	1	33,3077	6,47368	0,125943
Erro Puro	10,2900	2	5,1451		
Total	1087,4740	10			

Tabela 9. ANOVA (análise de variância) do planejamento fatorial 2³. Fatores em negrito foram estatisticamente significativos no intervalo de confiança de 90%.

R² = 0,95991; Adj.= 0,86636

A concentração de Tween 80 foi marginalmente significativa (*p*-valor = 0,10327), e a interação entre fósforo e Tween 80 foi significativa; portanto a variável 'concentração de Tween 80' deve ser mantida na etapa seguinte do planejamento.

O coeficiente de determinação entre os dados experimentais e os dados preditos pelo modelo foi de 95,99% (Tabela 9). Além disso, a falta de ajuste do modelo e o erro puro não foram significativos, indicando que o modelo gerado possui bom ajuste com os dados experimentais, como também pode ser observado na Figura 34.



Figura 33. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados. As barras à direita da linha vermelha representam as variáveis que foram estatisticamente significativas (p< 0,1), ou seja, são relevantes para o processo e para o modelo matemático. Os valores ao lado das barras correspondem aos efeitos de cada variável e das interações entre variáveis, representando o peso de cada variável sobre a resposta.



Figura 34. Valores observados (o) versus valores preditos pelo modelo (-). Observa-se que houve bom ajuste do modelo aos resultados obtidos experimentalmente.

A análise de variância (Tabela 9) apontou que as faixas de concentração avaliadas encontram-se na região da curvatura (curvatura estatisticamente significativa), o que também pode ser observado na Tabela 8, onde as maiores produções de H₂ foram obtidas no ponto central. Desta forma, para que se obtenha um modelo quadrático basta adicionar os pontos axiais a este planejamento fatorial, tornando-o um delineamento composto central rotacional (DCCR).

5.6.2. Delineamento composto central rotacional com 3 fatores

A adição dos pontos axiais ao planejamento fatorial permite o cálculo de termos quadráticos; a partir desta adição o modelo linear anterior passa a ser um modelo quadrático, e assim, é possível visualizar a curvatura da superfície de resposta e obter-se um ponto de inflexão, que pode ser de máxima produção, mínima produção ou um ponto de sela (CALADO; MONTGOMERY, 2003). Por se tratar da etapa final da otimização, adotou-se um intervalo de confiança maior, de 95% (p-valor < 0,05).

Na Tabela 10 estão dispostos os resultados de volume específico de H₂ produzido em cada ensaio do DCCR. Cabe ressaltar que os ensaios 9, 10, 11, 12, 13 e 14 foram inseridos na matriz do planejamento fatorial 2^3 , realizado anteriormente, a fim de completar o modelo tornando-o um modelo quadrático. Em resumo: os ensaios de 1 a 8 correspondem aos pontos fatoriais, os ensaios de 9 a 14 aos pontos axiais e os ensaios 15, 16 e 17 são os pontos centrais.

Ensaio	Ν	Р	Tween 80	H ₂ (mL/L)
1	-1	-1	-1	16,7
2	-1	-1	+1	20,4
3	-1	+1	-1	40,7
4	-1	+1	+1	19,8
5	+1	-1	-1	29,1
6	+1	-1	+1	32,6
7	+1	+1	-1	41,0
8	+1	+1	+1	36,3
9	-1.68	0	0	36,6
10	+1.68	0	0	41,5
11	0	-1.68	0	39,2
12	0	+1.68	0	47,3
13	0	0	-1.68	37,0
14	0	0	+1.68	36,1
15	0	0	0	41,0
16	0	0	0	45,5
17	0	0	0	43,9
Controle	-	-	-	20,1

Tabela 10. Matriz experimental do DCCR com 3 fatores e produções específicas de H₂ em cada condição. Em negrito, os ensaios que foram adicionados à matriz anterior, referentes aos pontos axiais.

A análise de variância do DCCR (Tabela 11) mostra que com ampliação das faixas de estudo, a concentração de Tween 80 passa a ser estatisticamente significativa e devem ser considerados no modelo matemático tanto seu termo linear, quanto seu termo quadrático, indicando forte influência desta variável sobre a produção de H₂. A concentração de N também exerce forte influência sobre a produção de H₂, visto que seu termo quadrático foi estatisticamente significativo. A concentração de P foi significativa (termo linear), assim como a interação entre as concentrações de P e Tween 80.

Fator	Soma dos	Grau de	Quadrado	F	n valor
	Quadrados	Liberdade	Médio	F	p-valor
(1) N (L)	25,981	1	25,9809	5,0496	0,153656
N (Q)	157,849	1	157,8494	30,6796	0,031083
(2) P (L)	143,099	1	143,0985	27,8126	0,034125
P (Q)	58,155	1	58,1550	11,3030	0,078231
(3) Tween 80 (L)	193,062	1	193,0618	37,5234	0,025630
Tween 80 (Q)	242,008	1	242,0082	47,0366	0,020605
Interação 1Lx2L	7,686	1	7,6857	1,4938	0,346122
Interação 1Lx3L	31,888	1	31,8879	6,1977	0,130500
Interação 2Lx3L	133,888	1	133,8885	26,0225	0,036346
Falta de Ajuste	420,905	5	84,1810	16,3614	0,058597
Erro Puro	10,290	2	5,1451		
Total	1330,188	16			

Tabela 11. ANOVA (análise de variância) do DCCR. Fatores em negrito foram estatisticamente significativosno intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05).</td>

R2 = 0,67584; Adj. = 0,25906

Embora o coeficiente de determinação tenha sido de 0,67584, a falta de ajuste do modelo não foi significativa, indicando que o modelo quadrático obtido é confiável para descrever a produção de H₂ em função das concentrações de N, P e Tween 80. Com base nos efeitos das variáveis, que podem ser observados no gráfico de Pareto (Figura 35), os termos concentração de Tween 80 (quadrático e linear), Concentração de N (quadrático), concentração de P (linear) e interação entre P e Tween 80 devem compor o modelo matemático.



Figura 35. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados. As barras à direita da linha vermelha representam as variáveis que foram estatisticamente significativas (*p*< 0,05). Os valores ao lado das barras correspondem aos efeitos de cada variável e das interações entre variáveis.

Deste modo, o modelo matemático que descreve o volume específico de H₂ produzido em função das concentrações de Tween 80, N e P é o seguinte Equação 11:

 $H_2(mL_{H2}/L) = 44.12 - 3.74^*[N]^2 - 4.63^*[Tween 80]^2 + 3.85^*[P] - 1.46^*[Tween 80] - 4.09^*[P]^*[Tween 80]$

Equação 11

Na qual,

H₂: volume específico de H₂ produzido

[N]: concentração de nitrogênio no meio de fermentação

[Tween 80]: concentração de Tween 80 no meio de fermentação

[P]: concentração de fósforo no meio de fermentação

Para melhor entendimento da influência das variáveis sobre a resposta, foram geradas 3 superfícies de resposta (Figura 36). Desta forma pode-se claramente observar a presença de um ponto de máximo em concentrações medianas a baixas de Tween 80, altas concentrações de P e concentrações medianas a altas de N, considerando as faixas de concentrações estudadas.

A variável de maior significância estatística foi a concentração de Tween 80. A presença de surfactante no meio de fermentação provoca a diminuição da tensão superficial e a viscosidade de glicerol, resultando na maior disponibilidade desta molécula para consumo pelos microrganismos (WANG; TIU; LIU, 1996). O que pode explicar o aumento de 77% no volume de H₂ produzido ao adicionar-se Tween 80 a 0,5% no meio contendo POME (do inglês, *palm oil mill effluent*), um material mais viscoso que os meios aquosos tradicionais (LEAÑO; BABEL, 2012). PACHAPUR e colaboradores (2016) identificaram aumento do consumo de glicerol de 78% para 91% com consequente aumento da produção de H₂ em 22% mediante adição de 15 mg/L de Tween 80.

O aumento do volume específico de H₂ produzido neste trabalho não se deve somente à adição de surfactante no meio de fermentação, mas também à adição de N e P, como pode ser observado na Figura 36 A e C. Na Figura 36 B, que mostra o volume específico de H₂ produzido em função das concentrações de N e P, é possível observar que os resultados com a produção mais elevada foram obtidos em meios contendo concentrações mais altas tanto de N quanto de P. SREETHAWONG e colaboradores (2010) mostraram a relação entre a concentração de N no meio de fermentação e o consumo de substrato, segundo os autores houve menor produção de H₂ em concentrações elevadas de N (1,3 g/L) e também em concentrações mais baixas, evidenciando a necessidade de se definir a faixa de concentração de N adequada para o processo, o que varia de acordo com a matériaprima utilizada.

DEMOLING; FIGUEROA; BÅÅTH (2007) pontuaram que o crescimento bacteriano em ambiente anaeróbio não é limitado apenas pela disponibilidade de fonte de carbono, mas também pela limitação de N e P, chamada de limitação secundária. Porém, o fornecimento destes elementos no meio de fermentação deve ocorrer de forma balanceada, visto que o excesso de N ou P pode resultar em desvios na via metabólica, levando à diminuição da produção de H₂ (ARGUN et al., 2008; CAROSIA et al., 2017), o que pode ser observado na Figura 36 B, onde elevada concentração de N combinada com baixa concentração de P, ou elevada concentração de P associada à baixa concentração de N resultam em valores mais baixos para o volume específico de H₂ produzido (região verde da superfície de resposta).


Figura 36. Superfícies de resposta do volume específico de H₂ produzido em função das concentrações de (A) Tween 80 e P, (B) P e N, e (C) Tween 80 e N. As regiões vermelhas correspondem às máximas produções de H₂, enquanto as regiões verdes representam os menores valores desta resposta.

Neste ponto, faz-se necessária a determinação dos valores das variáveis no ponto ótimo, obtido a partir de derivações do modelo quadrático e da realização dos testes da derivada primeira e da derivada segunda, sequencialmente. O máximo volume específico de H₂ predito pelo modelo foi de 47,9 mL/L, empregando-se 6,6 mg/L de N, 2,8 mg/L de P e 5,7 mg/L de Tween 80 (condição otimizada).

Observa-se que a adição de fontes de N e P se faz necessária para a produção satisfatória de H₂, assim como a adição de surfactante Tween 80. Com base neste estudo, e na determinação dos teores de N, P e Tween 80 que levam à máxima produção de H₂, podese buscar materiais residuais para serem empregados como fonte de N e P e biossurfactante em substituição ao Tween 80 e, desta forma, tornar o processo mais renovável.

5.6.3. Validação experimental

Experimentos de validação foram realizados nas condições ótimas, tanto em frascos de penicilina quanto em reatores manométricos, com a finalidade de verificar se o modelo matemático forneceu uma predição satisfatória (95% de confiança) e se é possível alterar o sistema reacional – de frasco de penicilina para reator manométrico – sem prejuízos para o estudo. Na Tabela 12 estão apresentados os resultados obtidos nos experimentos de validação da otimização. Observa-se que tanto em frascos de penicilina quanto em reatores manométricos os valores de volume específico de H₂ encontram-se dentro do intervalo de 95% de confiança, indicando que o modelo gerado é adequado para representar o processo experimental. Ainda, os resultados obtidos por fermentação em reator manométrico foram 18% superiores àqueles alcançados em frasco de penicilina, provavelmente devido à vedação mais efetiva e resistente a pressão.

Tabela 12. Valores preditos e valores observados experimentalmente para o volume específico de H₂ na condição otimizada (6,6 mg/L de N, 2,8 mg/L of P e 5,7 mg/L de Tween 80). Os limites -95% e +95% representam a faixa onde a resposta experimental valida o modelo matemático, considerando-se um intervalo de confiança de 95%, baseado em uma distribuição normal. N_{frasco}=5; N_{Reator}=3

P (mL/L)	Lim	ites	Valor	Valor	
	-95%	+95%	Predito	Observado	
Frasco de penicilina	39,2	56,7	47,9	47,5 ± 2,1	
Reator	39,2	56,7	47,9	56,2 ± 2,8	

Com a utilização dos reatores manométricos foi possível acompanhar a produção de H_2 ao longo do tempo, obtendo-se dados suficientes para realizar a modelagem do volume específico de H_2 pela equação de Gompertz modificada, conforme mostrado na Figura 37. O coeficiente de determinação obtido nesta modelagem foi de 0,97, indicando bom ajuste. Através desta modelagem, estimou-se o volume específico de H_2 máximo de 57,9 mL/L, a uma taxa máxima de produção de 8,9 mL/(L.h) alcançada entre 20 e 22 h de fermentação, tendo uma fase adaptativa de 16,9 h.



Figura 37. Volume específico de H₂ ao longo do tempo representada por dados experimentais (■) e curva modelada pela equação de Gompertz modificada (–); N=2. Ensaios conduzidos em reatores manométricos de 300 mL contendo 270 mL de meio de fermentação composto por 3 g/L de glicerol proveniente da glicerina, 7,5 g_{ssv}/L, 6,6 mg/L de N, 2,8 mg/L of P e 5,7 mg/L de Tween 80. As fermentações ocorreram em pH 6,0, a 35°C e 160 rpm.

Como o lodo anaeróbio foi pré-tratado termicamente para promover a eliminação das arqueias metanogênicas, as bactérias produtoras de H₂, encontravam-se na forma de endósporos no final do pré-tratamento e, logo, no início da fermentação. Ao serem incubadas em pH, temperatura e nutrientes adequados, estas bactérias tendem a se hidratar, retomando sua forma celular biologicamente ativa. Este processo pode ser observado na forma de fase adaptativa (entre 0 h e 17 h - Figura 37).

De 17 h a 24 h de processo fermentativo, observou-se uma fase exponencial de produção de H₂, relacionada à acidogênese e à fase exponencial de crescimento bacteriano (KAMALASKAR et al., 2016). A partir de 24 h a produção de H₂ cessou, indicando o final da fermentação do glicerol.

O meio fermentado foi analisado somente no final do processo, onde se obteve 0,2 g/L de ácido acético, 0,5 g/L de ácido butírico e 1,5 g/L de 1,3-PDO, além do consumo de 99% do glicerol. Os ácidos acético e butírico são produzidos concomitantemente à produção de H₂ pela via oxidativa, enquanto o 1,3-PDO é produzido paralelamente, pela via redutora do glicerol, representando uma via concorrente à de produção de H₂, o que leva à diminuição dos rendimentos deste gás. Portanto é necessário se estudar uma estratégia de favorecimento da via oxidativa, frente à redutora.

5.7. Influência do volume de *headspace* e da concentração inicial de glicerol sobre a produção de H₂

A pressão do sistema em batelada afeta negativamente a produção de H₂ (LEE et al., 2012; NUNES FERRAZ JÚNIOR et al., 2020), portanto existem diferentes estratégias para se promover a redução da pressão em escala de laboratório e, consequentemente, o aumento da produção de H₂, tais como retirada do biogás produzido (CLARK; ZHANG; UPADHYAYA, 2012; NUNES FERRAZ JÚNIOR et al., 2020), uso de respirômetro (LOGAN et al., 2002), emprego de elevado volume de *headspace* (OH et al., 2009) e aplicação de vácuo (LEE et al., 2012).

Nesta pesquisa, a forma mais prática de se reduzir a pressão no reator, considerando-se a estrutura laboratorial existente, foi o emprego de maior volume de *headspace*, o que também contribui para a melhor homogeneização do meio de fermentação, proporcionando maior interação entre inóculo e substrato. Assim sendo, realizou-se a fermentação de 3 g/L de glicerol em meio otimizado, empregando-se 15%, 50% ou 75% de *headspace* no reator.

Na Figura 38 estão expressas as pressões nos reatores e os respectivos volumes específicos de H_2 observados em cada condição. Cabe ressaltar que nos experimentos realizados anteriormente utilizou-se 10% de *headspace*, 10 mL para os ensaios realizados em frascos de penicilina (Vt = 100 mL) e 30 mL para os ensaios conduzidos em reatores manométricos (Vt = 300 mL).



Figura 38. Volume específico de H₂ (■) e pressão interna no reator (■) em diferentes percentuais de *headspace*. Experimentos realizados em duplicata em reatores manométricos com capacidade total de 300 mL, contendo 3 g/L de glicerol proveniente da glicerina, 5,7 mg/L de Tween 80, 6,6 mg/L de N (14,1 mg/L de ureia) 2,8 mg/L de P (6,1 mg/L de KH₂PO₄ e 7,9 mg/L de K₂HPO₄), 7,5 g_{ssv}/L de lodo anaeróbio pré-tratado termicamente, a pH 6,0, 35°C e 160 rpm por 24 h.

Observa-se que o volume específico de H₂ acumulado no reator aumentou de forma inversamente proporcional à pressão interna do reator, ou seja, quanto maior o volume de *headspace*, menor a pressão interna e maior a produção de H₂. O aumento do volume de *headspace* de 10% (condição anterior) para 15% não resultou em aumento significativo do volume específico de H₂, porém, foi possível elevar o volume específico de H₂ em 91% apenas aumentando o *headspace* de 15% para 50%, alcançando o valor de 93 mL/L.

Apesar de possuírem médias distintas, não houve diferença estatística (teste t com 95% de confiança) entre as produções específicas de H₂ alcançadas nos ensaios em que se empregou 50% ou 75% de volume de *headspace*. Isto porque o uso do volume muito elevado de *headspace* dificultou a coleta da amostra gasosa, resultando em um desvio padrão elevado no ensaio em que se empregou 75% de *headspace*.

Apesar do relevante aumento no volume específico de H₂ produzido, a concentração inicial de glicerol empregada neste sistema ainda é baixa, levando a volumes reduzidos de H₂ no final do processo e demandando grande diluição da matéria-prima. Por isso, avaliou-se a produção de H₂ em diferentes concentrações de glicerol, mas com o volume de *headspace* fixado em 50%.

Alguns trabalhos disponíveis na literatura apontam o ajuste das relações C/N e C/P como cruciais para a produção satisfatória de H₂; valores próximos de 200 para C/N e de 700 a 1000 para C/P foram apontados como promissores (ARGUN et al., 2008; CAROSIA et al., 2017; OZTEKIN et al., 2008). Neste trabalho as razões C/N e C/P eram 304 e 24.409 no meio não suplementado, enquanto as do meio suplementado (otimizado) eram 128 e 508, respectivamente. A fim de se manter as razões C/N e C/P definidas na otimização, adicionouse fontes de N e P proporcionalmente ao aumento da concentração de glicerol; o mesmo foi feito com Tween 80. A Figura 39 apresenta os resultados de volume específico e de rendimento de H₂ alcançados em cada um destes ensaios.

É possível observar o aumento no volume específico de H₂ relacionado ao aumento da concentração inicial de glicerol, de 3 a 7 g/L, e uma pequena queda na produção obtida com 9 g/L, porém os rendimentos em H₂ não acompanharam o mesmo perfil obtido para os resultados de volume específico, indicando um possível desvio na via metabólica. Comparando-se estes resultados com os resultados da etapa anterior (3 g/L, sem otimização do meio de fermentação) tem-se um aumento de quase 14 vezes no volume específico de H_2 produzido, o que representa um ganho efetivo de 97% (considerando-se o aumento da concentração inicial de glicerol).



Figura 39. Volume específico (**a**) e rendimento (**a**) de H₂ em diferentes concentrações iniciais de glicerol proveniente da glicerina. Experimentos realizados em duplicata em reatores manométricos com capacidade total de 300 mL, contendo 150 mL de meio (50% de *headspace*), 7,5 g_{SSV}/L de lodo anaeróbio pré-tratado termicamente, a pH 6,0, 35°C e 160 rpm. Para cada 1g/L de glicerol foram adicionados 1,9 mg/L de Tween 80, 2,2 mg/L de N (4,7 mg/L de ureia) 0,9 mg/L de P (2,0 mg/L de KH₂PO₄ e 2,6 mg/L de K₂HPO₄). A fermentação durou 24 h.

A Tabela 13 mostra os valores iniciais e finais de glicerol no meio de fermentação, bem como seu percentual de consumo, a pressão final do reator e as concentrações finais de ácidos acético e butírico e de 1,3-PDO. Tabela 13. Concentrações de glicerol oriundo de glicerina no início (Si) e no final (Sf) dos ensaios, fermentativos, redução percentual de substrato (RPS), pressão interna do reator no final da fermentação

(P_{int,f}) e concentrações de ácido acético (Hac), 1,3-PDO e ácido butírico (Hbu) após 24 h de processo. Experimentos realizados em duplicata em reatores manométricos com capacidade total de 300 mL, contendo 150 mL de meio (50% de *headspace*), 7,5 g_{SSV}/L de lodo anaeróbio pré-tratado termicamente, a pH 6,0, 35°C e 160 rpm. Para cada 1g/L de glicerol foram adicionados1,9 mg/L de Tween 80, 2,2 mg/L de N (4,7 mg/L de ureia) 0,9 mg/L de P (2,0 mg/L de KH₂PO₄ e 2,6 mg/L de K₂HPO₄).

Glicerol (concentração inicial)	3 g/L	5 g/L	7 g/L	9 g/L
S _i (g/L)	3,31	5,09	7,27	8,50
S _f (g/L)	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,04 ± 0,04	0,13 ± 0,07
RPS	97,4% ± 0,1%	98,2% ± 0,1%	99,5% ± 0,6%	98,5% ± 0,8%
P _{int,f} (atm)	1,50 ± 0,02	1,51 ± 0,03	1,80 ± 0,02	1,78 ± 0,01
Hac _f (g/L)	0,32 ± 0,01	0,29 ± 0,03	0,28 ± 0,02	0,35 ± 0,03
1,3-PDO _f (g/L)	1,15 ± 0,05	2,49 ± 0,17	3,59 ± 0,15	4,21 ± 0,07
Hbu _f (g/L)	0,19 ± 0,02	0,43 ± 0,02	0,83 ± 0,01	0,86 ± 0,04

Em todas as condições houve consumo praticamente total do substrato, mostrando que não houve inibição do processo fermentativo. Contudo, observa-se uma preferência pela produção de ácido butírico em detrimento do ácido acético; por ser um ramo da via oxidativa que resulta em menor produção de H₂, a via butírica acarreta em menor rendimento em H₂, explicando porque o aumento do rendimento não acompanhou o aumento da produção quando se aplicou entre 3 e 7 g/L de glicerol inicial. Isto pode ter ocorrido devido ao aumento da pressão no reator ou devido à maior concentração de H₂ no *headspace*, posto que a via acética prevalece em baixas pressões parciais de H₂, enquanto a via butírica prevalece em altas pressões parciais de H₂ justamente para frear a produção de H₂ e, consequentemente, a concentração de 1,3-PDO teve um perfil crescente conforme o crescimento da concentração de glicerol no início da fermentação, indicando um possível desvio do fluxo de carbono para a via redutora do metabolismo de glicerol. Estes resultados podem ser relevantes para a produção de 1,3-PDO, visto que a suplementação realizada para favorecer a produção de H_2 é mais barata que aquela empregada para produção de 1,3-PDO e também possibilitou o aumento da produção do mesmo.

Desta forma, o mais interessante seria empregar o processo fermentativo suplementado com Tween 80, nitrogênio e fósforo para a produção de H₂ e 1,3-PDO dentro do contexto de biorrefinaria da glicerina. A separação do 1,3-PDO do meio fermentativo deve ser investigada futuramente de forma a valorizar a pesquisa aqui desenvolvida.

Como a condição mais favorável para produção de H₂, dentre as avaliadas, foi 7 g/L de glicerol inicial, realizou-se o acompanhamento desta produção ao longo do tempo, em meio contendo a suplementação otimizada e em meio sem suplementação. Na Figura 40 estão representados os dados experimentais e a modelagem das produções utilizando-se a equação de Gompertz modificada.



Figura 40. Volume específico de H₂ em meio não suplementado (□) e em meio suplementado com 13,3 mg/L de Tween 80, 15,4 mg/L de N (32,9 mg/L de ureia) 6,3 mg/L de P (14,0 mg/L de KH₂PO₄ e 18,2 mg/L de K₂HPO₄)(▲) em função do tempo. Experimentos realizados em duplicata em reatores manométricos com capacidade total de 300 mL, contendo 150 mL de meio (50% de *headspace*), 7 g/L de glicerol (glicerina), 7,5 g_{SSV}/L de lodo anaeróbio pré-tratado termicamente, pH 6,0, a 35°C e 160 rpm.

O volume específico de H₂ máximo obtido em meio suplementado foi de 292 mL/L, 25% superior ao alcançado em meio não suplementado (233 mL/L), corroborando os resultados obtidos na etapa de otimização do meio de fermentação (seção 5.6). Na Tabela 14 encontram-se os dados de composição final do meio fermentado. Observa-se que houve consumo total do substrato em ambas as condições, porém no meio suplementado houve maior produção de ácido acético, via que possui maior rendimento teórico H₂ (vide equações 4 e 5). Adicionalmente, a produção de 1,3-PDO foi 40% superior em meio suplementado, indicando que a suplementação do meio não favoreceu somente a via oxidativa, mas também a via redutora do metabolismo de glicerol.

Tabela 14. Concentrações de glicerol oriundo de glicerina no início (S_i) e no final (S_f) dos ensaios, fermentativos, redução percentual de substrato (RPS) e concentrações de ácido acético (Hac), 1,3-PDO e ácido butírico (Hbu) após 28 h de processo. Experimentos realizados em duplicata em reatores manométricos com capacidade total de 300 mL, contendo 150 mL de meio (50% de *headspace*), 7 g/L de glicerol (glicerina), 7,5 g_{SSV}/L de lodo anaeróbio pré-tratado termicamente, a pH 6,0, 35°C e 160 rpm. SS: meio sem suplementação; CS: meio suplementado com 13,3 mg/L de Tween 80, 15,4 mg/L de N (32,9 mg/L de ureia) 6,3 mg/L de P (14,0 mg/L de KH₂PO₄ e 18,2 mg/L de K₂HPO₄).

	SS	CS
S _i (g/L)	7,86	7,83
S _f (g/L)	0,06 ± 0,02	0,07 ± 0,06
RPS	99,2% ± 0,3%	6 99,1% ± 0,8%
Hac _f (g/L)	0,25 ± 0,02	0,37 ± 0,01
1,3-PDO _f (g/L)	2,82 ± 0,03	3,99 ± 0,02
Hbu _f (g/L)	0,95 ± 0,05	0,92 ± 0,02

Os resultados apresentados revelam que a suplementação do meio contendo glicerina com nitrogênio e fósforo promoveu melhorias na produção de H₂ e favoreceu também a via redutora, resultando no aumento da produção de dois dos produtos de interesse no presente trabalho. A adição de sais não é indicada no contexto de química verde, porém a substituição destes sais por fontes renováveis e residuais de N e P apresenta-se como possível solução para este impasse. Tendo em mente as concentrações de N e P

necessárias para o estímulo do processo fermentativo, pode-se buscar suplementações alternativas dentro dos resíduos brasileiros que forneçam estes sais ao meio de fermentação. O Tween 80, que atua como surfactante, pode ser substituído por biossurfactante de forma a não comprometer a sustentabilidade do processo.

Além disso, a pressão total do sistema pode levar a alterações na produção de H₂, representando um fator importante para o processo. Concentrações acima de 7 g/L levam à redução do rendimento em H₂; neste caso, deve-se investigar formas alternativas de condução do processo, como o reciclo do inóculo, a alimentação em pulsos ou contínua do processo e retirada do biogás produzido. Como o 1,3-PDO é gerado inevitavelmente quando o substrato é glicerol, é interessante que se investiguem métodos de separação do mesmo, de forma a valorizar o processo global.

Devido ao metabolismo do glicerol ocorrer em duas vias paralelas e dependentes, a produção de H₂ a partir desta fonte de carbono leva a rendimentos muito inferiores ao rendimento máximo teórico (3 mol_{H2}/mol_{glicerol}). Na Tabela 15 são apresentados resultados decorrentes de diferentes pesquisas para produção de H₂ via fermentação de glicerol, em processo batelada. Observa-se que poucos trabalhos relatam rendimentos superiores a 1 mol/mol, o que corresponde a 33% de eficiência. Assim sendo, este tipo de substrato deve ser considerado sempre numa abordagem de biorrefinaria. Em tal sistema, a mesma matéria-prima é usada com diferentes propósitos, ratificando a abordagem tecnológica escolhida no presente estudo.

Alguns trabalhos relatam o uso de meios de fermentação complexos, com mais de 10 componentes, o que os torna caros e mais difíceis de serem empregados em escala maior ou em processo alimentado (JÁUREGUI; LADINO; MALAGÓN-ROMERO, 2018; MANGAYIL et al., 2015; POLETO et al., 2016). Outros trabalhos utilizam uma segunda fonte de carbono, além do glicerol, no meio de fermentação, como OPDC – *palm oil decanter cake* – (KANCHANASUTA; PISUTPAISAL, 2017) e esgoto sanitário (VARELLA RODRIGUES et al., 2020), superestimando os rendimentos de H₂ a partir de glicerol.

	Fonte de		V.a	Tompo do	
Inóculo	glicerol	Composição do meio de fermentação (g/L)	(mal/mal)	formontação	
	(S _i)			lennentaçao	
		4,4 NH ₄ Cl; 1,6 K ₂ HPO ₄ ; 2,27 KH ₂ PO ₄ ; 1,0			
Clostridium spp isolados de lodo	glicerina	MgCl ₂ .6H ₂ O; 1,0 KCl; 1,0 Na-acetato.3H ₂ O;	1 4 2 b	72 h	[1]
anaeróbio	(1 g/L)	2,0 tryptona; 0,05 Naditionita e 0,002	1,42		[1]
		resazurina.			
Lodo granular termofílico	glicerina	5,0 peptona; 5,0 extrato de levedura; 5,0	0.9	54,8 h	[2]
	(3 g/L)	extrato de carne.	0,8		[2]
Lodo anacróbio granular adaptado	glicerina	0.21 urgia: 0.58 Na. HPO. : and an utriantes	1 1 2	160 h	[2]
	(4 g/L)	$0,21$ drefa, $0,58$ Na ₂ r 0_4 , endorathentes.	1,15		[3]
Lodo anacrábio granular adaptado	glicerina	E ovtrato do lovodura, osgoto capitário	0.74	EOb	[4]
	(7 g/L)	5 extrato de levedura, esgoto sanitano	0,74	5011	[4]
		1 K ₂ HPO ₄ ; 0,5 KH ₂ PO ₄ ; 1extrato de		42 h	
Clostridium acetobutylicum ATCC 824	glicerol	levedura; 0,2 MgSO ₄ .7H ₂ O; 2 (NH ₄) ₂ SO ₄ ;	0.27		[5]
	(10 g/L)	0,015CaCl ₂ ;0,005 FeSO ₄ .7H ₂ O; e 2mL/L de	0,37		[5]
		solução micro-mineral.			

Tabela 15. Comparação entre os resultados obtidos nesta tese, para produção de H₂, e outros resultados relatados na literatura, em batelada.

Lodo anaeróbio granular lavado e	glicerina	2% m/u do nalm oil doorntor cake (OPDC)	0.12	26 h	[6]
reativado em glicose, sem pré-tratamento	(15 g/L)	2% m/v de paim on decanter cake (OPDC)	0,13	30 11	[0]
		7 K ₂ PO ₄ ; 5,5 KH ₂ PO ₄ ; 1 (NH ₄) ₂ SO ₄ ;			
		0,25MgSO ₄ .7H ₂ O; 0,021 CaCl ₂ .2H ₂ O;			
Desillus and the of size is a lade de sure	-1::	0,12Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O; 0,002 ácido nicotinico;			[7]
mistura de resíduos	glicerina (15 g/L)	0,000172 Na ₂ SeO ₃ ; 0,00002 NiCl ₂ ; 5	0,5	48 h	
		triptona; 5 extrato de levedura; 0,5			
		MnCl ₂ .H ₂ O; 0,1 H ₃ BO ₃ ; 0,5 Na ₂ EDTA; 0,001			
		CuCl ₂ .H ₂ O; 0,01 Alk(SO ₄) ₂ .			
	aliaarina	13,3 mg/L de Tween 80; 32,9 mg/L de			osto
Lodo anaeróbio	gilcerina (7 g/L)	ureia; 14,0 mg/L de KH₂PO₄ e 18,2 mg/L de	0,14	26 h	este
		K ₂ HPO ₄ .			trabalho
^a Dendimente (med. /med.), ^b med. /me	. 1	Cu anno antro año inicial de elicensel			

^aRendimento (mol_{H2}/mol_{glicerol}); ^b mol_{H2}/mol_{glicerolconsumido}. S_i: concentração inicial de glicerol
 [1] (MANGAYIL et al., 2015); [2](RODRIGUES et al., 2019); [3] (JÁUREGUI; LADINO; MALAGÓN-ROMERO, 2018)(SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2018); [4](VARELLA RODRIGUES et al., 2020); [5]; [6] (KANCHANASUTA; PISUTPAISAL, 2017); [7](POLETO et al., 2016).

A adaptação do inóculo antes do processo fermentativo foi uma técnica bastante empregada nos artigos encontrados na literatura como estratégia para enriquecer o inóculo e reduzir a fase adaptativa, resultando em maiores produtividades e maior capacidade de consumo de glicerol em concentrações mais elevadas (JÁUREGUI; LADINO; MALAGÓN-ROMERO, 2018; KANCHANASUTA; PISUTPAISAL, 2017; MANGAYIL et al., 2015; POLETO et al., 2016; RODRIGUES et al., 2019; SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2018; VARELLA RODRIGUES et al., 2020).

Alguns autores avaliaram concentrações iniciais de glicerol superiores a 15 g/L (JÁUREGUI; LADINO; MALAGÓN-ROMERO, 2018; KANCHANASUTA; PISUTPAISAL, 2017; VARELLA RODRIGUES et al., 2020), porém isso acarretou a redução do consumo de substrato e a diminuição da produção de H₂, conforme também observado neste estudo. Verifica-se, portanto, a necessidade de se conduzir o processo fermentativo de forma alimentada, seja em batelada alimentada, processo semi-contínuo ou processo contínuo de mistura completa, para que o inóculo seja capaz de metabolizar maiores quantidades de glicerol e, logo, produzir quantidades maiores de H₂.

O rendimento obtido neste trabalho foi reduzido frente aos demais encontrados na literatura, porém o inóculo aqui utilizado não foi adaptado, o que acarreta uma etapa a menos no processo global, simplificando-o. Adicionalmente, o meio de fermentação utilizado nesta pesquisa foi composto apenas por quatro componentes além da glicerina, configurando-se como um meio mais simples e mais barato comparado à maioria do trabalhos mencionados anteriormente. Cabe ressaltar também que o tempo de fermentação empregado nesta pesquisa (26 h) foi o menor dentre os trabalhos selecionados, que levavam de 36 h a 160 h para atingir a máxima produção de H₂.

Na Figura 41 pode-se observar a evolução do volume específico e da produtividade volumétrica de H₂ ao longo do desenvolvimento desta tese. Nota-se que foi possível aumentar o volume específico de H₂ produzido em 10 vezes e a produtividade volumétrica em 17 vezes mediante aumento de 7 vezes na concentração inicial de glicerol, evidenciando a influência da otimização dos componentes do meio de fermentação e do ajuste do volume de *headspace* empregado no sistema reacional sobre a produção de H₂.

122

Considerando-se os resultados obtidos até aqui, verifica-se que houve uma grande evolução da produção de H₂ desde o sistema inicial até o sistema final, porém ainda existem maneiras de melhorá-lo de forma a torná-lo mais eficiente como, por exemplo, a alteração da forma de condução – de batelada simples para batelada alimentada – ou realizar o reciclo do inóculo, promovendo a adaptação do mesmo – neste caso o processo semi-contínuo pode ser mais interessante.



Figura 41. Evolução dos resultados de produção de H₂ ao longo do desenvolvimento da tese em termos de volume específico (■) e produtividade volumétrica (■). A descrição de cada etapa consta na Tabela 16.

Pré-tratamento	Sistema reasional	c:	Hondenaco	Suplementação	
do lodo anaeróbio	Sistema reacional	31	пециярисе		
Ácido	Frasco de penicilina	1 g/L	10%	não	
Térmico	Frasco de penicilina	1 g/L	10%	não	
Térmico	Frasco de penicilina	3 g/L	10%	sim	
Térmico	Reator manométrico	3 g/L	10%	sim	
Térmico	Reator manométrico	3 g/L	50%	sim	
Térmico	Reator manométrico	7 g/L	50%	sim	
	Pré-tratamento do lodo anaeróbio Ácido Térmico Térmico Térmico Térmico	Pré-tratamento do lodo anaeróbioSistema reacionalÁcidoFrasco de penicilinaTérmicoFrasco de penicilinaTérmicoFrasco de penicilinaTérmicoReator manométricoTérmicoReator manométricoTérmicoReator manométrico	Pré-tratamento do lodo anaeróbioSistema reacionalSiÁcidoFrasco de penicilina1 g/LTérmicoFrasco de penicilina1 g/LTérmicoFrasco de penicilina3 g/LTérmicoReator manométrico3 g/LTérmicoReator manométrico3 g/LTérmicoReator manométrico3 g/LTérmicoReator manométrico3 g/L	Pré-tratamento do lodo anaeróbioSistema reacionalSi HeadspaceÁcidoFrasco de penicilina1 g/L10%TérmicoFrasco de penicilina1 g/L10%TérmicoFrasco de penicilina3 g/L10%TérmicoReator manométrico3 g/L10%TérmicoReator manométrico3 g/L50%TérmicoReator manométrico7 g/L50%	

Tabela 16. Descrição das condições experimentais das etapas mencionadas na Figura 41. Si: concentração inicial de glicerol.

5.8. Produção sequencial de H₂ e CH₄

Com o intuito de promover um melhor aproveitamento energético da matériaprima, o efluente da produção de H₂ gerado no processo anterior (seção 5.7) foi utilizado como matéria-prima para a produção de CH₄ (CS). Este efluente possui metabólitos orgânicos, como ácido acético, ácido butírico e 1,3-PDO, que podem ser utilizados como fonte de carbono no processo de digestão anaeróbia. Neste caso, bactérias acetogênicas e arqueias metanogênicas acetoclásticas são os principais microrganismos envolvidos neste processo (RAWOOF et al., 2020). A título de comparação, realizou-se a produção de H₂ em meio simples, contendo apenas glicerina, lodo anaeróbio e água, e utilizou-se este efluente para a metanogênese (SS). Os perfis cinéticos de produção de CH₄ a partir destes efluentes de produção de H₂ estão apresentados na Figura 42.



Figura 42. Cinética de produção de CH₄ utilizando EPH como matéria-prima. Ensaios realizados em reatores manométricos, em pH 7,0, contendo 7,5 g_{SSV}/L de lodo anaeróbio *in natura* como inóculo e incubados a 35°C sem agitação. ☐ efluente da produção de H₂ em meio não suplementado; ▲ efluente da produção de H₂ em meio suplementado.

Observa-se que, após 41 dias de digestão, o volume específico de CH_4 produzido foi similar em ambos os ensaios, porém o processo em que se empregou o EPH oriundo de meio de fermentação simples (EPH-SS) foi mais rápido, atingindo o volume específico máximo de CH_4 de 857 mL/L em 28 d, enquanto na digestão de EPH proveniente de meio suplementado (EPH-CS) levou ao volume específico máximo de 822 mL/L em 39 d.

As composições inicial e final dos meios de digestão anaeróbia contendo EPH-SS ou EPH-CS estão dispostas na Tabela 17, bem como os indicadores das produções de metano e os parâmetros cinéticos dessas produções em cada um dos sistemas avaliados.

Tabela 17. Composição inicial e final do meio de digestão anaeróbia empregando EPH-SS ou EPH-CS como matéria-prima, indicadores da produção de metano e parâmetros cinéticos da equação de Gompertz modificada nestas duas condições. A eficiência foi calculada em relação ao rendimento máximo teórico de

	EPH-SS		EPH-	CS
	inicial	final	inicial	final
Gicerol (g/L)	0,03	0,00	0,03	0,00
Ác. acético (g/L)	0,13	0,00	0,20	0,00
1,3-PDO (g/L)	1,65	0,00	2,15	0,00
Ác. butírico (g/L)	0,62	0,35	0,45	0,48
DQO (mg/L)	2815,28	266,98	3440,98	447,73
Remoção de DQO	-	91%	-	87%
CH₄ (mL/L)	-	857,26	-	821,88
Rendimento (mL/g _{DQO})	-	332,48	-	271,37
Eficiência	-	86%	-	67%
λ (d)	-	3,79	-	12,47
H _p (mL/L)	-	803,31	-	800,81
R _m (mL/L.d)	-	55,98	-	57,75
R ²	-	0,9101	-	0,9901

 350 mL/g_{DQO} .

O meio contendo EPH-SS continha menores concentrações de ácido acético e 1,3-PDO, conforme discutido no item 5.7, logo a DQO inicial deste sistema era menor que a DQO do sistema que continha EPH-CS como matéria-prima (Tabela 17). Em ambos os ensaios houve consumo total do ácido acético e do 1,3-PDO, porém o ácido butírico não foi totalmente consumido. No meio que continha EPH-SS 43% do ácido butírico foi consumido, mas no meio em que se empregou EPH-CS como matéria-prima o mesmo não ocorreu, houve um pequeno acréscimo na concentração deste ácido, contudo essa diferença encontra-se no intervalo de incerteza experimental. É possível que o EPH-CS contivesse traços de Tween 80, ureia e fosfatos (KH₂PO₄ e K₂HPO₄), utilizados como suplementos para a produção de H₂, e estes componentes podem ter influenciado negativamente a metanogênese. JANKE e colaboradores (2016) verificaram que a presença de KH₂PO₄ no meio de digestão anaeróbia promove o acúmulo de ácidos orgânicos, possivelmente devido à inibição da metanogênese; por outro lado, a adição de ureia ao meio de digestão anaeróbia leva a uma maior estabilidade da digestão anaeróbia por aumentar a alcalinidade do sistema, porém não evita a inibição deste processo. Isto explicaria o acúmulo do ácido butírico no sistema contendo EPH-CS.

As remoções de DQO foram de 91% e 87% nos meios contendo EPH-SS e EPH-CS como matéria-prima, respectivamente. Esta diferença é pequena, principalmente considerando-se a incerteza da metodologia de análise da DQO (método colorimétrico), todavia a eficiência da conversão em metano foi superior no meio contendo EPH-SS (86% frente a 67% no meio em que EPH-CS era a matéria-prima).

Em ambos os ensaios, a equação de Gompertz modificada proveu modelos bem ajustados aos dados experimentais, com coeficientes de determinação de 0,9101 e 0,9901 quando se empregou EPH-SS e EPH-CS como matéria-prima, respectivamente. Os parâmetros cinéticos referentes ao volume específico máximo (H_p) e à taxa máxima de produção (R_m) foram similares nos dois modelos, porém a fase adaptativa (λ) em EPH-SS foi 3,3 vezes menor, quando comparada à fase adaptativa em EPH-CS, representando a principal vantagem deste sistema.

Considerando-se o processo sequencial de produção de H₂ e CH₄ como um todo, o meio não suplementado leva a um potencial energético 38% maior que o meio suplementado (166,5 kJ/d contra 120,2 kJ/d, respectivamente). Além disso, é um meio mais barato, visto que a adição de suplementos não é necessária.

Comparando-se este trabalho com trabalhos encontrados na literatura recente referentes à produção sequencial de H₂ e CH₄ a partir de diferentes matérias-primas em processo batelada (Tabela 18), observa-se que os resultados aqui obtidos são coerentes, principalmente em relação à etapa metanogênica e à elevada remoção de DQO. O estudo de PRAPINAGSORN, SITTIJUNDA e REUNGSANG (2018) se destaca dos demais pela elevada produção de ambos os gases em curto espaço de tempo, o que pode ser resultado da inclusão de *Clostridium butyricum* ao consórcio utilizado como inóculo. No trabalho de KOTHARI e colaboradores (2017), a utilização de cultura pura (*Enterobacter aerogens*) como inóculo levou à expressiva produção de H₂ a partir de efluente de laticínios, porém a produção de metano não acompanhou o mesmo rendimento, resultando na baixa remoção de DQO.

A produção de metano a partir de resíduos alimentícios é um assunto muito abordado na literatura há bastante tempo, porém a produção sequencial de H₂ e CH₄ a partir deste tipo de resíduo é mais recente, devido aos entraves encontrados para homogeneização do meio de fermentação. Alguns autores solucionaram esta questão adicionando materiais mais viscosos, como óleos e glicerina, à matéria-prima alcançando produções elevadas tanto de H₂ quanto de CH₄, apesar do tempo prolongado de fermentação (RAFIEENIA; PIVATO; LAVAGNOLO, 2018).

WEIDE e colaboradores (2019) avaliaram 12 diferentes resíduos orgânicos das indústrias alimentícia, têxtil, de bioplásticos, de bioenergia, de processamento de leite e de produção de açúcar e concluíram que nem todos os resíduos são propícios à digestão anaeróbia dividida em duas etapas. Dos 12 resíduos estudados, metade deve ser utilizada como matéria-prima para produção de H₂ e CH₄ sequencialmente, dos quais os resíduos que contém amido ou açúcar como substrato levaram às maiores produções de H₂. Desta forma, julgou-se importante avaliar a produção direta de metano, a partir da glicerina, a fim de se determinar se a glicerina é uma matéria-prima viável para a produção de H₂ e CH₄ – sequencialmente – ou apenas CH₄– de forma direta – definindo assim a estratégia de processamento deste produto de baixo valor agregado.

127

Inóculos: H₂ / CH₄	Matéria-prima	H ₂	T _{H2}	CH₄	T _{CH4}	Remoção de DQO	
Enterobacter aerogens / esterco	Efluente da indústria de	562 ml /l	26 h	500 ml /l	7 d	64%	[1]
bovino	laticínios	502 mL/ L	2011	590 IIIL/ L	7 u	0470	[1]
Clostridium butyricum + esterco	Silagem de capim-		14 6	1002 ml /l	0 - 4		[2]
de elefante / lodo anaeróbio	elefante	554 ML/L	14 N	14 n 1002 mL/L		nr	[2]
Lodo anaeróbio granular	Posíduo alimentício	380,5 mL/L	40 h	2991 mL/L	32 d	96%	
	Residuo anmenticio					(TOC)	[5]
Lodo anaeróbio granular	Resíduo amiláceo -	160	7 d	270 L /kg	40 d	or	[4]
	indústria alimentícia	L/kg _{ODM}	7 u	270 L/ Kgodm	42 U	111	
Lada anacrábia granular	Resíduo amiláceo -	144	7 d	$216 \pm 4 kg$	40 d	10 F	[4]
LOUO anaerobio granular	indústria têxtil	L/kg _{ODM}	7 u	ZIO L/Kgodm	42 U	r i r	[4]
Lodo anaeróbio - sem	Clicorino	100 ml /l	20 h	957 ml /l	20 4	05%	este
suplementação	Gilcenna	190 IIIL/ L	2011	657 IIIL/L	28 U	95%	trabalho
Lodo anaeróbio - com	Clicarina	270 1/1	20 h	822 mL/L	39 d	91%	este
suplementação	Gillefilla	278 ML/L	20 []				trabalho

Tabela 18. Comparação entre os resultados obtidos nesta tese, para produção sequencial de H₂e CH₄, e outros resultados relatados na literatura, em batelada.

T_{H2}: tempo de acidogênese; T_{CH4}: tempo de metanogênese; nr: não relatado; ODM: matéria orgânica seca (*organic dry matter*). [1]KOTHARI et al., 2017; [2]PRAPINAGSORN; SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2018; [3]RAFIEENIA; LAVAGNOLO; PIVATO, 2017; [4]WEIDE et al., 2019.

5.9. Produção direta de CH₄ a partir de glicerina

A produção direta de CH₄, a partir de glicerina, também foi investigada utilizando-se os dois meios de produção (sem e com suplementação) a fim de se avaliar qual dos processos (direto ou sequencial) possui maior potencial para geração de vetores energéticos, e verificar a influência da adição de Tween 80, ureia, KH₂PO₄ e K₂HPO₄ sobre a digestão anaeróbia. Foi utilizada a mesma concentração de glicerina empregada no início do processo sequencial (produção de H₂) e a mesma concentração de sólidos suspensos voláteis do lodo anaeróbio, desta vez sem tratamento prévio. Avaliou-se a produção de metano em meio suplementado e em meio não suplementado, utilizando-se os valores otimizados para produção de H₂. Os perfis cinéticos obtidos nestes dois ensaios estão apresentados na Figura 43.



Figura 43. Cinética de produção de CH₄ utilizando glicerina como matéria-prima. Ensaios realizados em reatores manométricos, em pH 7,0, contendo 7,5 g_{SSV}/L de lodo anaeróbio *in natura* como inóculo e 7 g/L de glicerol oriundo da glicerina como matéria-prima, e incubados a 35°C sem agitação. ☐ produção de CH₄ em meio não suplementado; ▲ produção de CH₄ em meio com suplementação.

Novamente, observa-se uma cinética de produção de metano mais lenta em meio suplementado. O meio de digestão anaeróbia direta, a partir de glicerina, possivelmente continha teores mais elevados de Tween 80, ureia e fosfatos, quando comparado ao meio de produção sequencial (EPH-CS, seção 5.8), devido ao consumo destes durante a primeira etapa do processo sequencial. Por este motivo a diferença entre os perfis cinéticos ficou mais evidente na produção direta de CH₄.

Na Tabela 19 estão dispostas as concentrações iniciais e finais de glicerol, ácidos acético e butírico e 1,3-propanodiol, as DQOs iniciais e finais, os indicadores de produção de CH_4 e os parâmetros cinéticos desta produção. Em ambos os ensaios houve consumo total do glicerol, indicando que a não houve inibição do sistema pela fonte de carbono. A concentração final de ácidos acético e butírico e 1,3-PDO indica que a fase acidogênica ocorreu a partir do consumo deste glicerol, porém a metanogênese não foi completa. Houve redução de cerca de 40% nas DQOs dos sistemas, provavelmente decorrente da liberação de CO_2 durante a fase acidogênica.

O acúmulo de ácido butírico e, principalmente, de ácido acético indica que houve algum tipo de inibição da metanogênese protagonizada pelas arqueias metanogênicas acetoclásticas. A inibição específica de arqueias metanogênicas acetoclásticas por fosfato foi identificada em consórcios microbianos presentes em plantações de arroz (CONRAD; KLOSE; CLAUS, 2000), porém não se encontrou relatos acerca desta inibição em lodo anaeróbio. Adicionalmente, este acúmulo de ácidos não foi resultado apenas da presença de fosfato no meio de digestão, visto que no ensaio realizado sem adição de suplementos o mesmo também ocorreu.

Possivelmente, o metano produzido neste processo de digestão anaeróbia direta teve o H₂ gerado durante a acidogênese como substrato, visto que não foi possível detectar a presença de H₂ no biogás analisado ao longo da digestão anaeróbia. A produção de metano a partir de H₂ e CO₂ é realizada por arqueias metanogênicas hidrogenotróficas, que poderiam estar mais ativas do que as arqueias metanogênicas acetoclásticas no lodo anaeróbio utilizado, devido à maior sensibilidade das arqueias acetoclásticas à presença de acetato quando comparadas às arqueias hidrogenotróficas (XU et al., 2014).

Esta hipótese poderia ser confirmada a partir da análise metagenômica do lodo anaeróbio nas diferentes etapas da pesquisa, porém não foi possível realizar este tipo de análise durante o desenvolvimento deste trabalho.

Tabela 19. Composição inicial e final do meio de digestão anaeróbia empregando glicerina como matériaprima com ou sem adição de suplementos (CS e SS, respectivamente), indicadores da produção de metano e parâmetros cinéticos da equação de Gompertz modificada nestas duas condições. A eficiência foi calculada

	SS		C	S
	inicial	final	inicial	final
Glicerol (g/L)	8,22	0,02	7,52	0,01
Ác. acético (g/L)	0,00	2,43	0,00	2,41
1,3-PDO (g/L)	0,00	2,88	0,00	2,84
Ác. butírico (g/L)	0,00	0,80	0,00	0,00
DQO inicial (mg/L)	5419,87	3152,94	5065,02	2999,91
Remoção de DQO	-	42%	-	41%
CH₄ (mL/L)	-	518,67	-	424,34
Rendimento (mL/g _{DQO})	-	226,12		203,09
Eficiência	-	27%	-	24%
λ (d)	-	10,75	-	3,46
H _p (mL/L)	-	483,21	-	417,84
R _m (mL/L.d)	-	222,11	-	22,19
R ²	-	0,9914	-	0,9914

em relação ao rendimento máximo teórico de 350 mL/g_{DQO}.

A eficiência da produção de metano em relação à DQO inicial correspondeu a 27% e 24% nos meios sem e com adição de suplementos, respectivamente. Contudo, estas eficiências aumentam para 65% e 58% se forem calculadas em relação à DQO consumida, indicando que a baixa geração de metano pode ser atribuída à inibição parcial da metanogênese. De 30% a 40% do metano gerado em uma metanogênese correspondem à via hidrogenotrófica, enquanto de 60% a 70% são resultado da via acetoclástica (PAN et al.,

2016), o que corrobora a hipótese aqui levantada. Contudo, outras análises devem ser abordadas a fim de se alcançar uma conclusão sólida.

Comparando-se os processos sequencial e direto para digestão anaeróbia de glicerina, nas condições estudadas, observa-se que a digestão anaeróbia realizada em duas etapas é mais interessante tanto pela maior produção de gases energéticos, quanto pela maior remoção de DQO do sistema, assim como observado em outros trabalhos presentes na literatura (MASSANET-NICOLAU et al., 2015; NASR et al., 2012; SAKARIKA et al., 2020; TANGKATHITIPONG et al., 2017). A neutralização do pH do meio entre as etapas pode ser crucial para o sucesso da produção sequencial, principalmente quando o substrato é facilmente metabolizado, gerando altas concentrações de ácidos em curto intervalo de tempo, provocando queda brusca no pH do meio e causando a inibição das arqueias metanogênicas (RAWOOF et al., 2020).

5.10. Considerações finais

Os processamentos biotecnológicos da glicerina para produção de H₂ e 1,3-PDO, paralelamente, ou H₂ e CH₄, de forma sequencial, representam alternativas interessantes para a valorização deste subproduto internamente, valorizando a cadeia de produção de biodiesel como um todo.

A fermentação da glicerina para produção de H₂ e 1,3-PDO deve ser conduzida em meio suplementado. Considerando-se os dois tipos de suplementação avaliados neste trabalho, o meio contendo 7 g/L de glicerol (da glicerina), 13,3 mg/L de Tween 80; 32,9 mg/L de ureia; 14,0 mg/L de KH₂PO₄ e 18,2 mg/L de K₂HPO₄ foi o mais interessante, levando à geração de 292 mL/L de H₂ e 4 g/L de 1,3-PDO (0,69 mol/mol). Estes resultados mostram que é possível produzir 1,3-PDO em sistemas simples e não estéreis. Novos estudos devem ser realizados a fim de empregar concentrações maiores de glicerol sem que haja redução do rendimento, empregando técnicas de adaptação do inóculo e alimentação do reator.

Por outro lado, o processo de digestão anaeróbia em duas etapas para produção sequencial de H₂ e CH₄ deve ser realizado sem adição de suplementos, o que constitui uma

grande vantagem tanto do ponto de vista econômico quanto do ponto de vista ambiental, considerando que os princípios da química verde sugerem evitar a incorporação de outros reagentes ao processo. Foram gerados 190 mL/L de H₂ e 857 mL/L de CH₄, além da redução de 95% da DQO. A produção de H₂ e CH₄ alcançada neste trabalho demonstra o potencial energético do processamento da glicerina em duas etapas, levando à geração de dois gases de destacado interesse energético, principalmente nos próximos anos.

Desta forma, a biorrefinaria da glicerina para produção de H₂, 1,3-PDO e CH₄ seria constituída de dois segmentos, conforme apresentado na Figura 44.

7 g/L glicerol GLICERINA

1. Produção de H₂ e 1,3-PDO em único reator



2. Produção de H₂ e CH₄ em dois estágios



Figura 44. Diagrama geral dos resultados obtidos nesta pesquisa. A biorrefinaria da glicerina proposta seria constituída de dois segmentos: no primeiro, H₂ e 1,3-PDO seriam obtidos em reator único mas em fases diferentes, enquanto no segundo seriam gerados H₂ e CH₄ por processo de digestão separado em duas etapas. Y: rendimento do produto por substrato; EPH: efluente da produção de H₂; ε : energia gerada por unidade de tempo; ϵ_{total} : energia total gerada no processo por unidade de tempo e de massa de substrato.

Tendo-se em vista que a glicerina é produzida na maioria dos estados brasileiros, a geração de vetores energéticos renováveis, como o H₂ e o CH₄, ou de um produto químico com mercado em ascensão, como o 1,3-PDO, a partir deste subproduto da cadeia produtora de biodiesel constitui uma grande oportunidade para a maior diversificação da matriz energética brasileira de forma sustentável, para valorização da glicerina internamente e para a difusão de processos sustentáveis e renováveis.

6. CONCLUSÕES

Nesta tese foram desenvolvidos dois processos para obtenção de H₂, 1,3-PDO e CH₄ a partir da glicerina residual do biodiesel. Foram produzidos H₂ e 1,3-PDO simultaneamente por fermentação em meio suplementado ou H₂ e CH₄ sequencialmente por digestão anaeróbia em duas etapas em meio não suplementado.

O lodo anaeróbio proveniente do adensador da ETE foi o inóculo mais propício para a produção de H₂.

O pré-tratamento térmico promoveu aumento na produtividade volumétrica de H₂ em relação ao lodo anaeróbio pré-tratado com ácido, além de proporcionar maior estabilidade ao lodo anaeróbio pré-tratado.

Foi possível se produzir 1,3-PDO a partir de glicerina empregando-se lodo anaeróbio como inóculo, porém é necessário que se adicione suplementos ao meio de fermentação a fim de se favorecer a via redutora.

Foi possível dobrar a produção de 1,3-PDO apenas adicionando suplementos ao meio de fermentação. Adicionalmente, concentrações iniciais de glicerol superiores a 10g/L podem levar à inibição metabólica.

A adição de nitrogênio, fósforo e Tween 80 ao meio de fermentação contendo glicerina como matéria-prima resultou em aumento na produção de H₂. Foi possível otimizar a produção de H₂, alcançando-se 57,9 mL/L após 24 h de processo, mediante adição de 6,6 mg/L de N, 2,8 mg/L de P e 5,7 mg/L de Tween 80 em meio contendo 3 g/L de glicerol.

O volume de *headspace* no reator influenciou a produção de H₂; o aumento do volume de *headspace* de 15% para 50% acarretou um volume específico de H₂ 91% maior utilizando-se a mesma concentração inicial de glicerol.

O aumento da concentração de glicerol no início da fermentação levou ao aumento do volume de H₂ produzido, porém concentrações superiores a 7 g/L podem ocasionar desvio da via metabólica, e consequente redução da produção de H₂.

A digestão anaeróbia do efluente da produção de H₂ levou à geração de 822 mL/L de CH₄ em 39 dias, quando a fermentação foi conduzida em meio otimizado. Contudo, a produtividade volumétrica obtida na digestão anaeróbia do efluente da produção de H₂ em

meio simples foi 45% superior, resultando em um potencial energético 38% maior quando o processo sequencial foi realizado na ausência de Tween 80, ureia e fosfatos.

A metanogênese direta, a partir de glicerina, promoveu baixa produção de metano, tanto em meio suplementado quanto em meio não suplementado, provavelmente ocasionada pela inibição das arqueias metanogênicas acetoclásticas. Houve acúmulo de ácidos e 1,3-PDO no meio de digestão anaeróbia direta, resultando na remoção de 41% da DQO e eficiência de geração de metano de apenas 24%, evidenciando que a digestão anaeróbia dividida em duas etapas é energeticamente favorável.

Este trabalho constituiu o início da aplicação da glicerina para produção de H₂, 1,3-PDO e CH₄ no Laboratório de Biocatálise do INT. Avanços significativos foram alcançados, porém muitos questionamentos também foram levantados. Desta forma, algumas sugestões para a continuidade e o avanço desta pesquisa estão contidos no próximo tópico.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Identificar as espécies presentes no lodo anaeróbio em diferentes etapas do processo, como: antes e depois do pré-tratamento, antes de depois da produção de H₂ e antes e depois da produção de metano;
- Avaliar o pré-cultivo do inóculo em glicerol, promovendo a adaptação do mesmo. Alterar o tipo de condução do processo – de batelada simples para semi-contínuo com reciclo do inóculo.
- Avaliar, dentre os suplementos adicionados ao meio de fermentação, quais são relevantes e fundamentais para a produção de 1,3-PDO;
- Realizar a produção de 1,3-PDO em processo batelada alimentada utilizando inóculo pré-cultivado em glicerol;
- Recuperar o 1,3-PDO produzido por fermentação;
- Selecionar dentre os 4 componentes adicionados ao meio (Tween 80, ureia, K₂HPO₄ e KH₂PO₄) quais podem ser retirados sem prejuízos para o processo sequencial de produção de H₂ e CH₄;
- Avaliar fontes baratas e residuais para suplementação de nitrogênio e fósforo ao meio de fermentação;
- Avaliar a substituição de Tween 80 por biosurfactantes;
- Realizar a metanogênese direta de glicerina empregando a mesma DQO inicial da metanogênese do processo sequencial (~ 3g₀₂/L);

 Avaliar a influência da agitação, do pH inicial, da relação DQO_{matéria-prima}/SSV_{inóculo}e das relações C/N e C/P sobre a metanogênese.

REFERÊNCIAS

ANP 2019. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Biometano. Disponível em: http://www.anp.gov.br/wwwanp/biocombustiveis/biometano . Acesso em: 12/01/2021

ANP, 2020. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Dados Estatísticos. Disponível em: http://www.anp.gov.br/dados-estatisticos . Acesso em: 02/03/2020.

EIA, 2017. Monthly Biodiesel Production Report. U.S. Energy Information Administration. Disponível em https://www.eia.gov/biofuels/biodiesel/production/. Acesso em 25/07/2017

EMTU/SP, 2018. Empresa Metropolitana de Transportes Urbanos de São Paulo. Disponível em: http://www.emtu.sp.gov.br/emtu/empreendimentos/projetos-de-desenvolvimentotecnologico/onibus-a-hidrogenio.fss. Acesso em: 29/04/2018

CIPA USP. Universidade de São Paulo. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Disponível em: http://sites.ffclrp.usp.br/cipa/fispq/Hidrogenio.pdf. Acesso em: 13/01/2020.

CHIC, 2017. Clean Hydrogen in European Cities.Final Report. Disponível em:https://fuelcellbuses.eu/sites/default/files/documents/Final%20Report_CHIC_28022017_Final_P ublic.pdf. Acesso em: 13/01/2020.

COMEX STAT, 2020. Estatísticas Comércio Exterior. Exportação e Importação Geral. Disponível em: <u>http://comexstat.mdic.gov.br/pt/geral</u>. Acesso em: 02/03/2020

COPPE, 2018. Ônibus híbrido elétrico-hidrogênio. Disponível em: http://www.onibush2.coppe.ufrj.br. Acesso em: 29/04/2018

ANITHA, M.; KAMARUDIN, S. K.; KOFLI, N. T. The potential of glycerol as a value-added commodity. **Chemical Engineering Journal**, v. 295, p. 119–130, 2016.

APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. [s.l: s.n.]. ARGUN, H. et al. Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: Effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 7, p. 1813–1819, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BIOGÁS. **NO BRASIL CONHECENDO O MERCADO NO PAÍS**. [s.l: s.n.]. BAGHCHEHSARAEE, B. et al. The effect of heat pretreatment temperature on fermentative hydrogen production using mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 15, p. 4064– 4073, 2008.

BAGHERI, S.; JULKAPLI, N. M.; YEHYE, W. A. Catalytic conversion of biodiesel derived raw glycerol to value added products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 113–127, 2015.

BARRERA-QUINTERO, V. et al. Gompertz Equation's First and Second Derivatives for Kinetics Analysis of Batch Dark Fermentation on Bio-Hydrogen Production. **European Journal of Engineering Research and Science**, v. 2, n. 11, p. 18, 2017a.

BARRERA-QUINTERO, V. et al. Gompertz Equation 's First and Second Derivatives for Kinetics Analysis of Batch Dark Fermentation on Bio- Hydrogen Production. v. 2, n. 11, p. 18–22, 2017b. BHARATHIRAJA, B. et al. Biogas production – A review on composition, fuel properties, feed stock and principles of anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 90, n. July, p. 570–582, 2018.

BUNDHOO, M. A. Z.; MOHEE, R. Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 16, p. 6713–6733, 2016.

BUNDHOO, M. A. Z.; MOHEE, R.; HASSAN, M. A. Effects of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 157, p. 20–48, 2015a.

BUNDHOO, M. A. Z.; MOHEE, R.; HASSAN, M. A. Effects of Pre-Treatment Technologies on Dark Fermentative Biohydrogen Production a Review. Journal Environmental Mnagement 157 (2015) 20-48.Pdf. v. 157, p. 20–48, 2015b.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. **Planejamento de experimentos usando o Statistica**, 2003. CAROSIA, M. F. et al. Influence of C/P and C/N ratios and microbial characterization in hydrogen and ethanol production in an anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 15, p. 9600–9610, 2017.

CAROSIA, M. F. et al. Homoacetogenesis: New insights into controlling this unsolved challenge by selecting the optimal C/N ratio, C/P ratio and hydraulic retention time. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 145, p. 273–284, 2021.

CHAGANTI, S. R.; KIM, D. H.; LALMAN, J. A. Dark fermentative hydrogen production by mixed anaerobic cultures: Effect of inoculum treatment methods on hydrogen yield. **Renewable Energy**, v. 48, p. 117–121, 2012.

CHANG, S. et al. Effect of different gas releasing methods on anaerobic fermentative hydrogen production in batch cultures. **Frontiers of Environmental Science and Engineering in China**, v. 6, n. 6, p. 901–906, 2012.

CHANG, S.; LI, J. Z.; LIU, F. Evaluation of different pretreatment methods for preparing hydrogenproducing seed inocula from waste activated sludge. **Renewable Energy**, v. 36, n. 5, p. 1517–1522, 2011.

CHEN, Y.-H.; WALKER, T. H. Biomass and lipid production of heterotrophic microalgae Chlorella

protothecoides by using biodiesel-derived crude glycerol. **Biotechnol Lett**, v. 33, p. 1973–1983, 2011. CHEN, Y. et al. Advances in bioconversion of glycerol to 1,3-propanediol: Prospects and challenges. **Process Biochemistry**, v. 71, n. December 2017, p. 134–146, 2018.

CHEN, Y.; YIN, Y.; WANG, J. Recent advance in inhibition of dark fermentative hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 46, n. 7, p. 5053–5073, 2021.

CHERNICHARO, C. A. DE L. Princípio do tratamento biológico de águas residuárias - Reatores anaeróbios. Belo Horizonte: [s.n.].

CIRIMINNA, R. et al. Understanding the glycerol market. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 116, n. 10, p. 1432–1439, 2014.

CLARK, I. C.; ZHANG, R. H.; UPADHYAYA, S. K. The effect of low pressure and mixing on biological hydrogen production via anaerobic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 15, p. 11504–11513, 2012.

COFRÈ, O. et al. Optimization of culture media for ethanol production from glycerol by Escherichia coli. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, p. 275–281, 2011.

CONRAD, R.; KLOSE, M.; CLAUS, P. Phosphate inhibits acetotrophic methanogenesis on rice roots. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 828–831, 2000.

DE SÁ, L. R. V. et al. Pentoses, hexoses and glycerin as substrates for biohydrogen production: An approach for Brazilian biofuel integration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 7, p. 2986–2997, 2013.

DE SÁ, L. R. V et al. Hydrogenase activity monitoring in the fermentative hydrogen production using heat pretreated sludge: A useful approach to evaluate bacterial communities performance.

International Journal of Hydrogen Energy, v. 36, n. 13, p. 7543–7549, 2011.

DEMOLING, F.; FIGUEROA, D.; BÅÅTH, E. Comparison of factors limiting bacterial growth in different soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 10, p. 2485–2495, 2007.

DIETZ, D.; ZENG, A. P. Efficient production of 1,3-propanediol from fermentation of crude glycerol with mixed cultures in a simple medium. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 2, p. 225–233, 2014.

DING, C.; YANG, K.-L.; HE, J. **Biological and fermentative production of hydrogen**. [s.l: s.n.]. DOBROWOLSKI, A. et al. Efficient conversion of crude glycerol from various industrial wastes into single cell oil by yeast Yarrowia lipolytica. **Bioresource Technology**, v. 207, p. 237–243, 2016.

DSM. **TILAMAR® PDO with NØØVISTA[™] The eco-friendly powerhouse for high-performing beauty products**. Disponível em: <https://www.dsm.com/personal-care/en_US/products/multifunctionalingredients/tilamar-pdo-with-noovista.html>. Acesso em: 12 dez. 2020. **DuPont Tate & Lyle BioProducts**. Disponível em: <https://duponttateandlyle.com/>. Acesso em: 12 dez. 2020.

ELBESHBISHY, E. et al. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. **Renewable** and Sustainable Energy Reviews, v. 79, n. May, p. 656–668, 2017.

FALOYE, F. D.; GUEGUIM KANA, E. B.; SCHMIDT, S. Optimization of biohydrogen inoculum development via a hybrid pH and microwave treatment technique - Semi pilot scale production assessment. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 11, p. 5607–5616, 2014.

FARHAT, A. et al. Fermentative hydrogen and methane co-production from anaerobic co-digestion of organic wastes at high loading rate coupling continuously and sequencing batch digesters.

Environmental Science and Pollution Research, v. 25, n. 28, p. 27945–27958, 2018.

FIGGE, R. MICROORGANISMS FOR 1,3-PROPANEDIOL PRODUCTION USING HIGH GLYCERINE CONCENTRATION France, 2012.

FLORES-LARIOS, A. et al. Single and two-stage anaerobic digestion for hydrogen and methane production from acid and enzymatic hydrolysates of Agave tequilana bagasse. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 2, p. 897–904, 2015.

FONTES LIMA, D. M.; ZAIAT, M. The influence of the degree of back-mixing on hydrogen production in an anaerobic fixed-bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 12, p. 9630– 9635, 2012.

FRIEHE, J; WEILAND, P; SCHATTAUER, A. **Guia Prático do Biogás - Geração e UtilizaçãoGülzow**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <biogasportal.info>.

GALLARDO, R. et al. Anaerobic granular sludge as a biocatalyst for 1,3-propanediol production from glycerol in continuous bioreactors. **Bioresource Technology**, v. 155, p. 28–33, 2014.

GARLAPATI, V. K.; SHANKAR, U.; BUDHIRAJA, A. Bioconversion technologies of crude glycerol to value added industrial products. **Biotechnology Reports**, v. 9, p. 9–14, 2016.

GARRITANO, A. N. et al. Palm oil mill e ffl uent (POME) as raw material for biohydrogen and methane production via dark fermentation. v. 92, n. November 2017, p. 676–684, 2018.

GHIMIRE, A. et al. A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass : Process parameters and use of by-products. v. 144, p. 73–95, 2015.

GONZÁLEZ, P. J. et al. Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. Journal of Inorganic Biochemistry, v. 100, n. 5–6, p. 1015–1023, 2006.

GUNGORMUSLER, M. et al. 1,3-Propanediol production potential of Clostridium saccharobutylicum NRRL B-643. **New Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 782–788, 2010.

HALLENBECK, P. C.; GHOSH, D. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward?

Trends in Biotechnology, v. 27, n. 5, p. 287–297, 2009.

HE, Q. S.; MCNUTT, J.; YANG, J. Utilization of the residual glycerol from biodiesel production for renewable energy generation. v. 71, n. December 2016, p. 63–76, 2017.

HERMANN, B. G.; PATEL, M. Today 's and Tomorrow 's Bio-Based Bulk Chemicals From White
Biotechnology. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 136, p. 361–388, 2007.
HIDALGO, D.; MARTÍN-MARROQUÍN, J. M. Power-to-methane, coupling CO2 capture with fuel
production: An overview. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 132, n. January, p. 110057, 2020.

HOSSEINI, S. E.; WAHID, M. A. Hydrogen production from renewable and sustainable energy resources: Promising green energy carrier for clean development. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 57, p. 850–866, 2016.

HUANG, H.; GONG, C.; TSAO, G. Production of 1, 3-propanediol by Klebsiella pneumoniae.

Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2002.

HUNG, C. H.; CHANG, Y. T.; CHANG, Y. J. Roles of microorganisms other than Clostridium and Enterobacter in anaerobic fermentative biohydrogen production systems - A review. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 18, p. 8437–8444, 2011.

ISAHAK, W. N. R. W. et al. Recovery and Purification of Crude Glycerol from Vegetable Oil Transesterification : A Review Recovery and Purification of Crude Glycerol from. **Separation and Purification Reviews**, n. february, p. 250–267, 2015.

JANKE, L. et al. Enhancing biogas production from vinasse in sugarcane biorefineries: Effects of urea and trace elements supplementation on process performance and stability. **Bioresource Technology**, v. 217, p. 10–20, 2016.

JÁUREGUI, M. A.; LADINO, A.; MALAGÓN-ROMERO, D. The effect of the initial concentration of glycerol on the hydrogen produced by strains of the genus Clostridium spp. **International Journal of Sustainable Engineering**, v. 11, n. 3, p. 205–210, 2018.

JIANG, L. L. et al. High tolerance to glycerol and high production of 1,3-propanediol in batch fermentations by microbial consortium from marine sludge. **Engineering in Life Sciences**, v. 17, n. 6, p. 635–644, 2017.

JIANG, W. et al. Key enzymes catalyzing glycerol to 1,3-propanediol. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–19, 2016.

JOHNSON, D. T.; TACONI, K. A. The Glycerin Glut: Options for the Value-Added Conversion of Crude Glycerol Resulting from Biodiesel Production. **Environmental Progress**, v. 26, n. 4, p. 338–348, 2007. KAMALASKAR, L. et al. Genome sequence and gene expression studies reveal novel hydrogenases mediated hydrogen production by Clostridium biohydrogenum sp. nov., MCM B-509T. International Journal of Hydrogen Energy, v. 41, n. 28, p. 11990–11999, 2016.

KANCHANASUTA, S.; PISUTPAISAL, N. Improvement of glycerol waste utilization by co-feedstock with palm oil decanter cake on biohydrogen fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 5, p. 3447–3453, 2017.

KOLLER, M. et al. Producing Microbial Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters in a Sustainable Manner. **New Biotechnology**, 2016.

KONG, P. S. et al. Conversion of crude and pure glycerol into derivatives : A feasibility evaluation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 63, p. 533–555, 2016.

KOTHARI, R. et al. Sequential hydrogen and methane production with simultaneous treatment of dairy industry wastewater: Bioenergy profit approach. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 8, p. 4870–4879, 2017.

KUBIAK, P. et al. Physiological predisposition of various Clostridium species to synthetize 1,3propanediol from glycerol. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 9, p. 1308–1319, 2012.

KUMARI, S.; DAS, D. ScienceDirect Improvement of biohydrogen production using acidogenic culture. v. 2, 2016.

LEAÑO, E. P.; BABEL, S. The influence of enzyme and surfactant on biohydrogen production and electricity generation using Palm Oil Mill Effluent. **Journal of Cleaner Production**, v. 31, p. 91–99, 2012.

LEE, C. S. et al. A review : Conversion of bioglycerol into 1 , 3-propanediol via biological and chemical method. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, n. February, p. 963–972, 2015a. LEE, C. S. et al. A review: Conversion of bioglycerol into 1,3-propanediol via biological and chemical method. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, n. February 2015, p. 963–972, 2015b. LEE, K. S. et al. Enhancing the performance of dark fermentative hydrogen production using a reduced pressure fermentation strategy. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 20, p. 15556–15562, 2012.

LEE, M.-J.; SONG, J.-H.; HWANG, S.-J. Effects of acid pre-treatment on bio-hydrogen production and microbial communities during dark fermentation. **Bioresource technology**, v. 100, n. 3, p. 1491–3, 2009.

LEE, M. J. et al. Effects of nitrate concentration on biohydrogen production and substrate utilization in dark-fermentation. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, v. 17, n. 1, p. 27–32, 2015c.

LIU, C. et al. Insight of co-fermentation of carbon monoxide with carbohydrate-rich wastewater for
enhanced hydrogen production: Homoacetogenic inhibition and the role of pH. **Journal of Cleaner Production**, v. 267, p. 122027, 2020.

LIU, J. ZHONG et al. Glycerol Dehydratases: Biochemical Structures, Catalytic Mechanisms, and Industrial Applications in 1,3-Propanediol Production by Naturally Occurring and Genetically Engineered Bacterial Strains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 179, n. 6, p. 1073–1100, 2016.

LIU, Q. et al. Phosphate enhancing fermentative hydrogen production from substrate with municipal solid waste composting leachate as a nutrient. **Bioresource Technology**, v. 190, p. 431–437, 2015.

LOGAN, B. E. et al. Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers.

Environmental Science and Technology, v. 36, n. 11, p. 2530–2535, 2002.

MANGAYIL, R. et al. Improved bioconversion of crude glycerol to hydrogen by statistical optimization of media components. **Renewable Energy**, v. 75, p. 583–589, 2015.

MARKETSANDMARKETS[™]. **1,3-Propanediol (PDO) Market by Application (Polytrimethylene Terephthalate [PTT], Cosmetics, Personal Care & Cleaning Products, Polyurethane [PU]) and Region (Americas, APAC, Europe, Middle East & Africa [EMEA]) - Global Forecast to 2025**. [s.l: s.n.].

Disponível em: <https://www.marketsandmarkets.com/pdfdownloadNew.asp?id=760>. MARTINS, F. F. et al. Low-cost medium for 1,3-propanediol production from crude glycerol by Clostridium butyricum. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 14, n. 5, p. 1125–1134, 2020. MASSANET-NICOLAU, J. et al. Utilising biohydrogen to increase methane production, energy yields and process efficiency via two stage anaerobic digestion of grass. **Bioresource Technology**, v. 189, p. 379–383, 2015.

METEX. **METabolic EXplorer ensures future sales of its subsidiary METEX NØØVISTA through a strategic partnership with DSM for the marketing of 1,3 propanediol (PDO) to the cosmetic ingredients market**. Disponível em: <https://www.metabolic-explorer.com/history/; https://www.metabolic-explorer.com/2019/12/03/metex-subsidiary-partnership-dsm/>. Acesso em: 12 dez. 2020.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA TECNOLOGIA INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES; ONU MEIO AMBIENTE.

Trajetórias de mitigação e instrumentos de políticas públicas para alcance das metas brasileiras no acordo de Paris. Brasília: [s.n.].

MIZUNO, O.; LI, Y. Y.; NOIKE, T. The behavior of sulfate-reducing bacteria in acidogenic phase of anaerobic digestion. **Water Research**, v. 32, n. 5, p. 1626–1634, 1998.

MOON, C. et al. Optimization of medium compositions favoring butanol and 1,3-propanediol production from glycerol by Clostridium pasteurianum. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p.

10561–10568, 2011.

NASR, N. et al. Comparative assessment of single-stage and two-stage anaerobic digestion for the treatment of thin stillage. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 122–126, 2012.

NIKOLAIDIS, P.; POULLIKKAS, A. A comparative overview of hydrogen production processes.

Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 67, p. 597–611, 2017.

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

NUNES FERRAZ JÚNIOR, A. D. et al. Biogas sequestration from the headspace of a fermentative

system enhances hydrogen production rate and yield. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 19, p. 11011–11023, 2020.

OECD/IEA. Renewable Energy for Industry: From green energy to green materials and fuels. [s.l: s.n.]. Disponível em:

<https://www.iea.org/publications/insights/insightpublications/Renewable_Energy_for_Industry.pdf >.

OH, S. E. et al. Hydrogen production by Clostridium acetobutylicum ATCC 824 and megaplasmiddeficient mutant M5 evaluated using a large headspace volume technique. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 23, p. 9347–9353, 2009.

OZTEKIN, R. et al. Optimization of media composition for hydrogen gas production from hydrolyzed wheat starch by dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 15, p. 4083–4090, 2008.

PACHAPUR, V. L. et al. Evidence of metabolic shift on hydrogen, ethanol and 1,3-propanediol production from crude glycerol by nitrogen sparging under micro-aerobic conditions using co-culture of Enterobacter aerogenes and Clostridium butyricum. International Journal of Hydrogen Energy, v. 40, n. 28, p. 8669–8676, 2015.

PACHAPUR, V. L. et al. Surfactant mediated enhanced glycerol uptake and hydrogen production from biodiesel waste using co-culture of Enterobacter aerogenes and Clostridium butyricum. **Renewable Energy**, v. 95, p. 542–551, 2016.

PAN, X. et al. Methane production from formate, acetate and H2/CO2; focusing on kinetics and microbial characterization. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 796–806, 2016.

PARANHOS, A. G. DE O.; SILVA, E. L. Optimized 1,3-propanediol production from crude glycerol using mixed cultures in batch and continuous reactors. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 12, p. 1807–1816, 30 dez. 2018.

PARKINSON, B. et al. Environmental Science production routes ⁺. p. 19–40, 2019.

PATINVOH, R. J. et al. Innovative pretreatment strategies for biogas production. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 13–24, 2017.

PAUSS, A. et al. Liquid-to-Gas mass transfer in anaerobic processes: Inevitable transfer limitations of methane and hydrogen in the biomethanation process. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1636–1644, 1990.

PENDYALA, B. et al. Pretreating mixed anaerobic communities from different sources: Correlating the hydrogen yield with hydrogenase activity and microbial diversity. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 17, p. 12175–12186, 2012.

PIGGOT, P. J. et al. Genetic Aspects of Bacterial Endospore Formation. v. 40, n. 4, p. 908–962, 1976. POLETO, L. et al. Selection and identification of microorganisms present in the treatment of wastewater and activated sludge to produce biohydrogen from glycerol. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 7, p. 4374–4381, 2016.

POTT, R. W. M.; HOWE, C. J.; DENNIS, J. S. The purification of crude glycerol derived from biodiesel manufacture and its use as a substrate by Rhodopseudomonas palustris to produce hydrogen.

Bioresource Technology, v. 152, p. 464–470, 2014.

PRAPINAGSORN, W.; SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A. Co-digestion of napier grass and its silage with cow dung for bio-hydrogen and methane production by two-stage anaerobic digestion process. **Energies**, v. 11, n. 1, 2018.

PRIYA SAMUDRALA, S. Glycerol Transformation to Value-Added 1,3-Propanediol Production: A Paradigm for a Sustainable Biorefinery Process. **Glycerine Production and Transformation - An Innovative Platform for Sustainable Biorefinery and Energy**, p. 1–23, 2019.

QUISPE, C. A. G.; CORONADO, C. J. R.; CARVALHO, J. A. Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 475–493, 2013.

RAFIEENIA, R.; LAVAGNOLO, M. C.; PIVATO, A. Pre-treatment technologies for dark fermentative hydrogen production: Current advances and future directions. 2017.

RAFIEENIA, R.; PIVATO, A.; LAVAGNOLO, M. C. Effect of inoculum pre-treatment on mesophilic hydrogen and methane production from food waste using two-stage anaerobic digestion.

International Journal of Hydrogen Energy, v. 43, n. 27, p. 12013–12022, 2018.

RAGSDALE, S. W.; PIERCE, E. Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO2 fixation.

Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics, v. 1784, n. 12, p. 1873–1898, 2008. RAMACHANDRAN, R. An overview of industrial uses of hydrogen. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 23, n. 7, p. 593–598, 1998. RAWOOF, S. A. A. et al. Sequential production of hydrogen and methane by anaerobic digestion of organic wastes: a review. **Environmental Chemistry Letters**, 2020.

RODRIGUES, C. V. et al. Bioconversion of crude glycerol from waste cooking oils into hydrogen by sub-tropical mixed and pure cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 4, p. 144–154, 2019.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. 2nd. ed. Campinas / SP: Casa do Pão, 2009.

ROSSI, D. M. et al. Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 8, p. 4814–4819, 2011.

RUGGERI, B.; TOMMASI, T.; SANFILIPPO, S. BioH2 & BioCH4 Through Anaerobic Digestion. p. 230, 2015.

SÁ, L. R. V. DE; CAMMAROTA, M. C.; FERREIRA-LEITÃO S., V. PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO VIA FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA – ASPECTOS GERAIS E POSSIBILIDADE DE UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS BRASILEIROS (Revisão). **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 857–867, 2014.

SAADY, N. M. . Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: unsolved challenge. J. Hydrogen Energy, v. 8, n. 38, p. 13172–13191, 2013.

SAINT-AMANS, GIRBAL, ANDRADE, A. AND S. Regulation of Carbon and Electron Flow in. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 5, p. 1748–1754, 2001.

SAKARIKA, M. et al. Two-stage anaerobic digestion harnesses more energy from the co-digestion of end-of-life dairy products with agro-industrial waste compared to the single-stage process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 153, n. July 2019, 2020.

SANTANA, R. **Montagem de Biorreator para Produção de Biogás em Batelada**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2019.

SARMA, S. et al. Metabolic flux network analysis of hydrogen production from crude glycerol by Clostridium pasteurianum. **Bioresource Technology**, v. 242, p. 169–177, 2017.

SARMA, S. J. et al. Hydrogen biorefinery: Potential utilization of the liquid waste from fermentative hydrogen production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 942–951, 2015.

SCHULTZ, E. L.; DE SOUZA, D. T.; DAMASO, M. C. T. The glycerol biorefinery: a purpose for Brazilian biodiesel production. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 7, 2014. SERRANO-SILVA, N. et al. Methanogenesis and Methanotrophy in Soil : A Review. **Pedosphere**, v. 24,

n. 3, p. 291–307, 2014.

SHELL. ABOUT SHELL CHEMICALS. Disponível em: <https://www.shell.com/business-

customers/chemicals/about-shell-chemicals.html>. Acesso em: 12 dez. 2020.

SILVA, G. P. DA et al. 1,3-Propanediol: production, applications and biotechnological potential.

Química Nova, v. 37, n. 3, p. 527–534, 2014.

SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A. Biohydrogen production from crude glycerol using anaerobic mixed cultures: Media compositions optimization. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 45, n. 2, p. 653–667, 2018.

SPERLING, V. M. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Lodos ativados. 2. ed. [s.l: s.n.].

SREETHAWONG, T. et al. Hydrogen production from glucose-containing wastewater using an anaerobic sequencing batch reactor: Effects of COD loading rate, nitrogen content, and organic acid composition. **Chemical Engineering Journal**, v. 160, n. 1, p. 322–332, 2010.

STEPANOV, N.; EFREMENKO, E. Immobilised cells of Pachysolen tannophilus yeast for ethanol production from crude glycerol. **New BiotechnologyBiotechnology**, 2016.

SUZUKI, T. et al. Improved ethanol tolerance and ethanol production from glycerol in a streptomycinresistant Klebsiella variicola mutant obtained by ribosome engineering. **Bioresource Technology**, v. 176, p. 156–162, 2015.

TAKAI, Y. The mechanism of methane fermentation in flooded paddy soil. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 16, n. 6, p. 238–244, 1970.

TANGKATHITIPONG, P. et al. Separate production of hydrogen and methane from biodiesel wastewater with added glycerin by two-stage anaerobic sequencing batch reactors (ASBR). **Renewable Energy**, v. 113, p. 1077–1085, dez. 2017.

THE ROYAL SOCIETY. **Options for producing low-carbon hydrogen at scale**. [s.l: s.n.].

TORTORA GJ, FUNKE BR, C. C. Tortora funke. [s.l: s.n.].

TRCHOUNIAN, K.; SAWERS, R. G.; TRCHOUNIAN, A. Improving biohydrogen productivity by microbial dark- and photo- fermentations : Novel data and future approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 80, n. May 2017, p. 1201–1216, 2018.

U.S. ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION. **Natural gas explained - Use of natural gas**. Disponível em: https://www.eia.gov/energyexplained/natural-gas/use-of-natural-gas.php). Acesso em: 4 jan. 2021.

VARELLA RODRIGUES, C. et al. Energy valorization of crude glycerol and sanitary sewage in hydrogen generation by biological processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 21, p. 11943–11953, 2020.

VIANA, M. B. et al. The Source of Inoculum and the Method of Methanogenesis Inhibition Can Affect

Biological Hydrogen Production from Crude Glycerol. **Bioenergy Research**, v. 12, n. 3, p. 733–742, 2019.

VIVEK, N. et al. Pentose rich acid pretreated liquor as co-substrate for 1, 3-propanediol production. p. 1–6, 2017a.

VIVEK, N. et al. Recent advances in the production of value added chemicals and lipids Metabolic aspects , challenges and possibilities : an overview. 2017b.

VIVEK, N. et al. Improved 1,3-propanediol production with maintained physical conditions and optimized media composition: Validation with statistical and neural approach. **Biochemical Engineering Journal**, v. 126, p. 109–117, 2017c.

WANG, J. L.; WAN, W. Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogenproducing bacteria from digested sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 12, p. 2934–2941, 2008.

WANG, J.; YIN, Y. Principle and application of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 8, p. 4804–4823, 2017.

WANG, L. et al. Breaking the loop: Tackling homoacetogenesis by chloroform to halt hydrogen production-consumption loop in single chamber microbial electrolysis cells. **Chemical Engineering Journal**, v. 389, p. 124436, 2020.

WANG, L.; TIU, C.; LIU, T. J. Effects of nonionic surfactant and associative thickener on the rheology of polyacrylamide in aqueous glycerol solutions. **Colloid and Polymer Science**, v. 274, n. 2, p. 138–144, 1996.

WANG, X. et al. Hydrogen production from shrimp mariculture waste based on sludge pretreatment by heating. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 20, p. 9591–9598, 2018.

WEIDE, T. et al. Use of organic waste for biohydrogen production and volatile fatty acids via dark fermentation and further processing to methane. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 44, p. 24110–24125, 2019.

WISCHRAL, D. et al. 1,3-PROPANEDIOL: STATISTICAL OPTIMIZATION OF MEDIUM TO IMPROVE PRODUCTION BY Clostridium beijerinckii DSM 791. **JOURNAL OF ADVANCES IN BIOTECHNOLOGY**, v. 5, n. 2, p. 614–623, 2015.

WISCHRAL, D. BIOAPROVEITAMENTO DE GLICEROL POR Clostridium spp . PARA PRODUÇÃO DE 1 , 3-PROPANODIOL : OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO , ENGENHARIA METABÓLICA E DOWNSTREAM Daiana Wischral Daiana Wischral. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2016. WISCHRAL, D. et al. Production of 1,3-propanediol by Clostridium beijerinckii DSM 791 from crude glycerol and corn steep liquor: Process optimization and metabolic engineering. **Bioresource Technology**, v. 212, p. 100–110, jul. 2016.

WONG, Y. M.; WU, T. Y.; JUAN, J. C. A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 34, p. 471–482, 2014.
WOOSHIN PARK, SEUNG H. HYUN, SANG-EUN OH, BRUCE E. LOGAN, I. S. K. Removal of Headspace CO2 Increases Biological Hydrogen Production. Environ. Sci. Technol., v. 39, p. 4416–4420, 2005.
XIU, Z.; ZENG, A. Present state and perspective of downstream processing of biologically produced 1, 3-propanediol and 2, 3-butanediol. p. 917–926, 2008.

XU, Z. et al. In situ volatile fatty acids influence biogas generation from kitchen wastes by anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 163, p. 186–192, 2014.

YAMANISHI, M. et al. The crystal structure of coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase in complex with cobalamin and propane-1,2-diol. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 18, p. 4484–4494, 2002.

YIN, Y.; HU, J.; WANG, J. Enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge by different pretreatment methods. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 25, p. 13550–13556, 2014.

ZHANG, K.; REN, N. Q.; WANG, A. J. Enhanced biohydrogen production from corn stover hydrolyzate by pretreatment of two typical seed sludges. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 27, p. 14653–14662, 2014.

ZHAO, H.; XU, C.; WANG, T. Production of methane from biomass glycerol through coupling of steam reforming and methanation on Ni-Mn/Al2O3. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 13, n. January, p. 100150, 2019.

ZOU, C. et al. Underground coal gasification and its strategic significance to the development of natural gas industry in China. **Petroleum Exploration and Development**, v. 46, n. 2, p. 205–215, 2019.

ANEXOS



Produção sequencial de hidrogênio e metano via digestão anaeróbia de glicerina ou POME

Mariana de Oliveira Faber^{1,2*}, Alessandro do Nascimento Garritano^{1,2}, Vinícius Leite Soares^{1,3}, Vanessa Mazim Obermüller Carvalho da Silva^{1,3}, Lívian Vasconcelos de Sá^{1,2}, Viridiana Santana Ferreira-Leitão^{1,2}

¹Instituto Nacional de Tecnologia – Laboratório de Biocatálise, Divisão de Catálise e Processos Químicos CEP:20081-312, n° 82/302. Rio de Janeiro/RJ. ²Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Bioquímica – Bloco A, CEP 21941-909 Rio de Janeiro, RJ, Brasil. ³Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química – Bloco E, CEP 21941-909 Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *E-mail: mariana.faber@int.gov.br

Glicerina e POME (do inglês, Palm Oil Mill Effluent) são efluentes gerados em grande quantidade no Brasil pelas indústrias de biodiesel e de óleo de palma, respectivamente. Bactérias presentes em lodos anaeróbios são capazes de metabolizar a matéria orgânica presente nestes efluentes, gerando hidrogênio (H₂) ou metano (CH₄) - produtos de grande interesse devido à elevada densidade energética. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um processo de produção sequencial de hidrogênio e metano utilizando glicerina ou POME como matérias-primas, de forma a incorporar um maior percentual de átomos das matérias-primas nos produtos, em comparação com os processos de produção destes gases separadamente. Foram empregados glicerina ou POME fornecidos por indústrias brasileiras e lodo anaeróbio cedido pela CEDAE. Para produção de H₂ o lodo anaeróbio foi pré-tratado a pH 2,0 por 1h para seleção dos organismos produtores do gás de interesse, enquanto para produção de CH₄ foi empregado o lodo anaeróbio *in natura*. O POME foi hidrolisado com 0,75% m/v de PEV (Preparado Enzimático Vegetal) por 2h, a 45 °C; pH 7,0 e 200 rpm, para liberação dos ácidos graxos de cadeia curta. A glicerina foi diluída a 4 g/L. Uma primeira etapa de produção de H $_2$ foi conduzida a 35 °C, pH 6,5 e 150 rpm, utilizando 22,5 mL de glicerina ou 19 mL de POME e 10 g/L de sólidos suspensos voláteis de lodo pré-tratado. O efluente deste processo, denominado HPLW (do inglês, Hydrogen Production Liquid Waste) foi utilizado como matéria-prima para produção de CH₄, a 37 °C, pH 7,0 e relação lodo:HPLW de 1:3 (v/v). A partir de glicerina foram produzidos 20,3 ± 1,6 mL/L de H₂ após 23h de processo e 209,1 ± 25,7 mL/L de CH₄ após 20 dias de processo. A utilização de POME levou às produções de 584,0 ± 1,5 mL/L de H₂ após 24h de processo e 221,6 ± 5,5 mL/L de CH₄ após 25 dias de processo. Adicionalmente, o aproveitamento do HPLW promoveu a redução de DQO (demanda química de oxigênio) de 55% e 57% nos efluentes gerados a partir da fermentação de glicerina e POME, respectivamente. O processo seguencial para produção de H₂ e CH₄ a partir de glicerina ou POME engloba utilização de matérias-primas renováveis, aproveitamento de resíduos industriais, tratamento de efluentes, economia de átomos e eficiência energética, em um processo renovável e sustentável.



COMPARISON BETWEEN ACID AND THERMAL PRETREATMENT OF ANAEROBIC SLUDGE AND ITS APPLICATION AS INOCULUM FOR FERMENTATIVE HYDROGEN PRODUCTION

Mariana O. Faber^{1,2}, Ricardo Santana^{2,3} and Viridiana S. Ferreira-Leitão^{1,2}

¹ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Bioquímica

- ² Instituto nacional de Tecnologia, Divisão de Catálise e Processos Químicos
- ³ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química

E-mail: mariana.faber@int.gov.br

Currently, hydrogen is generated from fossil fuels, however the H₂ production using low-carbon methods, such as fermentative processes could be very interesting considering energy-saving and environmental aspects. The bioconversion of several raw materials into H_2 via dark fermentation can be performed either by consortia or by pure cultures of bacteria. Regarding the use of consortia, like anaerobic sludge, some advantages could be pointed out: simple manipulation, easy control and operation of the process, sterile conditions are not required which results in the reduction of global process cost, and the wild microorganisms are more resilient to unfavorable conditions. Nevertheless, there are both H_2 -producing and H_2 -consuming microorganisms in the anaerobic sludge; the presence of H_2 -consuming microorganisms could impair H_2 production, representing the main disadvantage of using anaerobic sludge as inoculum. With the aim of overcoming this disadvantage, it is possible to submit the inoculum to a pretreatment process in order to eliminate the undesirable microorganisms; several methodologies have been reported in this sense, amongst all, acid and thermal are the most used. In this work acid (AP) and thermal (TP) pretreatments of anaerobic sludge were evaluated as well as the stability of pretreated anaerobic sludge (PAS) and its potential application as inoculum to produce H₂ via fermentation of glycerin. Residual glycerin from Biodiesel production was chosen as raw material due to its high availability in Brazil and low added value, which might represent an economic issue to the Biodiesel production chain. AP was carried out at pH 2,0 for 1h and TP at 65°C for 30 minutes. AP-PAS and TP-PAS were acclimated at 35°C and pH 5,5 for 7 different periods. After acclimation the PAS was incubated at 35°C, pH 6 and 160 rpm with 1 g/L of glycerol from glycerin during 24h. Biogas production was quantified by gas chromatography; glycerol consumption and byproducts production were determined by liquid chromatography. For both tested pretreatments, the acclimation step does not offer significant improvement on H_2 yield. Comparing the pretreatments, PAS from TP was more stable. It was obtained 20.24 mL/L after 24h of fermentation. It is possible to conclude that TP is an efficient kind of pretreatment for anaerobic sludge; the PAS does not need acclimation before incubation on fermentative process, however it could be done if necessary, as PAS is stable for 21 h. Glycerin is a potential raw material to H₂ production by dark fermentation.



Hydrogen production using hemicellulosic fraction from Sugarcane straw by dark fermentation

Marina C. Tomasini^{1,2}, Mariana O. Faber^{1,2}, Viridiana Santana Ferreira-Leitão^{1,2}

¹ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Bioquímica.

² Instituto Nacional de Tecnologia

E-mail: marinalucy6@gmail.com

Brazil is the main sugarcane producer in the world. In the last year, 615 thousand tons of sugarcane was produced in Brazil. Sugarcane straw is a lignocellulosic residue from the sugarcane harvest, which corresponds to approximately 1/3 of the sugarcane plant. Hemicellulosic fraction, the second largest compound of lignocellulose, has mainly pentoses in its composition. However, C5 fraction obtained from sugarcane straw show great potential as raw material for hydrogen production by dark fermentation. Hydrogen is a promising fuel, with a high energy density (142 kJ/g) and provides only water during its combustion. The aim of this study was to convert pentoses from sugarcane straw hemicellulose into hydrogen through dark fermentation. After straw chemical characterization, 22,5% of sugarcane straw was represented by hemicellulose, 28,9% by cellulose and 20% by lignin. An acid pretreatment was carried out (121°C; 30 min; Straw:H₂SO₄ 2,9% = 1:4 (m/v)) to solubilize the hemicellulosic sugars and the liquid fraction obtained, called hemicellulosic hydrolysate, was used as raw material in the dark fermentation. Anaerobic sludge was the source of fermentative microorganisms; in order to inhibit the H2-consuming organisms, the anaerobic sludge was submitted to a thermal pretreatment at 65°C for 30 min. The fermentation process was performed in 100 mL penicillin bottles containing 90 mL of the fermentation medium, which was composed by hemicellulosic hydrolysate (1g/L or 5g/L of total carbohydrates) and pretreated anaerobic sludge (10 g_{SSV}/L). The fermentative medium was purged with nitrogen for 45 seconds to promote anaerobiosis and then all flasks were incubated at 35°C and 160 rpm for 24 hours. During fermentative process, the highest hydrogen yield occurred in lower initial concentrations of substrate (2,14 mol_{H2}/mol_{total} carbohydrate) moreover, all the substrate was consumed. Using 5g/L of hemicellulosic hydrolysate carbohydrates, the production yield was 0,78 $mol_{H2}/mol_{total carbohydrate}$ and 77% of the substrate was consumed after 24h. Acetic and butyric acids were produced as fermentation by-products in both cases, demonstrating the main metabolic pathway choose by the microorganisms. Thus, the acid pretreatment was effective for carbohydrate solubilization from hemicellulose; and the hemicellulosic hydrolysate was an interesting raw material to fermentative hydrogen production. Furthermore, it was observed high H₂ yields at lower concentrations of substrates, however, a kinetic study is necessary to deeply understand the formation of fermentative products and consumption of substrates.

Contents lists available at ScienceDirect



Renewable and Sustainable Energy Reviews

journal homepage: www.elsevier.com/locate/rser

Palm oil mill effluent (POME) as raw material for biohydrogen and methane production via dark fermentation



Alessandro N. Garritano^{a,b}, Mariana de Oliveira Faber^{a,b}, Lívian R.V. De Sá^a, Viridiana S. Ferreira-Leitão^{a,b,*}

^a Biocatalysis Laboratory, National Institute of Technology (INT), Ministry of Science, Technology, Innovation and Communication (MCTIC), 20081-312 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Federal University of Rio de Janeiro, Institute of Chemistry Department of Biochemistry, 21941-909, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords: POME Dark fermentation Biological hydrogen Biological methane Organic load reduction Integrative process

ABSTRACT

The Palm Oil industry is growing faster, as the global demand for its products greatly overcomes its production. As palm oil production increases, also does its effluent, Palm Oil Mill Effluent (POME). POME is a complex effluent, which is not toxic, but due to its elevated organic content, it is considered extremely polluting. Generally, POME is submitted to both physical and chemical treatments before being discarded into receiving streams or other water bodies. This process might be costly for the industry and there 98is no income from effluent treatment, therefore another destination for this effluent is desirable. As an alternative, this residue could be exploited as raw material in biological processes, specially hydrogen and methane production, due to the presence of carbohydrates, lipids and proteins that might be metabolized during the dark fermentation process. Hydrogen can be used in different industries, such as chemical, biochemical and food industries. This review approaches sustainable and renewable processes for POME exploitation as raw material for renewable energy production.

1. Introduction

Palm oil is a major commodity for developing countries in Southeast Asia, specially Indonesia and Malaysia, which are responsible for 86% of the global production [1]. While global demand increases, Thailand, Colombia and, more recently, Brazil are also beginning to emerge as key players of that market [2,3].

The main reasons why palm oil consumption has been on the rise in the last years are their multiple uses (e.g., food industry, biofuels, cosmetics) and lower cost when compared to other oils [4]. The global palm oil market was valued at USD 62 million in 2014 and it is expected to reach USD 88 million by 2022, with a production of 128.20 million tons of oil/year, of which approximately 11.5% will be palm kernel oil [5].

In order to supply world demand for palm oil, its producers are augmenting the total production, also elevating the amount of residues generated in the process. The oil extraction generates a highly polluting residue, Palm Oil Mill Effluent (POME), which cannot be spilled directly into water bodies [6]. POME is a complex effluent, which is not toxic, but due to its elevated organic content, is considered extremely polluting [7]. Its characterization might vary according to the production process and raw material utilized [8–10]. While technologically advanced mills could process up to 150 MT of fresh fruit branches (FFB) per hour and generate POME with Chemical Oxygen Demand (COD) as low as 16 g O₂/mL, more primitive ones are able to process up to 2.5 MT of FFB and can originate POME with a COD as high as 100 O₂/mL [8,11]. There are several steps in the Palm oil production process, but POME is produced mainly during three of them: the sterilization of bunches, after kernel separation from the shells (in a hydrocyclone) and after oil clarification [12]. As observed, it is a complex material, containing high concentrations of organic material, oil and greases and suspended solids. Therefore, adequate treatment or usage is necessary before discharging it into rivers or seas [13–15].

Usually, treatment stations are considered non-profitable investments, leading to insufficient treatment of the effluent and, therefore, contamination of the surrounding area and water bodies. POME is usually treated by non-biological treatments as coagulation–flocculation,

E-mail address: viridiana.leitao@int.gov.br (V.S. Ferreira-Leitão).

https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.031 Received 9 March 2017; Received in revised form 24 November 2017; Accepted 14 April 2018 1364-0321/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

^{*} Corresponding author at: Biocatalysis Laboratory, National Institute of Technology (INT), Ministry of Science, Technology, Innovation and Communication (MCTIC), 20081-312 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

adsorption or membrane filtration [16–19]. Neither of those methods were able to treat POME adequately, while generating income to the industry [13]. A more economically, viable and environment friendly alternative is to use POME as raw material to biological processes [20], such as polymers production, methane and biohydrogen production and also for biodiesel synthesis [21–23].

As for hydrogen, this gas is very interesting since it could be used as feedstock in various processes, such as petrochemical, food, microelectronics, ferrous and non-ferrous metal processing, chemical and polymer synthesis, and metallurgical process industries [24] or as combustible in fuel cells [25]. Several researches have focused on the fuel application of hydrogen due to its clean combustion, high specific energy and non-toxicity; associated with the current scenario of depreciation of petroleum price and increment on sustainable development [23,25,26]. Although most hydrogen is produced by chemical routes from fossil sources [27], development of a biotechnological process to produce hydrogen is very attractive from a sustainable development perspective, since it applies renewable resources and requires low energy inputs as compared to chemical processes.

As for methane, it is a gas, whose world reserves have been dwindling quickly, as it is widely used. In addition to its elevated calorific power, the main reason for its fast depletion is its simple extraction process, as it is generally found in abundance in petrol wells [28]. It is widely used in industries or domestic houses to generate power [29]but more noble uses are being applied to it, such as methanol synthesis [30,31] or converting CH₄ and CO₂, two greenhouse gases, into synthesis gas [32]. Literature is extensive in what regards CH₄ production from biomass via chemical or biochemical processes. Amongst the biochemical processes, which can be carried under atmospheric pressures and room temperatures, anaerobic digestion is a traditional and well known technology, allowing high yields of CH₄. [33,34]. Furthermore, anaerobic digestion is an alternative solution for providing energy for remote areas, which is still an issue for the major producers of POME, such as Indonesia and Malaysia [35]. In addition to the fact that this energy can be used locally, it is also possible to supply the country's electrical system with the exceeding power generated by H₂ and CH₄ combustion.

This review approaches the employment of POME as raw material for hydrogen and methane production via a dark fermentation process, as well as a sequential production of hydrogen and methane, providing an interesting alternative that meets environmental conservation and energy production in a sustainable model, which could benefit local communities in remote areas.

2. The dark fermentation process

2.1. General aspects of dark fermentation

A Dark fermentation process consists in the application of strict or facultative anaerobic organisms for converting substrates, such as simple sugars, glycerol, fatty acids and carbohydrates into volatile fatty acids, alcohols, solvents, CO_2 , H_2 and CH_4 [36,37].

The main advantages of dark fermentation as compared to other biological processes for hydrogen production lie in its light-independence and consequently low energy input requirement, the possibility of employing renewable biomasses as feedstock and faster H_2 production rates [37–39]. On the other hand, the bottlenecks of this process are low yields of H_2 and large quantities of by-products in the final medium [40]. However, most of these by-products are valueadded, like organic acids, 1,3-propanediol and ethanol [34], which might be recovered from the medium.

Moreover, hydrogen production liquid waste (HPLW) might be applied as raw material for production of methane, lipid, bioplastic and electricity [34]. Also, HPLW could be utilized in a photofermentation system in order to provide electron donors, generating more H_2 in a hybrid process [41].

Dark fermentation of agro industrial wastes associated with the utilization of HPLW either for bioproducts recovery or as raw material in other processes represents a promising alternative to hydrogen production from a biorefinery perspective.

2.2. POME to H_2 via dark fermentation

As discussed in Section 1, POME is a complex material and its composition varies depending on palm oil processing. Generally, POME contains high concentrations of organic molecules such as fatty acids, proteins, carbohydrates, nitrogenous compounds, lipids (including triacylglycerol); and minerals [42]. This organic matter could be metabolized during dark fermentation processes either by pure culture or bacterial consortia.

Bacterial consortia, such as anaerobic sludge, are mainly used when complex materials are applied as feedstock, due to the presence of assorted organisms that could act synergistically, enhancing the degradation and consumption of these materials [43–45]. When a consortium of bacteria is used as inoculum, degradation of complex material occurs in four phases: hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis [43,46,47], in which different organisms act concurrently, as represented in Fig. 1.

Firstly, complex substrates, such as long chain fatty acids and triacylglycerols are hydrolyzed into simpler molecules, such as oleic acid, palmitic acid and glycerol by hydrolytic bacteria. In the second phase, acidogenic bacteria promote the conversion of those molecules into volatile fatty acids, typically acetic and butyric acids; and eventually alcohols, like 1,3-propanediol (formed by glycerol metabolism) and ethanol. In the sequence, the metabolism of organic acids generates acetate and butyrate and also cogenerates H_2 during acetogenesis. Finally, generated H_2 might be reduced to methane by methanogenic microflora [48]. However, since POME is a complex material, the substrates could not be easily available for bacterial cells, resulting in long adaptive phases and/or low conversion rates [49].(Fig. 2)

In order to produce hydrogen, it is mandatory to eliminate H_2 consuming bacteria from the medium, avoiding methanogenesis [38]. Since most of H_2 -producing organisms are able to sporulate, it is relatively simple to eliminate H_2 -consuming microorganisms when using mixed cultures [50]. The basis of pretreatment is to stimulate the sporulation of H_2 -producing bacteria and to eliminate non-spore forming bacteria, typically H_2 -consumers, by establishing a hostile environment. There are several types of pretreatment that can be chosen considering the microflora in the seed sludge [43,51]. An alternative



Fig. 1. Schematic model for dark fermentation of POME by bacterial consortia.



Fig. 2. Methane consumption increase forecast until 2040. It is estimated that CH_4 demand will rise, accompanying the global necessity for power. Source: IEO (2016).

source of hydrogen consumption is the sulfate reducing bacteria metabolism. Sulfate reducing bacteria (SRB) are able to capture hydrogen produced in dark fermentation in concentrations as low as 0.02 ppm and convert it into sulfidric acid (H₂S) when sulfate is present in the medium [52]. Previous studies determine that SRB have a thermodynamic advantage over homoacetogenic and methanogenic bacteria, as its reaction releases 165 kJ per mol of hydrogen [53]. In order to minimize the effect of SRB in sulfate rich mediums, enhancing the hydrogen content, pH values around 5.5 are reported to present the highest yield of hydrogen [52].

Another approach towards bacterial culture for hydrogen production is the isolation of some species from anaerobic sludge and their application as pure or co-culture [54–57], suspended or immobilized [58,59]. There are miscellaneous bacteria in the anaerobic sludge, as presented in Table 1 that might be isolated and applied as pure inocula. In this universe, *Clostridium sp.* and *Enterobacter sp.* are mainly studied, due to their endogenous capability of generating higher H₂ yields [38,45,60].

Hiligsmann et al. [55] compare H_2 production by several species of *Clostridium sp.* isolated from anaerobic sludge. No significant improvement was observed, which indicates that anaerobic sludges are more profitable for H_2 production than pure cultures, especially when a

Table 1

Main species of bacteria presented in the anaerobic sludge (Guo et al., 2010; Ntaikou et al., 2010; ATCC, 2016).

Organism	Characteristics
Clostridium butyricum	mesophile, strict anaerobic and
	spore forming
Clostridium acetobutyricum	mesophile, strict anaerobic and
2	spore forming
Clostridium beijerinckij	mesophile strict anaerobic and
Stood talant boyot bloka	spore forming
Clostridium thermolacticum	thermophile, strict anaerobic and
Close talant elemotactican	spore forming
	spore forming
Clostriaium tyrobutyricum	mesophile, strict anaerobic and
	spore forming
Clostridium thermocellum	thermophile, strict anaerobic and
	spore forming
Clostridium paraputrificum	mesophile, strict anaerobic and
	spore forming
Escherichia coli	mesophile, facultative anaerobic
Enterobacter aerogenes	mesophile, facultative anaerobic
Enterobacter cloacae	mesophile, facultative anaerobic
Caldicellulosiruptor saccharolyticus	thermophile, strict anaerobic
Thermoanaerobacterium	thermophile, strict anaerobic
thermosaccharolyticum	,
Thermotoga maritima	thermophile, strict anaerobic
Thermotoga alfii	thermophile, strict encorobia
Desillus secondare	maanhila facultating anoanshia
Bacillus coagulans	mesophile, facultative anaerobic

complex material is used as substrate due to the mechanism of action on synergism of seed sludge microflora. Additionally, Mishra et al. [57] tested a pure culture of *Klebsiella pneumonia*, a co-culture of *K. pneumonia* and *Clostridium freundii*, and an acidogenic mixed consortium in order to produce hydrogen from distillery effluent. Once more, mixed consortium showed the best result. They also pointed *Clostridium sp*. as the major contributing species in the mixed culture applied in that study.

According to Hung et al. [45], other organisms rather than *Clostridium* sp. present in anaerobic sludge have significant roles in H_2 production. For instance, *Enterobacter aerogenes* and *Bacillus sp.* could contribute to the dark fermentation process by supporting the anaerobic environment maintenance; *Streptococcus sp.* could interact with *Clostridium sp.* forming a granular structure that increases hydrogen production; and *Bifidobacterium sp.*, *Bacillus sp.* and *Megasphaera sp.* might assist hydrogen production by breaking down complex materials.

In the literature, a wide variety of *mesophilic* hydrogen producing bacteria has been reported, such as *Clostridia* (*C. butyricum*, *C. pasteurianum*, *C. saccharobutylicum*) and *Enterobacter* (*E. aerogenes*). Termophilic hydrogen producing bacteria as *T. thermosaccharolyticum*, *C. thermocellum* and *B. thermozeamaize* have also been reported. However, its optimum hydrogen production, even though higher than *mesophilic* bacteria, requires considerable energy input [61–63]

Table 2 shows results reported in the literature involving the application of POME as a substrate source for hydrogen production through the use of a mixed culture. Both thermophile and *mesophile* sludges were successfully employed in different researches.

Some authors submit POME to pretreatment in order to enhance substrate bioavailability. Leaño et al. [65] employed ultrasonication of POME aiming to improve substrate surface area; as a result, productivity increased by 38%. A 49% increment was achieved by Pisutpaisal et al. [15] when an ozonated POME was used for hydrogen production. According to the authors, ozonation pretreatment could break down complex molecule into simpler molecules that might be easily converted into hydrogen. Nevertheless, the pretreatment of POME in order to raise the bioavailability of its substrates is still an incipient approach towards biohydrogen production enhancement. Research should be developed as an effort to evaluate different types of pretreatment and to elucidate its mechanisms to turn substrates more accessible for bacterial cells.

Valladão et al. [70] used an enzyme pool to hydrolyze poultry slaughterhouse effluent, rich in fats and proteins, into free acids that could be metabolized by microorganisms. Additionally, Serri et al. [71] demonstrated a satisfactory enzymatic hydrolysis of triglycerides into fatty acids and glycerol, feasible molecules for dark fermentation. It is known that POME holds palm oil traces, triglycerides, carbohydrates and proteins; hence, enzymatic hydrolysis could be an interesting alternative in that it applies hydrolases for enhancing bioavailability of POME. In this sense, Garritano et al, [49] showed that previous POME hydrolysis by plant enzyme preparation improved H₂ productivity by 102%.

The hydrogen produced by dark fermentation of POME might be used in fuel cells for electricity generation. Lin et al. [72] used the hydrogen purified from H₂-rich gas produced by dark fermentation into a proton-exchange-membrane fuel-cell (PEMFC) system to generate electricity. An analogous system was used by Campo et al. [73] without any hydrogen purification step. An Electrolyte Membrane (PEM) fuel cell was chosen by Martínez et al. [74] to convert fermentative hydrogen without further purification into electricity. This electricity could feed the palm oil production plant or even supply the local energy demand [75].

The aforementioned studies confirm the high potential for using biohydrogen in fuel cells. However, there are some challenges related to such use. The possible presence of H_2S in the biogas could be a barrier to this application, since this compound severely poisons the fuel cell catalyst [76]; hence, in that case a separation system is needed. In

Table 2					
Results reported in literature	applying POME for	biohydrogen	production	using mixe	ed culture

Mode of Operation	Pretreated POME	Temperature (°C)	рН	H ₂ Production (mL _{H2} /L _{POME})	Productivity (mL _{H2} /L _{POME} .h)	H ₂ Yield (mL _{H2} /g _{COD})	Reference
Batch	No	60	5.5	4708.0	454.0	-	Atif et al. [10]
Batch	Ozonation	55	6.0	479.8	11.0	77.1	Tanikkul and Pisutpaisal [14]
Batch	Ozonation	37	6.0	-	-	182.3	Pisutpaisal et al.[15]
Batch	No	36	5.8	1321.0	144.0	-	Rasdi et al. [64]
Batch	Ultrasonication	44	7	-	-	17.1	Leaño et al.[65]
Batch	No	35	5.5	1084.1	22.6	10.0	Mohammadi et al. [66]
Batch	No	37–55	6	985.3	76.0	27.1	Yossan et al.[67]
Batch	No	60	5.5	3430.0	-	-	Mamimin et al.[68]
Batch	Acid hydrolysis	38	5.8	2023.7	-	-	Krishnan et al. [69]
Batch	No	35	6.5	2429.7	101.2	-	Garritano et al.[49]
Batch	Enzimatic	35	6.5	2752.3	229.3	57.3	Garritano et al.[49]
Fed Batch	No	60	5.5	2419.0	436.0	-	Atif et al.[10]
Continuous	No	60	5.5	4200.0	-	-	Singh et al. [58]
Continuous	No	37	5.5	3534.0	589.0	-	Valladão et al.[70]
Continuous	No	55	5.5	-	80	215	Krishnan et al. [69]

addition, the H_2 volume and yield determine the feasibility regarding commercial implementation [77]. According to Rahman et al. [77], the integration between biological hydrogen production and fuel cell electricity generation would be possible in the future, as long as high yield and production rates are achieved, as well as efficient separation systems.

3. General aspects of methane production and usage

Worldwide consumption of methane is projected to increase from 120 trillion cubic feet (tcf) in 2012–203 tcf by 2040 (International Energy Outlook report, 2016). Regarding all the energies sources being used nowadays, natural gas has seen the largest increase amongst them all. This is not only due to its calorific power of approximately 55 MJ/kg, which turns the gas into an interesting combustible to generate power, but also the fact that it is often found in the same drill well as petrol places methane in a competitive position amongst other possible combustible resources. The relatively easy extraction process of CH_4 has contributed to popularize the use of this gas in several sectors of industry.

In order to accompany the rise of natural gas demand projected in the International Energy Outlook (IEO, 2016) the biggest producers of methane will need to increase their supplies by almost 69% until 2040, which would represent a big impact in natural CH₄ reserves. Furthermore, in a six-year window, 12 countries became natural gas importers, among which three of the biggest palm oil producers – Malaysia, Indonesia and Thailand.

In this sense, as methane obtained from drill wells is not a renewable resource, researches are being developed in order to verify the feasibility of producing it through different ways and one of the most interesting ones is via anaerobic digestion. It is known that POME is a suitable effluent not only for hydrogen, but also for CH_4 production via anaerobic digestion. Due to the recently developed necessity for methane in major palm oil producer's countries, publications in this area have become more abundant.

3.1. Pome to CH_4 via anaerobic digestion

Methane production via anaerobic digestion occurs by two different metabolic pathways: acetic acid dismutation into CH_4 and CO_2 ; and H_2 reduction performed by anaerobic methanogenic archaea [78]. If the reactor is operated under *mesophilic* conditions, most of CH_4 production will occur via the first pathway, while under thermophilic conditions, the second pathway is favored [28].

The main difference between dark fermentation aiming H_2 production and anaerobic digestion aiming CH_4 production is the action of

methanogenic archaea. Although the majority of CH₄ production in a methanogenic system derives from CO₂ reduction (CO₂ + 4H₂ \rightarrow CH₄ + 2H₂O) process by methanogens, a small amount is derived from acetate fermentation [79]. In this metabolic pathway, acetic acid undergoes a dismutation reaction, catalyzed by an enzyme, to produce CH₄ and CO₂. In the reaction, an electron is transferred from the carbonyl function to the methyl group of acetic acid, producing CH₄ and CO₂ [80].

Table 3 shows results reported in the literature for methane production using POME as raw material and whether or not it was submitted to a pretreatment. Similarly, for hydrogen producing processes, some authors submit POME to different pretreatments aiming higher methane yields. The highest yields were obtained by using pretreated POME. Ozonation pretreatment performed by Chaiprapat and Laklam [81] was capable of augmenting CH₄ yield by seven times when compared to control conditions. Similar yield results were obtained by Azhari and Abdurahmana [82] through the use of ultrasonicated POME. As discussed in Section 2.2, POME pretreatment aims to increase nutrients bioavailability to fermentative microorganisms. In this manner, not only H₂ yields are increased, but POME pretreatments also play a major role regarding methane production improvement.

Different strategies have been tested with a view to enhancing methane production. According to M. Y. Nurliyana et al. [86], the addition of Empty Fruit Branches (EFB) modifies the C/N ratio, increasing the availability of nitrogen in the medium. Nitrogen is an essential element for aminoacids and nucleic acids synthesis and its depletion may incur in slower growth. In this manner, the provision of adequate quantities of this element augments final methane yield by 11, 9 times as compared to the control experiment. In order to avoid hydrogen consumption, it is recommended to carry CH_4 production as a sequential process to hydrogen production.

3.2. Sequential production of H_2 and CH_4

While the vast majority of H_2 and CH_4 generation are being held separately, an integrated system is being successfully reported in the recent literature [88]. In this integrated approach, H_2 and volatile fatty acids (VFA) are generated simultaneously in a first step and the residual fermentative media, after H_2 recovery, is used for methane production [89,90]. In this context, Lin et al. [91] connected an UASB reactor in series with a CSTR and would submit POME to dark fermentation in the system. In UASB, H_2 was generated alongside with dark fermentation byproducts, such as VFAs and small chain alcohols; then HPLW was conducted to the CSTR. Approximately 75% of the total CSTR volume was filled with HPLW, while 15% was made up of untreated sewage sludge (rich in methanogenic microflora). The study reported an energy

Table	3
-------	---

D14-	and the second second	1 1 t.e.		1	DOME	C			1	· · · •			
Recitize	renortea	10 1176	-ramire	$annivin\sigma$	PUMP	tor	mernane	production	nv	ileino	a m	ven	CITITITE
ncouno.	reporteu		Juluic	addiving	I ONL	101	mediane	Diouucuon	D V	uome	a m	incu	culture.

Mode of Operation	Pretreated POME	pН	CH_4 Production (mL _{CH4} /L _{POME})	Productivity (m L_{CH4}/L_{POME} .h)	CH_4 Yield (mL _{CH4} /g _{COD})	Reference
Continuous	No	6.8	17,800	247.22	356.0	Najafpour et. al [83]
Continuous	No	7.0	3490	145.41	61.5	Chaiprapat and Laklam [81]
Continuous	Ozonation	7.0	26,010	1083.7	646.1	Chaiprapat and Laklam [81]
Continuous	No	6.8	25,230	1051.2	580	Abdurahman et al. [84]
Continuous	No	7.0	5776	240.66	361	Faisal and Unno[85]
Continuous	EFB ^a	5.6	20,000	833.33	-	Nurliyana et. al [86]
Continuous	No	7.2	16,800	700	240	Chan et. al [87]
Continuous	Ultrasonication	7	26,790	1116.2	470	Abdurahmana et. al [82]
Continuous	No	5.5	-	133.3	320	Krishnan et. al [69]

^a EFB: Empty Fruit Branches.

yield of 15.43 MJg_{COD}⁻¹, one of the highest energy yields in the literature obtained by using POME as raw material, due to the combination of hydrogen and methane generation system.

It was shown in Section 2.1 that dark fermentation alters the fermentation media composition, as fermentative bacteria are able to metabolize complex molecules into simpler ones, while producing a mixture of biogas. As H_2 production via dark fermentation advances, HPLW will require adequate treatment. Interrupting the fermentative process in acidogenesis (in which H_2 is produced and recovered) will generate an effluent rich in organic matter [92]. An economically feasible way to solve this problem would be to carry out the dark fermentation process until its last step – methanogenesis [93].

Methanogenic metabolism is capable of catalyzing the generation of CH_4 while consuming the acetic acid present in HPLW, drastically reducing COD contents, as under anaerobic conditions, the mineralization of organic matters is incomplete unless methane is produced [94]. In this sense, some articles [95-97] have demonstrated that a process in which a second reactor (Fig. 3) would capture the HPLW generated in the first step of the process could be coupled in the system line by using the effluent of H_2 producing process for generating CH_4 , augmenting overall gas production.

As shown in Table 4, the sequential process has been more widely studied in the last few years and provides interesting results. A 94% COD removal was achieved by Krishnan et al. [96]. The same author also managed to obtain the highest hydrogen yield and productivity and the second highest methane yield by using POME as raw material and by making use of a continuous process. Nualsri et al. [88], obtained the highest methane yield and productivity. This is not only due to a continuous process, but also by the raw material used, which was sugarcane juice. Sugarcane juice is a simple raw material that is made up

mainly of carbohydrates, molecules easily assimilated by bacteria during dark fermentation.

Taking into account that palm oil industries are located in developing countries, the sequential production of H_2 and CH_4 is attractive since it is a simple process derived from a traditional technology, that could treat an effluent while generating energy and fuels. These products might be used in the industry itself, adding value to the global process and reducing costs with energy consumption and effluent treatment, or generating energy locally to the neighborhood, diminishing logistics issues related to gas transportation. In addition, the sequential process does not require complex reactors or light source. Fig. 4 shows a schematic representation of energy generation in a palm oil plant integrated with hydrogen and methane production. A generation of 5 L of POME was considered for each 1 L of palm oil produced with a COD of 56,000 mg_{O2}/L and a 30% loss in energy conversion. It would be possible to produce 3.3 MJ/L_{PalmOil} and reduce the chemical oxygen demand of the effluent by 94%.

4. Other applications of POME

POME is a versatile raw material, which can be used not only for producing biogas via dark fermentation but in a series of other processes [34,87]. It was successfully reported to be an adequate component of microalgae growth medium mainly because of its organic content, but also due to the presence of nitrate and orthophosphate in its composition [99,100]. Those organisms consume POME for biodiesel production [101] and consequently reduce the chemical oxigen demand from effluent. This represents both an increase in the economic potential of the industry and also an advance in the environmental question regarding final POME disposal.

Fig. 3. Sequential H_2 and CH_4 production representative scheme: POME and pre-treated sludge are added into a first reactor, in which hydrogen will be produced via dark fermentation. The sludge precipitates and is discarded, while HPLW goes to a second reactor and is inoculated with *in natura* anaerobic sludge for CH_4 production.



Table 4

Results reported in literat	ure applying different raw	materials for sequential l	hydrogen and methane	production through t	he use of a mixed culture.
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·				F	

Raw Material	Mode of Operation	H2 Yield (mLH2/gCOD)	H2 Productivity (mLH2/ gCOD.d)	CH4 Yield (mLCH4/gCOD)	CH4 Productivity (mLCH4/gCOD.d)	Total COD removal	References
Glucose	Batch	159	53.0	284	17.8	-	Giordano et al. [97]
Food Industry Waste	Batch	45.8	15.3	274	6.9	-	Giordano et al. [97]
Tequila Vinasses	Batch	190	10.5	257.9	7.2	75%	Buitrón et al. [98]
Sugarcane Syrup	Batch	91.7	-	298	8.2	95%	Nualsri et. al[88]
Sugarcane Syrup	Continuous	87.5	700	270	90	97.5%	Nualsri et al. [88]
POME	Continuous	215	107.5	320	64	94%	Krishnan et al. [96]
POME	Continuous	180	90	271	18.1	-	O-Thong et al. [62]



Fig. 4. Potential energy generation of a sequential $H_2 + CH_4$ dark fermentation process, considering: 30% of loss; POME generation of $5 L_{POME}/L_{PalmOil}$; COD content of 56,000 mg_{O2}/L_{POME}; 215 L_{H2}/kg_{COD} and 320 L_{CH4}/kg_{COD} [96]; 890 kJ/mol_{CH4}; 286 kJ/mol_{H2}.

POME has also been added as an ingredient to growth media for a variety of bacteria. As it constitutes a rich medium, without inhibitors, a satisfactory microorganism growth is observed [102]. In the case of a submerged fermentation process, the microorganism inoculated will produce a secondary metabolite that has aggregated value. The organic material present in POME is consumed while the bacterial population grows, and, along with bacterial growth, the concentration of secondary metabolites also increases [103,104].

It can also be used for producing hydrogen in a photofermentative system, in which Purple non-sulfur bacteria (PNSB) acts to produce H_2 . During the growth phase, these bacteria use organic compounds, such as small organic acids, as electron donors to form ATP for their metabolic processes [105]. Electrons obtained in the oxidation of those acids travel through a variety of electron carrier proteins and are delivered to ferredoxin, which delivers them to nitrogenase. In the presence of molecular nitrogen, nitrogenase catalyzes the formation of ammonia, while under anaerobic conditions the enzyme acts as a hydrogenase dependent of ATP, using electrons generated during organic acids oxidation for reducing protons and forming molecular hydrogen [106,107].

Also, a sequential process combining both dark fermentation and photofermentation has been studied and promising results have been reported [79,89,108]. Photofermentative organisms use dark fermentation secondary metabolites as substrate to H_2 production, increasing biogas yield. While some of the secondary metabolites produced do not impair cell growth, acetate concentration is critical in the fermentation media, and can reduce H_2 production [96]. The increase in the acid concentration in the medium will lower its pH, altering the optimal condition for H_2 production [109]. Photofermentative organisms are able to oxidize organic acids generated in dark fermentation and generate ATP in the process. The oxidation of those molecules generates

hydrogen in the process and maintains an optimal environment for H_2 production, while diminishing COD contents and making the residual fluid more environmentally friendly.

5. Final remarks

Nowadays, sustainable development is a huge concern around the world. In this context, the palm oil industry is in keeping with this trend, since it encourages family farming, which fosters development of poor areas. For instance, in Malaysia, 30% of palm oil is produced by small farmers [100]. In the Brazilian county Moju, in Pará state, human development Index (HDI) increased 90% from 1991 until 2010 due to a policy that stimulated palm cultivation (Brazilian Senate, 2015). Furthermore, palm could be cultivated in degraded lands, making feasible industry expansion while avoiding greenhouse gas emissions from deforestation. In ethanol producing countries, where the soil is progressively degraded by sugarcane monoculture, a viable option is to alternate between palm and sugarcane crops, combining soil recovery and ethanol and palm oil production [110].

As the palm oil industry will continue to grow in the near future so will the yearly production of its effluent. Therefore, it is mandatory to find an economically viable use for POME. A noble and interesting use for POME would be to convert it into a biogas, which could be used for generating power locally. Biological processes provide an interesting approach towards biogas generation through effluents. Of all biological processes, dark fermentation has the highest H_2 yields and produces both CH_4 and H_2 .

The integration between palm oil industry and biogas ($H_2 + CH_4$) production represents an interesting approach in keeping with green chemistry principles, since almost all of them might be achieved in this global process, in particular the use of renewable feedstock, design for energy efficiency and design for degradation.

Acknowledgements

This work was supported by Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) grant numbers 1483847, 1664262 and 1558883, Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) grant number 3128842015-0, Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro – Carlos Chagas Filho (FAPERJ) grant number E-26/010.001659/2014 and Ministry of Science, Technology, Innovation and communication (MCTIC).

References

- [1] IndexMundi. Worldwide palm oil production; 2015.
- [2] Kuss VV, Kuss AV, Rosa RG Da, Aranda D aG, Cruz YR. Potential of biodiesel production from palm oil at Brazilian Amazon. Renew Sustain Energy Rev 2015;50:1013–20. http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.055.
- [3] Castiblanco C, Moreno A, Etter A. Impact of policies and subsidies in agribusiness: the case of oil palm and biofuels in Colombia. Energy Econ 2015;49:676–86.

http://dx.doi.org/10.1016/j.eneco.2015.02.025.

- [4] Hansen SB, Padfield R, Syayuti K, Evers S, Zakariah Z, Mastura S. Trends in global palm oil sustainability research. J Clean Prod 2015;100:1–10. http://dx.doi.org/ 10.1016/j.jclepro.2015.03.051.
- Bott R. Palm Kernel Oil Production by country in 1000 MT. IndexMundi 2016;1:1. http://dx.doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2.
- [6] Permpool N, Bonnet S, Gheewala SH. Greenhouse gas emissions from land use change due to oil palm expansion in Thailand for biodiesel production. J Clean Prod 2015:1–7. http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.05.048.
- [7] Kamarudin KF, Tao DG, Yaakob Z, Takriff MS, Syukri M, Rahaman A, et al. A review on wastewater treatment and microalgal by-product production with a prospect of palm oil mill effluent (POME) utilization for algae. Der Pharma Chem 2015;7:73–89.
- [8] Madaki YS, Seng L. palm oil mill effluent (POME) from Malaysia palm Oil Mills: waste or resource. Nternational J Sci. Environ Technol 2013;2:1138–55.
- [9] Singh L, Siddiqui MF, Ahmad A, Rahim MHA, Sakinah M, Wahid Z a. Biohydrogen production from palm oil mill effluent using immobilized mixed culture. J Ind Eng Chem 2013;19:659–64. http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2012.10.001.
- [10] Atif aaY, Fakhru'L-Razi a, Ngan M a, Morimoto M, Iyuke SE, Veziroglu NT. Fed batch production of hydrogen from palm oil mill effluent using anaerobic microflora. Int J Hydrog Energy 2005;30:1393–7. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene. 2004.10.002.
- [11] LTDA (Sinoder Indutech machinery co. FFB (Fresh Fruit Bunch) of Oil Palm into CPO (Crude Palm Oil) Oil Mill Plant; 2016.
- [12] Lam MK, Lee KT. Renewable and sustainable bioenergies production from palm oil mill effluent (POME): win-win strategies toward better environmental protection. Biotechnol Adv 2011;29:124–41. http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010. 10.001.
- [13] Hameed BH, Ahmad AL, Hoon NG aI. Removal of residual oil from palm oil mill effluent using solvent extraction method. J Teknol 2007;38:33–41.
- [14] Tanikkul P, Pisutpaisal N. Biohydrogen production under thermophilic condition from ozonated palm oil mill effluent. Energy Procedia 2014;61:1234–8. http://dx. doi.org/10.1016/j.egypro.2014.11.1066.
- [15] Pisutpaisal N, Tanikkul P, Phoochinda W. Improvement of mesophilic biohydrogen production from palm oil mill effluent using ozonation process. Energy Procedia 2014;50:723–8. http://dx.doi.org/10.1016/j.egypro.2014.06.089.
- [16] Parthasarathy S, Gomes RL, Manickam S. Process intensification of anaerobically digested palm oil mill effluent (AAD-POME) treatment using combined chitosan coagulation, hydrogen peroxide (H2O2) and Fenton's oxidation. Clean Technol Environ Policy 2016;18:219–30. http://dx.doi.org/10.1007/s10098-015-1009-7.
- [17] Tabassum S, Zhang Y, Zhang Z. An integrated method for palm oil mill ef fl uent (POME) treatment for achieving zero liquid discharge e A pilot study. J Clean Prod 2015;95:148–55.
- [18] Chan YJ, Jun W, Tan R, How BS, Lee JJ, Lau VY. Fuzzy optimisation approach on the treatment of palm oil mill effluent (POME) via up-flow anaerobic sludge blanket – hollow centered packed bed (UASB – HCPB) reactor. J Water Process Eng 2015;5:112–7.
- [19] Amat NAA, Tan YH, Lau WJ, Lai GS, Ong CS, Mokhtar NM, et al. Tackling colour issue of anaerobically-treated palm oil mill effluent using membrane technology. J Water Process Eng 2015;8:221–6.
- [20] Parthasarathy P, Narayanan KS. Hydrogen production from steam gasification of biomass: Influence of process parameters on hydrogen yield - A review. Renew Energy 2014;66:570–9. http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2013.12.025. [Review].
- [21] Chin MJ, Poh PE, Tey BT, Chan ES, Chin KL. Biogas from palm oil mill effluent (POME): opportunities and challenges from Malaysia's perspective. Renew Sustain Energy Rev 2013;26:717–26. http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.008.
- [22] Ahmed Y, Yaakob Z, Akhtar P, Sopian K. Production of biogas and performance evaluation of existing treatment processes in palm oil mill ef fl uent (POME). Renew Sustain Energy Rev 2015;42:1260–78. http://dx.doi.org/10.1016/j.rser. 2014.10.073.
- [23] Mekhilef S, Barimani M, Safari A, Salam Z. Malaysia's renewable energy policies and programs with green aspects. Renew Sustain Energy Rev 2014;40:497–504. http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.095.
- [24] Midilli A, Ay M, Dincer I, Rosen MA. On hydrogen and hydrogen energy strategies I: current status and needs. Renew Sustain Energy Rev 2005;9:255–71. http://dx. doi.org/10.1016/j.rser.2004.05.003.
- [25] Dodds PE, Staffell I, Hawkes AD, Li F, Grünewald P, McDowall W, et al. Hydrogen and fuel cell technologies for heating: a review. Int J Hydrog Energy 2015;40:2065–83. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.11.059.
- [26] Babita K, Sridhar S, Raghavan KV. Membrane reactors for fuel cell quality hydrogen through WGSR - Review of their status, challenges and opportunities. Int J Hydrog Energy 2011;36:6671–88. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.02. 107.
- [27] Show KY, Lee DJ, Tay JH, Lin CY, Chang JS. Biohydrogen production: current perspectives and the way forward. Int J Hydrog Energy 2012;37:15616–31. http:// dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.109.
- [28] Pawar SS, Byrne E, Niel EWJ Van. Enriched methane 2016:111–27. doi:10.1007/ 978-3-319-22192-2.
- [29] McKain K, Down A, Raciti SM, Budney J, Hutyra LR, Floerchinger C, et al. Methane emissions from natural gas infrastructure and use in the urban region of Boston, Massachusetts. Proc Natl Acad Sci USA 2015;112:1941–6. http://dx.doi.org/10. 1073/pnas.1416261112.
- [30] Olah GA. Towards oil independence through renewable methanol chemistry. Angew Chemie - Int Ed 52. 2013. p. 104–7. http://dx.doi.org/10.1002/anie. 201204995.

- [31] Caballero A, Pérez PJ. Methane as raw material in synthetic chemistry: the final frontier. Chem Soc Rev 2013;42:8809. http://dx.doi.org/10.1039/c3cs60120j.
- [32] Seo HO, Sim JK, Kim K-D, Kim YD, Lim DC, Kim SH. Carbon dioxide reforming of methane to synthesis gas over a TiO2–Ni inverse catalyst. Appl Catal A Gen 2013;451:43–9. http://dx.doi.org/10.1016/j.apcata.2012.10.037.
- [33] Nurliyana MY, H'ng PS, Rasmina H, Kalsom MSU, Chin KL, Lee SH, et al. Effect of C/N ratio in methane productivity and biodegradability during facultative co-digestion of palm oil mill effluent and empty fruit bunch. Ind Crops Prod 2015;76:409–15. http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.047.
- [34] Sarma SJ, Pachapur V, Brar SK, Le Bihan Y, Buelna G. Hydrogen biorefinery: potential utilization of the liquid waste from fermentative hydrogen production. Renew Sustain Energy Rev 2015;50:942–51. http://dx.doi.org/10.1016/j.rser. 2015.04.191.
- [35] Jones RJ, Massanet-Nicolau J, Mulder MJJ, Premier G, Dinsdale R, Guwy A. Increased biohydrogen yields, volatile fatty acid production and substrate utilisation rates via the electrodialysis of a continually fed sucrose fermenter. Bioresour Technol 2017;229:46–52. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.015.
- [36] Han W, Ye M, Jun A, Ting H, Feng Y. Bioresource Technology Batch dark fermentation from enzymatic hydrolyzed food waste for hydrogen production. Bioresour Technol 2015;191:24–9.
- [37] Urbaniec K, Bakker RR. Biomass residues as raw material for dark hydrogen fermentation: a review. Int J Hydrog Energy 2015;0:3648–58.
- [38] Chong ML, Sabaratnam V, Shirai Y, Hassan MA. Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. Int J Hydrog Energy 2009;34:3277–87. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.02.010.
- [39] Lo YC, Chen XJ, Huang CY, Yuan YJ, Chang JS. Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen-producing bacteria. Int J Hydrog Energy 2013;38:15815–22. http://dx.doi. org/10.1016/j.ijhydene.2013.05.083.
- [40] Hallenbeck PC, Ghosh D. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? Trends Biotechnol 2009;27:287–97. http://dx.doi.org/10.1016/j. tibtech.2009.02.004.
- [41] Trchounian K, Sawers RG, Trchounian A. Improving biohydrogen productivity by microbial dark- and photo-fermentations: novel data and future approaches. Renew Sustain Energy Rev 2017;80:1201–16. http://dx.doi.org/10.1016/j.rser. 2017.05.149.
- [42] Habib MAB, Yusoff FM, Phang SM, Ang KJ, Mohamed S. Nutritional values of chironomid larvae grown in palm oil mill effluent and algal culture. Aquaculture 1997;158:95–105. http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00176-2.
- [43] Wong YM, Wu TY, Juan JC. A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. Renew Sustain Energy Rev 2014;34:471–82. http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.008.
- [44] Faloye FD, Gueguim Kana EB, Schmidt S. Optimization of biohydrogen inoculum development via a hybrid pH and microwave treatment technique - Semi pilot scale production assessment. Int J Hydrog Energy 2014;39:5607–16. http://dx.doi. org/10.1016/j.ijhydene.2014.01.163.
- [45] Hung CH, Chang YT, Chang YJ. Roles of microorganisms other than clostridium and enterobacter in anaerobic fermentative biohydrogen production systems - A review. Bioresour Technol 2011;102:8437–44. http://dx.doi.org/10.1016/j. biortech.2011.02.084.
- [46] Kapdan IK, Kargi F. Bio-hydrogen production from waste materials. Enzym Microb Technol 2006;38:569–82. http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.09.015.
- [47] De Sá LRV, Cammarota MC, De Oliveira TC, Oliveira EMM, Matos A, Ferreira-Leitão VS. Pentoses, hexoses and glycerin as substrates for biohydrogen production: an approach for Brazilian biofuel integration. Int J Hydrog Energy 2013;38:2986–97. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.12.103.
- [48] Sá LRV De, Cammarota MC, Ferreira-Leitão SV. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia – aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros (revisão). Quim Nova 2014;37:857–67. http://dx.doi. org/10.5935/0100-4042.20140138.
- [49] Garritano A do N, de Sá LRV, Aguieiras ÉCG, Freire DMG, Ferreira-Leitão VS. Efficient biohydrogen production via dark fermentation from hydrolized palm oil mill effluent by non-commercial enzyme preparation. Int J Hydrog Energy 2017;42:29166–74. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.10.025.
- [50] Bundhoo MAZ, Mohee R, Hassan MA. Effects of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: a review. J Environ Manag 2015;157:20–48.
- [51] De Sá LRV, De Oliveira TC, Dos Santos TF, Matos A, Cammarota MC, Oliveira EMM, et al. Hydrogenase activity monitoring in the fermentative hydrogen production using heat pretreated sludge: a useful approach to evaluate bacterial communities performance. Int J Hydrog Energy 2011;36:7543–9. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.03.119.
- [52] Sørensen J, Christensen D, Jørgensen BB. Volatile fatty acids and hydrogen as substrates for sulfate-reducing bacteria in anaerobic marine sediment. Appl Environ Microbiol 1981;42:5–11.
- [53] Dar SA, Kleerebezem R, Stams AJM, Kuenen JG, Muyzer G. Competition and coexistence of sulfate-reducing bacteria, acetogens and methanogens in a lab-scale anaerobic bioreactor as affected by changing substrate to sulfate ratio. Appl Microbiol Biotechnol 2008;78:1045–55. http://dx.doi.org/10.1007/s00253-008-1391-8.
- [54] Chong M, Rahim R, Shirai Y, Hassan M. Biohydrogen production by clostridium butyricum EB6 from palm oil mill effluent. Int J Hydrog Energy 2009;34:764–71. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.10.095.
- [55] Hiligsmann S, Masset J, Hamilton C, Beckers L, Thonart P. Comparative study of biological hydrogen production by pure strains and consortia of facultative and strict anaerobic bacteria. Bioresour Technol 2011;102:3810–8. http://dx.doi.org/

10.1016/j.biortech.2010.11.094.

- [56] Seppälä JJ, Puhakka JA, Yli-Harja O, Karp MT, Santala V. Fermentative hydrogen production by Clostridium butyricum and Escherichia coli in pure and cocultures. Int J Hydrog Energy 2011;36:10701–8. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene. 2011.05.189.
- [57] Mishra P, Roy S, Das D. Comparative evaluation of the hydrogen production by mixed consortium, synthetic co-culture and pure culture using distillery effluent. Bioresour Technol 2015;198:593–602. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech. 2015.09.074.
- [58] Singh L, Wahid Z a, Siddiqui MF, Ahmad A, Rahim MHA, Sakinah M. Biohydrogen production from palm oil mill effluent using immobilized Clostridium butyricum EB6 in polyethylene glycol. Process Biochem 2013;48:294–8. http://dx.doi.org/ 10.1016/j.procbio.2012.12.007.
- [59] Singh L, Wahid Z a, Siddiqui MF, Ahmad A, Rahim MHA, Sakinah M. Application of immobilized upflow anaerobic sludge blanket reactor using clostridium LS2 for enhanced biohydrogen production and treatment efficiency of palm oil mill effluent. Int J Hydrog Energy 2013;38:2221–9. http://dx.doi.org/10.1016/j. ijhydene.2012.12.004.
- [60] Ntaikou I, Antonopoulou G, Lyberatos G. Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: a review. Waste Biomass- Valoriz 2010;1:21–39. http://dx.doi.org/10.1007/s12649-009-9001-2.
- [61] Guo XM, Trably E, Latrille E, Carrre H, Steyer JP. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: a review. Int J Hydrog Energy 2010;35:10660–73. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.008.
- [62] O-Thong S, Prasertsan P, Intrasungkha N, Dhamwichukorn S, Birkeland NKå. Optimization of simultaneous thermophilic fermentative hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent by Thermoanaerobacterium-rich sludge. Int J Hydrog Energy 2008;33:1221–31. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene. 2007.12.017.
- [63] Hawkes FR, Dinsdale R, Hawkes DL, Hussy I. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. Int J Hydrog Energy 2002;27:1339–47. http://dx.doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00090-3.
- [64] Rasdi Z, Mumtaz T, Abdul Rahman N, Hassan MA. Kinetic analysis of biohydrogen production from anaerobically treated POME in bioreactor under optimized condition. Int J Hydrog Energy 2012;37:17724–30. http://dx.doi.org/10.1016/j. iihvdene.2012.08.095.
- [65] Leaño EP, Anceno AJ, Babel S. Ultrasonic pretreatment of palm oil mill effluent: impact on biohydrogen production, bioelectricity generation, and underlying microbial communities. Int J Hydrog Energy 2012;37:12241–9. http://dx.doi.org/ 10.1016/j.ijhydene.2012.06.007.
- [66] Mohammadi P, Ibrahim S, Mohamad Annuar MS, Law S. Effects of different pretreatment methods on anaerobic mixed microflora for hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent. J Clean Prod 2011;19:1654–8. http:// dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2011.05.009.
- [67] 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. Int J Hydrog Energy 2012;37:13806–14. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.03.151.
- [68] Mamimin C, Thongdumyu P, Hniman A, Prasertsan P, Imai T, O-Thong S. Simultaneous thermophilic hydrogen production and phenol removal from palm oil mill effluent by Thermoanaerobacterium-rich sludge. Int J Hydrog Energy 2012;37:15598–606. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.062.
- [69] Krishnan S, Singh L, Sakinah M, Thakur S, Wahid Z a, Alkasrawi M. Process enhancement of hydrogen and methane production from palm oil mill effluent using two-stage thermophilic and mesophilic fermentation. Int J Hydrog Energy 2016;41:12888–98. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.05.037.
- [70] Valladão ABG, Freire DMG, Cammarota MC. Enzymatic pre-hydrolysis applied to the anaerobic treatment of effluents from poultry slaughterhouses. Int Biodeterior Biodegrad 2007;60:219–25. http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.03.005.
- [71] Serri N a, Kamarudin aH, Abdul Rahaman SN. Preliminary studies for production of fatty acids from hydrolysis of cooking palm oil using C.rugosa lipase. J Phys Sci 2008;19:79–88.
- [72] Lin CN, Wu SY, Lee KS, Lin PJ, Lin CY, Chang JS. Integration of fermentative hydrogen process and fuel cell for on-line electricity generation. Int J Hydrog Energy 2007;32:802–8. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.09.047.
- [73] González Del Campo A, Fernández FJ, Cañizares P, Rodrigo MA, Pinar FJ, Lobato J. Energy recovery of biogas from juice wastewater through a short high temperature PEMFC stack. Int J Hydrog Energy 2014;39:6937–43. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.02.119.
- [74] Martínez VL, García RE, Curutchet G, Sanguinetti A, Fasoli HJ, Franco JI. Demonstration of the possibility to power a fuel cell with hydrogen derived from the fermentation of sugar. Int J Hydrog Energy 2012;37:14920–5. http://dx.doi. org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.168.
- [75] Haneda T, Ono Y, Ikegami T. Technological assessment of residential fuel cells using hydrogen supply systems for fuel cell vehicles. Int J Hydrog Energy 2017;2:1–7. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.08.152.
- [76] Lopes T, Paganin VA, Gonzalez ER. The effects of hydrogen sulfide on the polymer electrolyte membrane fuel cell anode catalyst : H 2 S – Pt / C interaction products. J Power Sources 2011;196:6256–63. http://dx.doi.org/10.1016/j.jpowsour.2011. 04.017.
- [77] Rahman SNA, Masdar MS, Rosli MI, Majlan EH, Husaini T. Overview of biohydrogen production technologies and application in fuel cell. Int J Hydrog Energy 2015;5:13–23. http://dx.doi.org/10.5923/c.chemistry.201501.03.
- [78] Bajracharya S, Yuliasni R, Vanbroekhoven K, Buisman CJN, Strik DPBTB, Pant D. Long-term operation of microbial electrosynthesis cell reducing CO₂ to multicarbon chemicals with a mixed culture avoiding methanogenesis.

Bioelectrochemistry 2017;113:26–34. http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem. 2016.09.001.

- [79] Cheng J, Xia A, Liu Y, Lin R, Zhou J, Cen K. Combination of dark- and photofermentation to improve hydrogen production from Arthrospira platensis wet biomass with ammonium removal by zeolite. Int J Hydrog Energy 2012;37:13330–7. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.06.071.
- [80] Saint-amans S, Girbal L, Andrade J, Ahrens K, Soucaille P. Regulation of carbon and electron flow in clostridium butyricum VPI 3266 grown on glucose-glycerol mixtures. J Bacteriol 2001;183:1748–54. http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.5. 1748.
- [81] Chaiprapat S, Laklam T. Enhancing digestion efficiency of POME in anaerobic sequencing batch reactor with ozonation pretreatment and cycle time reduction. Bioresour Technol 2011;102:4061–8. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010. 12.033.
- [82] Azhari NH, Abdurahmana NH. Effect of organic loading rate on the performance of ultrasonic-assisted membrane anaerobic system (UAMAS) in treating palm oil mill effluent (POME). J Am Sci 2013;9:325.
- [83] Najafpour GD, Zinatizadeh AAL, Mohamed AR, Hasnain Isa M, Nasrollahzadeh H. High-rate anaerobic digestion of palm oil mill effluent in an upflow anaerobic sludge-fixed film bioreactor. Process Biochem 2006;41:370–9. http://dx.doi.org/ 10.1016/j.procbio.2005.06.031.
- [84] Abdurahman NH, Rosli YM, Azhari NH, Tam SF. Biomethanation of palm oil mill effluent (POME) by membrane anaerobic system (MAS) using POME as a substrate. World Acad Sci Eng Technol 2011;51:419–24.
- [85] Faisal M, Unno H. Kinetic analysis of palm oil mill wastewater treatment by a modified anaerobic baffled reactor. Biochem Eng J 2001;9:25–31. http://dx.doi. org/10.1016/S1369-703X(01)00122-X.
- [86] Nurliyana MY, H PS, Rasmina H, Kalsom MSU, Chin KL, Lee SH, et al. Effect of C / N ratio in methane productivity and biodegradability during facultative co-digestion of palm oil mill effluent and empty fruit bunch. Ind Crop Prod 2015;76:409–15.
- [87] Chan YJ, Chong MF, Law CL. An integrated anaerobic-aerobic bioreactor (IAAB) for the treatment of palm oil mill effluent (POME): start-up and steady state performance. Process Biochem 2012;47:485–95. http://dx.doi.org/10.1016/j. procbio.2011.12.005.
- [88] Nualsri C, Reungsang A, Plangklang P. Biochemical hydrogen and methane potential of sugarcane syrup using a two-stage anaerobic fermentation process. Ind Crop Prod 2016;82:88–99. http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.002.
- [89] Cheng J, Lin R, Ding L, Song W, Li Y, Zhou J, et al. Fermentative hydrogen and methane cogeneration from cassava residues: effect of pretreatment on structural characterization and fermentation performance. Bioresour Technol 2015;179:407–13. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.050.
- [90] Nathoa C, Sirisukpoca U, Pisutpaisal N. Production of hydrogen and methane from banana peel by two phase anaerobic fermentation. Energy Procedia 2014;50:702–10. http://dx.doi.org/10.1016/j.egypro.2014.06.086.
- [91] Lin CY, Lay CH. Effects of carbonate and phosphate concentrations on hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. Int J Hydrog Energy 2004;29:275–81. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2003.07.002.
- [92] Ahmed Y, Yaakob Z, Akhtar P, Sopian K. Production of biogas and performance evaluation of existing treatment processes in palm oil mill effluent (POME). Renew Sustain Energy Rev 2015;42:1260–78. http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.10. 073.
- [93] Kyazze G, Dinsdale R, Guwy AJ, Hawkes FR, Premier GC, Hawkes DL. Performance characteristics of a two-stage dark fermentative system producing hydrogen and methane continuously. Biotechnol Bioeng 2007;97:759–70. http://dx.doi.org/10. 1002/bit.21297.
- [94] Lee DY, Ebie Y, Xu KQ, Li YY, Inamori Y. Continuous H2 and CH4 production from high-solid food waste in the two-stage thermophilic fermentation process with the recirculation of digester sludge. Bioresour Technol 2010;101:42–7. http://dx.doi. org/10.1016/j.biortech.2009.03.037.
- [95] Zhu H, Stadnyk A, Béland M, Seto P. Co-production of hydrogen and methane from potato waste using a two-stage anaerobic digestion process. Bioresour Technol 2008;99:5078–84. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.083.
- [96] Krishnan S, Singh L, Sakinah M, Thakur S, Wahid ZA, Alkasrawi M. Process enhancement of hydrogen and methane production from palm oil mill effluent using two-stage thermophilic and mesophilic fermentation. Int J Hydrog Energy 2016;41:12888–98. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.05.037.
- [97] Giordano A, Sarli V, Lavagnolo MC, Spagni A. Evaluation of aeration pretreatment to prepare and inoculum for the two-stage hydrogen and methane production process. Bioresour Technol. 2014;166:211–8. http://dx.doi.org/10.1016/j. biortech.2014.05.019.
- [98] Buitron G, Garcia-Prato D, Zhang A. Biohydrogen production from tequila vinasses using a fixed bed reactor. Water Sci. Technol. 2014;70:1919–25. http://dx.doi. org/10.2166/wst.2014.433.
- [99] Tao G, Yaakob Z, Sobri M. Biomass production and nutrients removal by a newlyisolated microalgal strain Chlamydomonas sp. in palm oil mill effluent (POME). Int J Hydrog Energy 2015. (ScienceDirect).
- [100] Sasongko NA, Noguchi R. Comprehensive evaluation of integrated energy plantation model of palm oil and microalgae based biofuel for sustainable energy production. Energy Procedia 2015;68:226–35. http://dx.doi.org/10.1016/j. egypro.2015.03.251.
- [101] Kaid N, Al-shorgani N, Hafez M, Isa M, Mohtar W, Yusoff W, et al. Isolation of a Clostridium acetobutylicum strain and characterization of its fermentation performance on agricultural wastes. Renew Energy 2016;86:459–65. http://dx.doi. org/10.1016/j.renene.2015.08.051.
- [102] Gurjar J, Sengupta B. Production of surfactin from rice mill polishing residue by

submerged fermentation using Bacillus subtilis MTCC 2423. Bioresour Technol 2015;189:243–9. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.013.

- [103] Huschner F, Grousseau E, Brigham CJ, Plassmeier J, Popovic M, Rha C, et al. Development of a feeding strategy for high cell and PHA density fed-batch fermentation of Ralstonia eutropha H16 from organic acids and their salts. Process Biochem 2015;50:165–72. http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.12.004.
- [104] Ma J, Ke S, Chen Y Biological hydrogen production by anaerobic fermentation from carbohydrate-containing waste. Retrosp Theses Diss 2006:Paper 1863. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.07.1532.
- [105] Bianchi L, Mannelli F, Viti C, Adessi A, De Philippis R. Hydrogen-producing purple non-sulfur bacteria isolated from the trophic lake Averno (Naples, Italy). Int J Hydrog Energy 2010;35:12216–23. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010. 08.038.
- [106] McKinlay JB, Harwood CS. Photobiological production of hydrogen gas as a biofuel. Curr Opin Biotechnol 2010;21:244–51. http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio. 2010.02.012.
- [107] Özgür E, Peksel B. Biohydrogen production from barley straw hydrolysate through sequential dark and photofermentation. J Clean Prod 2013;52:14–20. http://dx. doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.02.035.
- [108] Cheng J, Ding L, Xia A, Lin R, Li Y, Zhou J, et al. Hydrogen production using amino acids obtained by protein degradation in waste biomass by combined dark- and photo-fermentation. Bioresour Technol 2015;179:13–9. http://dx.doi.org/10.

1016/j.biortech.2014.11.109.

- [109] Zagrodnik R, Laniecki M. Bioresource Technology The role of pH control on biohydrogen production by single stage hybrid dark- and photo-fermentation. Bioresour Technol 2015;194:187–95.
- [110] André Cremonez P, Feroldi M, Cézar Nadaleti W, de Rossi E, Feiden A, de Camargo MP, et al. Biodiesel production in Brazil: current scenario and perspectives. Renew Sustain Energy Rev 2015;42:415–28. http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.10. 004.

Web References

- Index Mundi. [ONLINE; 2016. Available at <http://www.indexmundi.com/ commodities/?Commodity=palm-oil&months= 60> . [Acessed in 20 of June of 2016].
- IEO International Energy Outlook. [ONLINE; 2016. Available at http://www.eia.gov/ forecasts/ieo/pdf/0484(2016).pdf . [Acessed in 30 of August of 2016].
- Brazilian Senate A cadeia produtiva da palma de óleo no Estado do Pará: Uma avaliação crítica. [ONLINE] Available at http://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/ comissoes/comissoes-permanentes/capadr/audiencias-publicas/audienciaspublicas-2015/audiencia-publica-26-de-marco-de-2015-faepa).





Biocatalysis and Biotransformation

ISSN: 1024-2422 (Print) 1029-2446 (Online) Journal homepage: http://www.tandfonline.com/loi/ibab20

EDITORIAL – ENZITEC special edition 2016 industrial applications of enzymes in Brazil

Jürgen Andreaus, Marli Camassola, Mariana de Oliveira Faber & Viridiana Santana Ferreira-Leitão

To cite this article: Jürgen Andreaus, Marli Camassola, Mariana de Oliveira Faber & Viridiana Santana Ferreira-Leitão (2018): EDITORIAL - ENZITEC special edition 2016 industrial applications of enzymes in Brazil, Biocatalysis and Biotransformation, DOI: 10.1080/10242422.2018.1543282

To link to this article: https://doi.org/10.1080/10242422.2018.1543282



Published online: 17 Dec 2018.



Submit your article to this journal 🗹



則 🛛 View Crossmark data 🗹

EDITORIAL



Check for updates

EDITORIAL – ENZITEC special edition 2016 industrial applications of enzymes in Brazil

Sir,

The twenty-first century is a transition era between petroleum-based and bio-based products. The oil reserves depression and the environmental issues triggered the warning light for more sustainable industries and processes. Within this era of use of renewable resources and development of greener and more safety processes, biocatalysts emerged as a real alternative for several industrial sectors, formerly chemicals. Even though enzymatic processes are widely applied in the food and beverage industry, the discovery of recombinant DNA technology and protein sequencing and engineering allowed the raise of biocatalysts and the increase of enzyme technologies in industrial applications.

The global market of industrial enzymes is projected to reach USD 6.30 Billion by 2022 (MarketsandMarkets 2016). In 2017, Brazilian enzymes' imports reached USD 165 million, being 12% cellulases, enzymes related to two growing sectors in biocatalysis in Brazil, biofuels and specialty chemicals (Ministério da Indústria 2018).

Brazil is worldwide recognized as an important biofuel producer, being the second largest producer of both bioethanol and biodiesel. The main successful case example of enzyme application in biofuel production is the second-generation ethanol plant of Raízen, initiated in 2014 with installed capacity to produce 42 million litres of ethanol (Raizen 2018). Concerning biodiesel, the North American company Blue Sun Energy started a commercial facility for enzymatic biodiesel production in Brazil, applying lipases (Biodiesel 2018).

The company Olfar, with an annual production of 378 million litres of biodiesel, was the first company in Brazil to implement the enzymatic neutralization in a biodiesel plant (Olfar 2018).

In the specialty chemical sector, several companies are investing in Brazil in research and development of enzymatic processes, reflected by the increasing number of patent applications. Amyris has a patent application in enzymatic methods to produce muconic acid (Schweitzer et al. 2015) (112012016855); Braskem applied to various patents in methods to produce and use dehydratases (Koch et al. 2018) (112017025554), use of a modified ace-toacetyl-CoA hydrolase (Slovic et al. 2017) (112016006321), and enzymatic methods to convert alkenes (Prause et al. 2015) (102013029576). Oxiteno has applications to protect the use of an enzymatic pool of hydrolases and an enzymatic process to produce a mixture of esters (Da Silva et al. 2017) (102015030362).

The Brazilian scenario of enzymes and their applications in industry are growing, showing the relevance of researches and discussions about this subject. In this sense, since 1995, the Brazilian Seminar on Enzyme Technology (ENZITEC) has brought together competent researchers in the field successfully disseminating their high impact developments. The 12th edition of ENZITEC, held from July 17 to 20, 2016, in Caxias do Sul, joined under the conference topic "Challenges and innovations in enzymatic processes" 310 participants, being 38% University professors and researchers, 31% graduate students, 26% undergraduate students, and only 5% professionals from industry, demonstrating the need for greater interaction between the academic and business environment.

Some works of the 12th edition of ENZITEC were selected for this special issue:

- 1. Solid-state fermentation of co-products from palm oil processing: production of lipase and xylanase and effects on chemical composition (Oliveira et al. 2018)
- Mixture design of starchy substrates hydrolysis by an immobilized glucoamylase from Aspergillus brasiliensis (Almeida et al. 2018)
- 3. Biotransformation of (+)-carvone and (-)-carvone using human skin fungi: a green method of obtaining fragrances and flavours (dos Santos et al. 2018)
- 4. Production of recombinant β -galactosidase in bioreactors by fed-batch culture using DO-stat and linear control, authored by de Andrade et al. (2018)
- 5. Hydrolysis of crambe oil by enzymatic catalysis: an evaluation of the operational conditions (Tavares et al. 2018)
- 6. Discrimination between rival laccase inhibition models from data sets with one inhibitor concentration using a penalized likelihood analysis and Akaike weights (Pinto et al. 2018)

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

J.A., M.C., and V.S.F.L. would like to thank National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for their Research Grants.

ORCID

Viridiana Santana Ferreira-Leitão D http://orcid.org/0000-0002-6684-0323

References

- Almeida PZ, Messias JM, Pereira MG, Pinheiro VE, Monteiro LMO, Heinen PR, Cardoso GC, Jorge JA, de Moraes Polizeli MLT. 2018. Mixture design of starchy substrates hydrolysis by an immobilized glucoamylase from Aspergillus brasiliensis. Biocatal Biotransfor. 36:389–395. DOI:10.1080/10242422.2017.1423059
- Biodiesel. 2018. [accessed 2018 Sep 10]. https://www.biodieselbr. com/noticias/biocombustivel/negocio/blue-sun-inaugura-usinabiodiesel-rota-enzimatica-210114.htm.
- Da Silva ASA, Vargas F, Rosso GB, Vasconcelos JP, Gelves LGV, De Sá LRV, Milani P, Da Silva R, Ferreira-Leitão VS. 2017. Process for the production of esters and product thus obtained. Application No.: 1020h30362.
- de Andrade BC, Migliavacca, VF, Okano FY, Grafulin VY, Lunardi J, Roth G, de Souza CF; Santos DS, Chies JM, Renard G, Volpato G. 2018. Production of recombinant β -galactosidase in bioreactors by fed batch culture using DO-stat and linear control. Biocatal Biotransfor. DOI:10.1080/10242422.2018.1493105
- dos Santos RAM, de Oliveira Souza F, Pilau EJ, Porto C, Gonçalves JE, de Oliveira AJB, Gonçalves RAC. 2018. Biotransformation of (+)-carvone and (-)-carvone using human skin fungi: a green method of obtaining fragrances and flavors. Biocatal Biotransfor. 36:396–400. DOI:10.1080/10242422.2017.1376049
- Koch DJ, Nagarajan H, Gouvea IE, Parizzi LP, Lopes MSG, Haselbeck RJ, Culler SJ. 2018. Nucleic acid, expression cassette, vector or cloning vehicle, transformed or transduced cell, transgenic plant, plant cell or seed, polypeptide, composition, antibody, hybridoma, method for isolating or identifying a polypeptide, producing a recombinant polypeptide, producing a compound, producing or making a butadiene, a dialkene or a compound, producing a polymer, resin or article of manufacture, enzymatically catalyzing the conversion of a crotyl alcohol to a 3-buten-2ol, enzymatically catalyzing the conversion of a 3-buten-2-ol to a butadiene, enzymatically catalyzing the conversion of a crotyl alcohol to a butadiene, peptide or polypeptide, and use of or a method for using a polypeptide. Application No.: 112017025554.
- MarketsandMarkets. 2016. Industrial Enzymes Market by Type (Amylases, Cellulases, Proteases, Lipases, and Phytases), Application (Food & Beverages, Cleaning Agents, and Animal Feed), Source (Microorganism, Plant, and Animal), and Region -Global Forecast to 2022. [accessed 2018 Aug 30]. https://www. marketsandmarkets.com/Market-Reports/industrial-enzymesmarket-237327836.html..
- Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços. 2018. COMEXSTAT – Foreign trade statistics. [accessed 2018 Aug 31]. http://comexstat.mdic.gov.br.

Olfar. 2018. [accessed 2018 Sep 10]. http://olfar.ind.br/pt/estrutura.

- Prause AR, Guimarães GA, Perez JR. 2015. Enzymatic method for conversion of alkenes, enzyme, DNA, DNA vector and microorganism that comprise the gene sequence that encodes such enzyme, resulting alkene and their uses. Application No.: 102013029576.
- Oliveira AC, Amorim GM, Azevêdo JAG, Godoy MG, Freire DMG. 2018. Solid-state fermentation of co-products from palm oil processing: production of lipase and xylanase and effects on chemical composition. Biocatal Biotransfor. 36:381–388. DOI:10.1080/ 10242422.2018.1425400
- Pinto PA, Bezerra RMF, Dias AA. 2018. Discrimination between rival laccase inhibition models from data sets with one inhibitor concentration using a penalized likelihood analysis and Akaike weights. Biocatal Biotransfor. 36:401–407. DOI:10.1080/102424.2018.1425401

Raizen. 2018. [accessed 2018 Sep 10]. https://www.raizen.com.br/.

- Schweitzer D, Macrae D, Lau MK, Bui V. 2015. Methods for producing isomers of muconic acid and salts of muconate. Application No.: 112012016855.
- Slovic AM, Koch DJ, Galzerani F, Gouvea IE. 2017. Engineered enzyme having acetoacetyl-CoA hydrolase activity, micro-organisms comprising the same, and methods of using the same. Application No.: 112016006321.
- Tavares F, Da Silva EA, Pinzan F, Canevesi RS, Milinsk MC, Scheufele FB, Borba CE. 2018. Hydrolysis of crambe oil by enzymatic catalysis: an evaluation of the operational conditions. Biocatal Biotransfor. 36:422–435. DOI:10.1080/10242422.2018.143 86

Jürgen Andreaus

Department of Chemistry, Universidade Regional de Blumenau, 89030-903 Blumenau, SC, Brazil

jandr@furb.br

Marli Camassola

Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia Laboratório de Enzimas e Biomassa, Caxias do Sul, Brazil com mcamassola@gmail.com

Mariana de Oliveira Faber

Catalysis Division, Biocatalysis Laboratory, National Institute of Technology, Ministry of Science, Technology and Innovation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; Department of Biochemistry, Chemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

🔊 mariana.faber@int.gov.br

Viridiana Santana Ferreira-Leitão 🝺

Catalysis Division, Biocatalysis Laboratory, National Institute of Technology, Ministry of Science, Technology and Innovation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; Department of Biochemistry, Chemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil viridiana.leitao@int.gov.br

Received 24 September 2018; accepted 15 October 2018

Renewable Energy 146 (2020) 2408-2415

Contents lists available at ScienceDirect

Renewable Energy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/renene

Biohydrogen production using xylose or xylooligosaccharides derived from sugarcane bagasse obtained by hydrothermal and acid pretreatments

Lívian Ribeiro Vasconcelos de Sá^{a, b}, Mariana de Oliveira Faber^{a, b}, Ayla Sant'Ana da Silva^{a, b}, Magali Christe Cammarota^c, Viridiana Santana Ferreira-Leitão^{a, b, *}

^a National Institute of Technology, Ministry of Science, Technology, Innovation and Communication, Catalysis Division, Biocatalysis Laboratory, CEP 20081-312, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Federal University of Rio de Janeiro, Department of Biochemistry, CEP 21941-909, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Federal University of Rio de Janeiro, Department of Biochemical Engineering, CEP 21941-909, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history: Received 29 May 2018 Received in revised form 15 August 2019 Accepted 17 August 2019 Available online 19 August 2019

Keywords: Biohydrogen Dark fermentation 2G ethanol Hemicellulose fraction Xylose Xylooligosaccharides

ABSTRACT

The employment of hemicellulose fractions from bagasse acid (HF-AC - rich in xylose) and hydrothermal (HF-HT - containing high amounts of xylooligosaccharides) pretreatments led to yields of 265 and 177 $mL_{H2}/g_{carbohydrate}$ after 18 and 45 h of fermentation, respectively. The anaerobic sludge used as inoculum was able to hydrolyze the xylooligosaccharides of HF-HT into simpler sugars, enabling microbial hydrogen production. The acid hydrolysis of xylooligosaccharides in HF-HT before fermentation improved the productivity by 30% and showed similar yield (231 $mL_{H2}/g_{carbohydrate}$). The adaptive phase for HF-HT consumption was influenced by the hydrolytic step and by inhibitors, as the kinetics of hydrolyzed HF-HT was deeply affected in the first 18 h compared to HF-AC. Higher amounts of HF-AC in the media promoted fermentation inhibition, which could be related to the increased concentrations of acetic acid and carbohydrates, two factors that enhance the system osmolarity.

© 2019 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

The conventional process of sugar and ethanol production from sugarcane (first generation ethanol) generates lignocellulosic residues, such as bagasse and straw. In Brazil, considering an estimated production of 646 million tons of sugarcane in the 2017/18 harvest [1], approximately 168 million tons of bagasse and straw were generated [2,3]. These lignocellulosic materials can be used as feedstock for cellulosic ethanol production, also known as second generation ethanol (2G ethanol). The production of 2G ethanol involves several steps, including biomass conditioning, pretreatment, enzymatic hydrolysis, fermentation and distillation [4].

Pretreatment is one of the key steps of this process and methods based on the hydrolysis and solubilization of hemicellulose, such as dilute acid and hydrothermal pretreatment, are amongst the most studied pretreatment techniques; both acid and hydrothermal pretreatments aim at solubilizing the hemicellulose content [5–8]. The acid pretreatment of bagasse is usually carried out with dilute sulfuric acid (1–5% w/v) at temperatures ranging from 120 to 180 °C and pressures up to 1.01 MPa, with a hemicellulose removal efficiency of ~90% releasing monomeric carbohydrates, mainly xylose [9]. On the other hand, hydrothermal pretreatment is based on the use of superheated water (160–240 °C) without the use of chemical agents or catalysts, resulting mainly in the release of carbohydrates in the form of xylooligosaccharides [5,6,10].

In the 2G ethanol production process, the cellulosic fraction is enzymatically hydrolyzed into glucose, which is fermented by *Sacharomyces cerevisiae*, the commonly used microorganism for ethanol production. However, the xylose-rich stream derived from hydrothermal and acid pretreatments cannot be used as substrate





^{*} Corresponding author. National Institute of Technology, Ministry of Science, Technology, Innovation and Communication, Biocatalysis Laboratory, Av. Venezuela, 82, Lab 302, CEP 20081-312, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

E-mail addresses: livian_sa@yahoo.com.br (L.R.V. de Sá), marianafaber@outlook. com (M.O. Faber), ayla.santana@int.gov.br (A.S. da Silva), christe@eq.ufrj.br (M.C. Cammarota), viridiana.leitao@int.gov.br (V.S. Ferreira-Leitão).

by non-genetically modified *Saccharomyces cerevisiae*, requiring genetically engineered yeast or the development of ethanol production processes using other xylose-fermenting microorganisms [11]. This makes the hemicellulose fraction less attractive for this purpose. Within the biorefinery concept, this fraction rich in hemicellulose derived sugars may be used as feedstock for other purposes, such as dark fermentation aiming at H₂ production in an integrated process for the 2G ethanol productive chain [12]. The interest in hydrogen as biofuel has increased in the last decades, due to its high energy density and low emission of air pollutants and greenhouse gases [13]. Hydrogen could also be applied in heating, transport and power industries [14].

Currently, 95% of the hydrogen produced around the Globe has natural gas, methane or coal as raw material, which contribute to global warming [15]. In this scenario, it is important to study low carbon processes to obtain H₂, such as by biological processes using waste materials as feedstock. Hydrogen generation from biomass conversion occurs at the absence of oxygen in a process called dark fermentation, where biomass is broken down by microorganisms that metabolize the substrates released into H₂ and other byproducts, such as organic acids.

Dark fermentation for H_2 production can be performed employing either pure or mixed microbial cultures as inocula [12,16–19]. Generally, it is assumed that the use of mixed microbial communities, such as anaerobic sludge, present advantages over pure cultures in processes using biomass derived feedstock, due to their ability to tolerate and metabolize certain amounts of compounds that can act as microbial inhibitors, such as 2-furaldehyde (furfural), 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (HMF) and acetic acid [20]. Additionally, anaerobic sludge contains both hydrolytic and acidogenic bacteria [21], making it more suitable for hydrogen production from hemicellulose fraction from hydrothermal pretreatment, which has high amounts of oligosaccharides that requires an efficient hydrolysis step to enable H_2 production.

It has been shown that the increase in oligomeric ratio in hemicellulose fractions led to a longer adaptive phase and lower H_2 production rate [22]. However, few studies have evaluated hemicellulose fractions containing oligosaccharides as feedstock for dark fermentation, and systematic comparison of its effect in regard to the use of monosaccharides-rich streams is also rare. Therefore, it is crucial to investigate the dark fermentation process applying real hemicellulose fractions containing monosaccharides and oligosaccharides, to understand the factors that could affect this process.

The aim of this study was to evaluate the H_2 production using standard xylose and hemicellulose fractions from acid and hydrothermal pretreatments of sugarcane bagasse under comparative conditions to identify the effect of the hydrolysis step and its role in the kinetics of H_2 production. In addition, increased amounts of hemicellulose fraction, containing both sugars and inhibitors, were added to the fermentation media to assess the effect of sugar concentration and microbial inhibitors on the H_2 production.

2. Materials and methods

2.1. Inoculum

The anaerobic sludge used as inoculum in this work was obtained from a municipal sewage treatment plant located in Rio de Janeiro, Brazil. The concentration of volatile suspended solids (VSS) in the anaerobic sludge was approximately 27,000 mg VSS/L. In order to drastically reduce the H₂-consuming microorganisms and to select the spore forming and H₂-producing microorganisms, the inoculum was acid pretreated for 60 min by adding HCl 10 mol/L until reaching pH 2.0 [12]. In this study, a detailed characterization of microbial community presented in the sludge was not performed. However, in our previous study, the presence of species of genus *Clostridium* was confirmed in an anaerobic sludge obtained from the same source as used in this study [12].

2.2. Pretreatment of lignocellulosic biomass

Sugarcane bagasse, provided by the Brazilian company Dedini S/ A Indústrias de Base was subjected to dilute acid and hydrothermal pretreatments. The chemical composition of the untreated bagasse was: $39.99 \pm 3.50\%$ of cellulose, $21.82 \pm 4.43\%$ of hemicellulose, $26.51 \pm 1.45\%$ of lignin, $1.40 \pm 0.04\%$ of ashes and $7.41 \pm 0.71\%$ of extractives. The determination of the carbohydrate, lignin, extractives and ashes content was done as previously reported [23].

Dilute acid pretreatment of sugarcane bagasse was conducted in an autoclave at 130 °C for 30 min, under autogenous pressure of approximately 0.2 MPa, using 1.6% (v/v) H_2SO_4 with a solid:liquid ratio of 1:4 (w/v) [6]. After acid pretreatment, solid and liquid fractions were separated by filtration using a glass fiber membrane and analyzed for its carbohydrate contents according to a standard protocol [24]. Then, the liquid fraction was neutralized with 5 mol/L NaOH to pH 5.0 and subsequently used as raw material for the H_2 production.

Hydrothermal pretreatment was performed in a 1 L reactor (Parr 4842, Parr Instrument Company) at 170 °C for 40 min using a solid:liquid ratio of 1:10 (w/v). Nitrogen gas was introduced into the reactor at an initial pressure of approximately 2.03 MPa, to keep the inert atmosphere. At the end of the process, the solid and liquid fractions were separated by filtration using a glass fiber membrane [25]. The liquid fraction was analyzed for its carbohydrate contents for subsequent use as a substrate in the H₂ production. The total carbohydrate was estimated by post-hydrolysis of the hemicellulose fraction with H₂SO₄ 2.4% (v/v) at 121 °C for 1 h to convert the oligosaccharides in free monosaccharides. Carbohydrates, organic acids, furfural and HMF generated in this process were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). The difference between monomer amounts in hydrolyzed and non-hydrolyzed fractions was used to calculate the amount of oligomers [24].

2.3. Culture medium for the H₂ production

Hemicellulose fractions from the acid and hydrothermal pretreatments of sugarcane bagasse were used to produce H_2 in a comparative study with standard xylose.

Batch experiments were performed in 100 mL glass flasks sealed with rubber lids to avoid contact with air. The culture medium was composed of 38.6 mL of solution containing 20 mmol/L standard xylose or hemicellulose fraction at a concentration of 20 mmol/L of carbohydrate, 1.4 mL of nutrient solution and 50 mL of acid pre-treated anaerobic sludge, which was the amount of inoculum necessary to reach a final VSS of 10,000 mg/L and an appropriate ratio of gVSS/gxylose [26]. The nutrient solution was composed of (g/L) KH₂PO₄ (2.5), K₂HPO₄ (2.5) and NH₄Cl (19.8).

Different initial concentrations of carbohydrate in the fermentative medium were used to evaluate the H_2 production by increasing substrate concentration using dilute acid pretreatment of the hemicellulose fraction from sugarcane bagasse. In these cases, the culture medium was composed of 50 mL of acid pretreated anaerobic sludge (VSS 10,000 mg/L), 38.6 mL of hemicellulose fraction at a concentration of 20, 60 or 160 mmol/L of carbohydrate and 1.4 mL of nutrient solution.

All the fermentation media and solutions prepared from hemicellulose fractions were adjusted to pH 6.5 with 5 mol/L NaOH. The vials were purged with N₂ for 60 s to ensure an anaerobic environment and incubated in a shaker at 35 °C and 150 rpm. All experiments were performed in triplicate.

2.4. Analytical methods

Samples collected from the fermentative media were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC Shimadzu LC 10 AT) to determine xylose, glucose, cellobiose, arabinose, acetic and butyric acids, HMF and furfural. The liquid samples were centrifuged at $1775 \times g$ for 5 min and the supernatants obtained were filtered through a 0.22 µm Millipore filter. The analytes were determined using an Aminex HPX-87H column (BioRad) and a carbohydrate deashing guard cartridge (BioRad). The column temperature was 55 °C and the mobile phase was H₂SO₄ 5 mmol/L with a flow rate of 1.0 mL/min. Xylose, glucose, cellobiose and arabinose were analyzed using a refractive index detector (RI). Acids, HMF and furfural were analyzed by UV–Vis detection at 210 nm [27].

Biogas analyses were performed on a Micro GC (Agilent Technologies 3000A) with thermal conductivity detector (TCD) to determine H₂ and CH₄. GC analyses were performed using HP-PLOT U ($3 \text{ m} \times 0.32 \text{ mm} \times 30 \mu \text{m}$) and HP-PLOT Molecular sieve 5A ($10 \text{ m} \times 0.32 \text{ mm} \times 12 \mu \text{m}$) columns at 60 and 100 °C, respectively. The injector temperature was set at 90 °C and the sample inlet temperature was 110 °C. Helium and nitrogen were used as the carrier gases for the HP-PLOT U and HP-PLOT molecular sieve 5A columns, respectively.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of hemicellulose fractions of sugarcane bagasse obtained from acid or hydrothermal pretreatment

Promising results have been reported in the literature with the use of hemicellulose fractions from pretreatment of lignocellulosic biomass for H_2 production via dark fermentation [16,19,28–30]. However, in addition to carbohydrates, these fractions may also contain compounds that act as potential inhibitors for bacterial growth and metabolism, such as acetic acid, HMF and furfural [28,31].

Table 1 shows the characterization of hemicellulose fractions from hydrothermal and acid pretreatments used for the H_2 production, hereafter called HF-HT and HF-AC, respectively. The concentrations of compounds in the HF-HT are shown before and after an acid hydrolysis process. This convention has been adopted because the hydrothermal pretreatment releases a liquid fraction containing monosaccharides and oligosaccharides, while the acid

Table 1

Composition of the hemicellulose fraction of sugarcane bagasse obtained from dilute acid (HF-AC) and hydrothermal (HF-HT) pretreatments.

Compound	HF-AC ^a (mmol/L)	HF-HT ^b (mmol/L)			
		before acid hydrolysis	after acid hydrolysis		
Cellobiose	nd	2.02 ± 0.02	0.17 ± 0.01		
Glucose	25.82 ± 1.21	0.44 ± 0.00	3.56 ± 0.14		
Xylose	162.63 ± 1.07	$32.53 \pm 0.01^{\circ}$	80.13 ± 0.11		
Arabinose	8.12 ± 0.07	4.73 ± 0.01	5.40 ± 0.03		
Acetic acid	95.16 ± 0.08	24.33 ± 0.02	51.00 ± 0.06		
HMF ^d	<0.08	0.71 ± 0.00	0.56 ± 0.00		
Furfural	5.72 ± 0.01	9.17 ± 0.01	10.21 ± 0.05		

^a Hemicellulose fraction of sugarcane bagasse obtained from dilute acid pretreatment.

^b Hemicellulose fraction of sugarcane bagasse obtained from hydrothermal pretreatment.

^c Concentration of only free xylose. Xylooligomers were equal to 41.88 mmol/L.

^d HMF = 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde. nd: not detected. The values represent the mean and standard deviation of the analysis of three samples from each liquid fraction.

pretreatment hydrolyzes the hemicellulose fraction directly to monosaccharides [5,6,10]. Although xylose concentrations were different when comparing HF-AC and HF-HT, due to the difference in solid:liquid ratio used in each methodology, both pretreatments resulted in similar xylose recovered, equivalent to 9.8 g and 12.0 g xylose produced per 100 g of treated bagasse, for acid and hydro-thermal treatment, respectively.

Xylose is the major hydrolysis product obtained after pretreatment (Table 1), as sugarcane bagasse contains a xylan-rich hemicellulose, representing ~85% of the total hemicellulose content [32,33]. In addition to xylose, the liquid fractions also had small concentrations of arabinose, which is reported as the second most abundant sugar in sugarcane hemicellulose, and glucose, which can be either derived from hemicellulose structure or by minor degradation of the cellulosic fraction. The presence of cellobiose, a disaccharide of glucose, was also observed in the HF-HT, probably derived from the partial hydrolysis of cellulose. Most of the xylose present in the HF-HT is in the form of oligomers, about 60% (Table 1). Thus, to effectively metabolize this fraction for the H₂ production, the fermentative bacteria need to perform a hydrolysis step by producing hemicellulose degrading enzymes.

Furthermore, the second largest constituent in the hemicellulose fractions was acetic acid, as the hemicellulose fraction of sugarcane biomass is acetylated at a xylose to acetyl group ratio of approximately 8.8:1 [32]. Acetic acid is mentioned in the literature as a potential inhibitor of microbial metabolism and has been reported as an inhibitor of H₂ production [34,35]. Acetic acid and arabinose concentrations increased after the acid hydrolysis of HF-HT, which indicates that the xylooligomers contain ramifications of those components.

Additionally, both HF-HT and HF-AC contained HMF and furfural, due to the dehydration of hexoses and pentoses, respectively [36]. The influence of HMF and furfural, which can inhibit the cell growth and the activity of numerous enzymes in the glycolytic pathway, has not been extensively evaluated in the fermentative system for H₂ production [37,38].

3.2. H₂ production from hemicellulose fractions

3.2.1. Kinetic study of H_2 production comparing acid and hydrothermal hemicellulose fractions with xylose standard

The biological production of hydrogen using carbohydrates as substrate is characterized as an acetic-butyric-type fermentation. These carbohydrates enter the glycolytic pathway, forming acetic and butyric acids along with H₂ and CO₂. This biological process may be summarized by the following equations:

Pentoses: $C_5H_{10}O_5 + 1.67 H_2O \rightarrow$	$1.67 \text{ CH}_3\text{COOH} + 3.33 \text{ H}_2 + 1.67$
CO ₂	(1

$$C_5H_{10}O_5 \rightarrow 0.83 \text{ CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + 1.67 \text{ H}_2 + 1.67 \text{ CO}_2$$
(2)

Hexoses:
$$C_6H_{12}O_6 + 2 H_2O \rightarrow 2 CH_3COOH + 4H_2 + 2 CO_2$$
 (3)

$$C_6H_{12}O_6 + 2 H_2O \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2H_2 + 2 CO_2$$
 (4)

Fig. 1 shows H_2 production kinetics (Fig. 1A), substrate consumption (Fig. 1B) and production of acetic (Fig. 1C) and butyric (Fig. 1D) acids from HF-AC and HF-HT. It is important to highlight that no methane amounts were observed during fermentation process, evidencing a satisfactory pretreatment of anaerobic sludge used as inoculum. Media containing standard xylose were used for comparison, resulting in a reference value of H_2 production from pure xylose at the evaluated experimental conditions. Similar profiles were observed for H_2 yield in media containing either



Fig. 1. Kinetic profiles of H_2 yield (A), substrate consumption (B) and production of acetic (C) and butyric (D) acids from HF-AC (\bullet), HF-HT (\triangle) and medium containing standard xylose (\blacksquare). HF-AC and HF-HT stand for hemicellulose fraction obtained from dilute acid and hydrothermal pretreatments of sugarcane bagasse, respectively.

standard xylose or HF-AC during the first 24 h, obtaining maximum H₂ production yields correspondent to 275 and 265 mL_{H2}/g_{carbohy-drate}, respectively, after 18 h of fermentation (Fig. 1A). After this period, H₂ yield decreased approximately 30% in the HF-AC medium when compared to the yield obtained with standard xylose medium. Comparatively, the fermentation of HF-HT presented slower kinetics, showing a significant increase in H₂ yield between 12 and 24 h. After this period, the H₂ yield continued to increase at a slower rate, reaching the maximum yield, 228 mL_{H2}/g_{carbohydrate}, after 45 h of fermentation.

As discussed, HF-HT contains both monosaccharides and oligosaccharides. Therefore, Fig. 1B charts an increase in monomers (a sum of xylose, glucose and arabinose) concentration in the first 8 h of process, suggesting the effective hydrolysis of oligosaccharides into monosaccharides. The requirement of this hydrolysis step might be related to the slower H₂ production. On the other hand, HF-AC contains free monosaccharides in its composition; thus, its fermentation profile was similar to those obtained in the medium containing standard xylose as substrate. The evaluation of the activity of hydrolytic enzymes was not performed in this work, however, we hypothesize that enzymes are being produced by the microbial consortia, as the presence of hemicellulose degrading enzymes is required for the effective fermentation of HF-HT, with endoxylanases and β-xylosidase being responsible for depolymerization of xylooligosaccharides to xylose and arabinofuranosidases and acetyl xylan esterases for the removal of arabinofuranosyl and acetyl residues, respectively [39]. Previous studies have demonstrated the presence of microorganisms of the genus Clostridium in the fermentative medium for H₂ production using the same source of anaerobic sludge and inoculum treatment [12,40]. Possibly, these microorganisms could be the major actors in the hydrolysis of xylooligosaccharides, as Clostridium genus is known for its multienzyme complexes of high molecular weight called cellulosomes [41]. In addition to the enzymes associated with the cellulosome, microorganisms of the genus Clostridium are also able to produce extracellular xylanases, thereby increasing their potential to degrade xylooligosaccharides [42]. Furthermore, the experimental conditions used in this study (pH 6.5 and temperature 35 °C) are within the range observed for stability of the xylanases from Clostridium genus microorganisms (pH 5 to 8 and temperature from 30

to 50 °C) [43]. However, the action of other microorganisms in this process cannot be excluded, as the inoculum is a mixed culture.

During the fermentative process, the H₂ production was accompanied by the production of acetic (Fig. 1C) and butyric (Fig. 1D) acids, characterizing a butyrate fermentation type. An increase in production of both acids was observed in the first 24 h of fermentation in all media tested. After this period, the production of acids remained almost constant, except for an increased acetic acid production in the medium containing the HF-AC and an increased butyric acid production in the medium containing standard xylose. This significant increase in the production of acetic acid in the medium containing the HF-AC after 24h might be related to the reduction of H₂ observed in this medium (Fig. 1A), since homoacetogenic bacteria found in fermentative environments are able to convert H₂ and CO₂ into acetic acid [44]. It has been reported that homoacetogenic bacteria are not inhibited during the acid pretreatment of the inoculum and, therefore, can be reactivated in new reaction conditions [45-47]. The increase in the concentration of butyric acid observed in standard xylose medium might be related to the deviation of the metabolism to maintain the redox balance of the cell when subjected to high concentrations of H₂ [48,49].

The inhibitory concentrations of HMF and furfural are specific to each type of microorganism; however, it is generally recognized that concentrations of about 1 g/L, corresponding to 8 mmol/L HMF and 10 mmol/L furfural, can introduce a significant impact in microbial growth [31]. HMF concentration in the media containing HF-AC was under the detectable limit, while in the media with HF-HT, it was lower than 0.05 mmol/L during the fermentative process (Supplementary Table 1). The concentrations of furfural in the media containing HF-AC or HF-HT were also low equal to 0.02 mmol/L and 0.87 mmol/L, respectively. Furfural was not detected at the end of fermentations and the action of microorganisms may have converted it into other compounds. The conversion of furfural by microorganisms typically present in anaerobic sludge has been reported, which proves that Clostridium genus microorganisms are able to convert furfural into furfuryl alcohol during their growth phase [50] and that sulphate-reducing bacteria can promote the conversion of furfural to acetic acid [51].

3.2.2. H₂ production using hydrolyzed hydrothermal fraction

Although the concentrations of inhibitory compounds were low in both media, it is worth noting that HF-HT media contained 40 times more furfural than HF-AC media. Therefore, to investigate if the slower fermentation kinetics of HF-HT media were related only to the oligosaccharides hydrolysis or could also be affected by the presence of other compounds, HF-HT was subject to a diluted H₂SO₄ hydrolysis process to hydrolyze the xylooligosaccharides, which were subsequently used for the fermentation process. Fig. 2 compares the H₂ yield and carbohydrate consumption in media containing HF-AC, HF-HT and hydrolyzed HF-HT. Fig. 2A and B show that the hydrolyzed HF-HT results in a maximum H₂ yield of 231 $mL_{H2}/g_{carbohydrate}$ at 24 h, similar to the yield (228 $mL_{H2}/g_{carbohy-}$ drate) obtained using HF-HT after 45 h of fermentation. These faster kinetics improved the productivity by 30%, comparing hydrolyzed HF-HT (9.6 mL_{H2}/(g_{carbohydrate}.h)) with HF-HT (7.4 mL_{H2}/(g_{carbohy-} drate.h)). Additionally, differences in H₂ production profile in hydrolyzed HF-HT and HF-AC could be observed. While the H₂ yield in hydrolyzed HF-HT media was 20 mL_{H2}/g_{carbohydrate} at 12 h fermentation, the use of HF-AC as fermentation substrate resulted in 189 mL_{H2}/g_{carbohydrate} for the same fermentation time. This difference, however, was less prominent at 24 h, with yields corresponding to 231 and 265 mL_{H2}/g_{carbohydrate}, for fermentations with hydrolyzed HF-HT and HF-AC, respectively.

These results are evidence that the slower production of H_2 in

media containing HF-HT is not just related to the presence of sugars in oligomeric form. Furfural, HMF and other unidentified phenolic compounds generated during the hydrothermal pretreatment may affect the metabolism of the cells and contribute to the slower production. Sigueira and Reginatto (2015) [52] showed that 5.2 and 10.4 mmol/L of furfural could inhibit H_2 production by 35 and 57%, respectively: in addition, these concentrations delayed the lag phase by 58 and 213%. respectively. Other studies have related the presence of furfural to both inhibition on H₂ production and increased lag phase [31]. Even though the concentration of those compounds are low compared to the reference values for toxicity, as discussed above, the combination of several inhibitors can result in a potentialized effect [37]. It is important to emphasize that the concentration of inhibitory compounds that could be affecting the fermentation kinetics can be modulated by the selection of different pretreatment parameters.

Table 2 summarizes results reported in the literature related to H_2 production using hemicellulose fractions obtained from acid and hydrothermal pretreatments of different types of biomass compared to the present study. As depicted in Table 2, only a few articles report the use of hemicellulose fraction from hydrothermally pretreated biomasses. Among these, only Nasr et al. (2014) [22] discussed the influence of oligosaccharides on the hydrogen production, also reporting the consumption of these sugars throughout the fermentative process. In the present work, the hydrolytic stage for the conversion of oligosaccharides into simple sugars was evidenced. The presence of oligosaccharides also had a greater influence on H_2 productivity than on H_2 yield, due to the longer adaptive phase (hydrolysis + adaptive processes) observed in the HF-HT fermentative process.

The H_2 yield obtained using HF-HT as raw material was promising, generating an elevated amount of H_2 , compared to other studies. This result encourages studies to exploit hemicellulose fraction as raw material for dark fermentation process. This is the first report to compare the kinetic profiles of these two real hemicellulose fractions for hydrogen production.

3.3. Evaluation of H₂ production by increasing substrate concentration from hemicellulose fractions

The high H₂ yields obtained in this work, using HF-AC and HF-HT from sugarcane bagasse, are directly related to the initial carbohydrate concentration in the fermentative media (~9 mmol/L). However, it is extremely important to verify the H₂ production at increased concentrations of substrate, as this is directly related to the generation of higher amounts of product and to the reduction of water demand in industrial processes [58,59].

To evaluate this, increased amounts of HF-AC were used as raw material for fermentation. The increase in concentration of carbohydrates using HF-AC as raw material resulted in a decrease in sugars consumption and H₂ yield (Table 3); sugar consumption decreased by 38% in the medium with higher substrate concentration, which possibly relates to several factors, such as the inhibition caused by the increased concentration of organic acids, higher substrate concentration, osmolarity of fermentative medium, or even the presence of HMF and furfural in the fermentative medium [34,35]. It is known that increments in acetic and butyric acid concentrations can cause changes in cellular metabolism, thereby causing a decrease in H₂ production [34]. These acids, in their undissociated form and low pH, are able to cross the cell membrane and to dissociate into the cell, thus reducing intracellular pH [60–62]. According to Siqueira and Reginatto (2015) [52], an acetic acid concentration of 11.8 mmol/L could inhibit H₂ production by 50%. Therefore, the initial concentration of acetic acid (10.30 mmol/L) in the medium containing HF-AC with 27 mmol/L of



Fig. 2. Kinetic profiles of H_2 yield (A) and substrate consumption (B) from HF-HT (\triangle), hydrolyzed HF-HT (\triangle) and HF-AC (\bullet). HF-AC and HF-HT stand for hemicellulose fraction obtained from dilute acid and hydrothermal pretreatments of sugarcane bagasse, respectively.

Table 2

Comparative study on H₂ production using hemicellulose fractions obtained from acid and hydrothermal pretreatments of different types of biomass.

Biomass	Biomass pretreatment	Inoculum	Initial carbohydrates concentration	Yield (mL _{H2} /g _{carbohydrate})	Productivity (mL _{H2} /g _{carbohydrate} .h))	Reference
Wheat straw	Hydrothermal	Thermophilic mixed culture	5.0 mmol/L	318.40	9.80	[54]
Sugarcane bagasse	Hydrothermal	Anaerobic sludge:cow dung 1:1 (w/w)	4.18 mmol/L	689.59	6.53	[53]
Sugarcane bagasse	Hydrothermal (hydrothermal + oligomers hydrolysis)	Anaerobic sludge	9 mmol/L	177.30 (231.40)	7.39 (9.64)	This work
Sugarcane bagasse	Dilute acid	C. butyricum TISTR 1032	20 g COD/L ^a	136.9 (mL/g _{DQO})	3.42 (mL/g _{DQO} .h))	[30]
Corn stover	Dilute acid	Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum W16	45.0 mmol/L	279.14	11.63	[55]
Corn cob	Acid steam-explosion	C. hydrogeniproducens HR-1	8 g/L (reducing sugars)	132.19	11.02	[56]
Waste sorghum leaves Sugarcane bagasse	Dilute acid Dilute acid	Anaerobic sludge Anaerobic sludge	11.3 mmol/L 9 mmol/L	213.14 271.21	5.76 11.30	[57] This work

^a The concentrations correspond to the total chemical oxygen demand of hemicellulose fractions, not only to carbohydrates.

carbohydrates might act as a potent inhibitor of this process.

Another aspect that could be contributing to the inhibition of H_2 production is the system osmolarity, which is related to the concentration of a solution expressed as the total number of solute particles per liter, thus osmolarity is related to both the concentration of substrate and organic acids. High concentration of dissociated acids in the fermentative medium can promote an increase in ionic strength, which, at high levels, might inhibit microbial growth and even cause cell disruption [35,63,64].

Summarizing, inhibition of dark fermentation might be related to several phenomena, such as inhibitions by substrate, by end products, by furanic and phenolic compounds or by osmolarity, due to solutes concentration augmentation.

The H₂ production was strongly inhibited by HF-AC at initial carbohydrate concentration of 70 mmol/L, resulting in a yield of 17.4 mL_{H2}/g_{carbohydrate} and only 7% of substrate consumption. In this

medium, acetic acid production was equivalent to 5.90 mmol/L, as the medium already contained a concentration 33.56 mmol/L derived from the hemicellulose fraction.

Several authors surmised that part of the inhibition of H_2 production might be associated with furanic compounds such as HMF and furfural in the fermentation medium. Nevertheless, in the condition evaluated in this study, HF-AC contained much lower amounts of these compounds than those reported as inhibitory in the literature [31,52,65]. The concentration of carbohydrates from sugarcane hemicellulose fraction between 64 and 160 mmol/L would negatively affect H_2 production [29]. Hence, the application of hemicellulose fraction as raw material for H_2 production should be tied in with its dilution to diminish the inhibitory effect of acetic acid and high carbohydrate amounts. Thus, the present results show that H_2 production could be inhibited by increasing the hemicellulose fraction content in the fermentative media, possibly

Table 3

Hydrogen and organic acid production at different initial total sugar concentrations obtained at 24 h fermentation of HF-AC.

Initial substrate	Substrate consumption (mmol/L/%)	Final HAc ^{a,b}	Produced HAc ^b	Produced HBu ^a	H ₂ Production	H ₂ Production	H ₂ Yield	H ₂ Productivity
(mmol/L)		(mmol/L)	(mmol/L)	(mmol/L)	(mmol) ^a	(mL) ^a	(mL _{H2} /g _{carbohydrate}) ^a	(mL _{H2} /g _{carbohydrate} .h) ^a
9 27 70	9/100 16.74/62 4.9/7	$\begin{array}{c} 7.80 \pm 0.06 \\ 23.80 \pm 0.13 \\ 39.46 \pm 0.33 \end{array}$	3.90 ± 0.06 13.50 ± 0.13 5.90 ± 0.33	4.67 ± 0.02 9.66 ± 0.09 0	$\begin{array}{c} 1.30 \pm 0.02 \\ 1.29 \pm 0.11 \\ 0.68 \pm 0.04 \end{array}$	31.7 ± 0.5 31.6 ± 2.8 16.6 ± 1.0	258.5 ± 1.7 86.0 ± 2.9 17.4 ± 0.6	$\begin{array}{c} 10.8 \pm 0.3 \\ 3.6 \pm 0.5 \\ 0.7 \pm 0.1 \end{array}$

^a Mean \pm Standard deviation (n = 3); HAc = acetic acid; HBu = butyric acid; ^bHAc initial concentration: 3.90, 10.30, and 33.56 mmol/L for media containing 9, 27, and 70 mmol/L of carbohydrates.

due to the combined effects of the high initial acetic acid concentration in the fermentative medium and the elevated concentration of carbohydrates, which both increase the system osmolarity.

4. Conclusions

High H₂ productivities were obtained in media containing hemicellulose fractions from acid or hydrothermal pretreatments of sugarcane bagasse, corresponding to 11.30 and 7.39 mL_{H2}/(g_{carbohydrate}.h), respectively. The use of hydrolyzed HF-HT showed a higher effect on both yield and productivity (30%). The adaptive phase for HF-HT consumption was influenced not only by the hydrolytic step, but also by the presence of inhibitors, as the kinetics of hydrolyzed HF-HT was deeply affected in the initial period of fermentation when compared to HF-AC.

As demonstrated, the bacteria existing in the fermentative medium were able to perform the hydrolysis of xylooligo-saccharides and produce H_2 via dark fermentation. Therefore, the employment of mixed cultures has been considered as an interesting alternative for the use of this hemicellulose fraction, because other bioconversion processes require a prior stage of hydrolysis of xylooligosaccharides. These results demonstrated the great potential for integration of H_2 production via anaerobic fermentation and 2G ethanol production through the use of hemicellulose fractions derived from a biomass pretreatment.

The ethanol industry in Brazil is one of the biggest in the world, generating huge amounts of residual biomass. In addition, 2G ethanol production is a well studied and consolidated process to diminish residue generation and to promote its valorization. However, in a biorefinery concept other options could be also considered in a complimentary way. As mentioned before, hemicellulose fraction cannot be readily fermented by the traditional used yeast *Sacharomyces cerevisiae*, opening the possibility to use this fraction for biogas production, promoting a more rational use this feedstock.

Acknowledgments

This work was financed by Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro – Carlos Chagas Filho ((FAPERJ) - E-26/010.001659/2014), by FINEP (grant number 01.09.0566.001421/08) and Ministry of Science, Technology, Innovation, and Communication (MCTIC). M. O. Faber is thankful to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for a research scholarship.

Authors would like to thank Ronaldo Rodrigues de Sousa for the contribution on graphical abstract design.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.08.089.

References

- [1] CONAB, ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA DE CANA-DE-AÇÚCAR, Cia. Nac. Abast., 2017. http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/ 17_08_24_08_59_54_boletim_cana_portugues_-20_lev_-17-18.pdf. (Accessed 21 December 2017).
- [2] James C.P. Chen, C.-C. Chou, Cane Sugar Handbook, twelfth ed., J. Wiley, New York, 1993.
- [3] L.M.S. Menandro, H. Cantarella, H.C.J. Franco, O.T. Kölln, M.T.B. Pimenta, G.M. Sanches, S.C. Rabelo, J.L.N. Carvalho, Comprehensive assessment of sugarcane straw: implications for biomass and bioenergy production, Biofuels, Bioprod. Biorefining. 11 (2017) 488–504, https://doi.org/10.1002/bbb.1760.
- [4] C.R. Soccol, L.P. de S. Vandenberghe, A.B.P. Medeiros, S.G. Karp, M. Buckeridge, L.P. Ramos, A.P. Pitarelo, V. Ferreira-Leitão, L.M.F. Gottschalk, M.A. Ferrara, E.P. da Silva Bon, L.M.P. de Moraes, J. de A. Araújo, F.A.G. Torres, Bioethanol

from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil, Bioresour. Technol. 101 (2010) 4820–4825, https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.067.

- [5] R.O. Moutta, M.C. Silva, R.C.N.R. Corrales, V.S. Ferreira-Leitão, E.P.S. Bon, Comparative response and structural characterization of sugarcane bagasse, straw and bagasse-straw 1:1 mixtures subjected to hydrothermal pretreatment and enzymatic conversion, J. Microb. Biochem. Technol. (2013), https:// doi.org/10.4172/1948-5948.S12-005.
- [6] R.O. Moutta, V.S. Ferreira-Leitão, E.P.S. Bon, Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse and straw mixtures pretreated with diluted acid, Biocatal. Biotransform. 32 (2014) 93–100, https://doi.org/10.3109/ 10242422.2013.873795.
- [7] D.P. Maurya, A. Singla, S. Negi, An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol, 3 Biotech 5 (2015) 597–609, https://doi.org/10.1007/s13205-015-0279-4.
- [8] H. Rabemanolontsoa, S. Saka, Various pretreatments of lignocellulosics, Bioresour. Technol. 199 (2016) 83–91, https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.029 0960-8524/?.
- [9] M. Rastogi, S. Shrivastava, Recent advances in second generation bioethanol production: an insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes, Renew. Sustain. Energy Rev. 80 (2017) 330–340, https://doi.org/ 10.1016/j.rser.2017.05.225.
- [10] A.S. Silva, R.S.S. Teixeira, R.O. Moutta, V.S. Ferreira-Leitão, R.R.O. de Barros, M.A. Ferrara, E.P.S. Bon, Sugarcane and woody biomass pretreatments for ethanol production, in: Sustain. Degrad. Lignocellul. Biomass - Tech. Appl. Commer. Differ, 2013, pp. 47–88. https://doi.org/10.5772/53378.
- Commer. Differ, 2013, pp. 47–88. https://doi.org/10.5772/53378.
 [11] J.G. Nijland, H.Y. Shin, P.P. de Waal, P. Klaassen, A.J.M. Driessen, Increased xylose affinity of Hxt2 through gene shuffling of hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*, J. Appl. Microbiol. 124 (2018) 503–510, https://doi.org/10.1111/jam.13670.
- [12] L.R.V. De Sá, M.C. Cammarota, T.C. De Oliveira, E.M.M. Oliveira, A. Matos, V.S. Ferreira-Leitão, Pentoses, hexoses and glycerin as substrates for biohydrogen production: an approach for Brazilian biofuel integration, Int. J. Hydrogen Energy 38 (2013) 2986–2997, https://doi.org/10.1016/ j.jijhydene.2012.12.103.
- [13] K. Trchounian, R.G. Sawers, A. Trchounian, Improving biohydrogen productivity by microbial dark- and photo-fermentations: novel data and future approaches, Renew. Sustain. Energy Rev. 80 (2017) 1201–1216, https:// doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.149.
- [14] B.S.F. Boodhun, A. Mudhoo, G. Kumar, S.H. Kim, C.Y. Lin, Research perspectives on constraints, prospects and opportunities in biohydrogen production, Int. J. Hydrogen Energy 42 (2017) 27471–27481, https://doi.org/10.1016/ j.ijhydene.2017.04.077.
- [15] The Royal Society, Options for Producing Low-Carbon Hydrogen at Scale, 2018.
- [16] P. Phowan, P. Danvirutai, Hydrogen production from cassava pulp hydrolysate by mixed seed cultures: effects of initial pH, substrate and biomass concentrations, Biomass Bioenergy 64 (2014) 1–10, https://doi.org/10.1016/ j.biombioe.2014.03.057.
- [17] L. Zhao, G.L. Cao, A.J. Wang, H.Y. Ren, N.Q. Ren, An anaerobic sequential batch reactor for enhanced continuous hydrogen production from fungal pretreated cornstalk hydrolysate, Int. J. Hydrogen Energy 39 (2014) 19311–19316, https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.05.167.
- [18] M. Cui, J. Shen, Effects of acid and alkaline pretreatments on the biohydrogen production from grass by anaerobic dark fermentation, Int. J. Hydrogen Energy 37 (2012) 1120–1124, https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.02.078.
- [19] I. Panagiotopoulos, R. Dakker, T. Vrije, E. Van Niel, E. Koukios, P. Claassen, Exploring critical factors for fermentative hydrogen production from various types of lignocellulosic biomass, J. Jpn. Inst. Energy 90 (2011) 363–368, https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2002.14891.x.
- [20] Z. Liu, C. Zhang, L. Wang, J. He, B. Li, Y. Zhang, X.H. Xing, Effects of furan derivatives on biohydrogen fermentation from wet steam-exploded cornstalk and its microbial community, Bioresour. Technol. 175 (2015) 152–159, https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.067.
- [21] C.H. Hung, Y.T. Chang, Y.J. Chang, Roles of microorganisms other than Clostridium and Enterobacter in anaerobic fermentative biohydrogen production systems - a review, Bioresour. Technol. 102 (2011) 8437–8444, https:// doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.084.
- [22] N. Nasr, M. Gupta, E. Elbeshbishy, H. Hafez, M.H. El, G. Nakhla, Biohydrogen production from pretreated corn cobs, Int. J. Hydrogen Energy 39 (2014) 19921–19927, https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.10.004.
- [23] A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, D. Crocker, Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass, National Renewable Energy Laboratory Analytical Procedure, 2012. Available at: https://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf.
- [24] A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples, 2008.
- [25] R.D.S. Paredes, R. da R.O. de Barros, H. Inoue, Y. Schinichi, E.P. da Silva Bon, Production of xylanase, α- L -arabinofuranosidase, β-xylosidase, an βglucosidase by Aspergillus awamori using the liquid stream from hotcompressed water treatment of sugarcane bagasse, Biomass Convers. Biorefinery (2015) 3–11, https://doi.org/10.1007/s13399-015-0159-5.
- [26] C. Holliger, M. Alves, D. Andrade, I. Angelidaki, S. Astals, U. Baier, C. Bougrier, P. Buffière, M. Carballa, V. de Wilde, F. Ebertseder, B. Fernández, E. Ficara, I. Fotidis, J.-C. Frigon, H.F. de Laclos, D.S.M. Ghasimi, G. Hack, M. Hartel,

J. Heerenklage, I.S. Horvath, P. Jenicek, K. Koch, J. Krautwald, J. Lizasoain, J. Liu, L. Mosberger, M. Nistor, H. Oechsner, J.V. Oliveira, M. Paterson, A. Pauss, S. Pommier, I. Porqueddu, F. Raposo, T. Ribeiro, F. Rüsch Pfund, S. Strömberg, M. Torrijos, M. van Eekert, J. van Lier, H. Wedwitschka, I. Wierinck, Towards a standardization of biomethane potential tests, Water Sci. Technol. 74 (2016) 2515–2522, https://doi.org/10.2166/wst.2016.336.

- [27] L.R.V. Sá, R.O. Moutta, E.P.S. Bon, M.C. Cammarota, V.S. Ferreira-Leitão, Fermentative biohydrogen production using hemicellulose fractions: analytical validation for C5 and C6-sugars, acids and inhibitors by HPLC, Int. J. Hydrogen Energy 40 (2015) 13888–13900, https://doi.org/10.1016/ j.ijhydene.2015.08.014.
- [28] G.L. Cao, N.Q. Ren, A.J. Wang, W.Q. Guo, J.F. Xu, B.F. Liu, Effect of lignocellulosederived inhibitors on growth and hydrogen production by Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum W16, Int. J. Hydrogen Energy 35 (2010) 13475–13480, https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.11.127.
- [29] A. Fangkum, A. Reungsang, Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate by elephant dung: effects of initial pH and substrate concentration, Int. J. Hydrogen Energy 36 (2011) 8687–8696, https://doi.org/10.1016/ j.ijhydene.2010.05.119.
- [30] S. Pattra, S. Sangyoka, M. Boonmee, A. Reungsang, Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by Clostridium butyricum, Int. J. Hydrogen Energy 33 (2008) 5256–5265, https://doi.org/ 10.1016/j.ijhydene.2008.05.008.
- [31] M. Quéméneur, J. Hamelin, A. Barakat, J.P. Steyer, H. Carrre, E. Trably, Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures, Int. J. Hydrogen Energy 37 (2012) 3150–3159, https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.11.033.
- [32] G.J. de M. Rocha, V.M. Nascimento, A.R. Gonçalves, V.F.N. Silva, C. Martín, Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical-chemical composition, Ind. Crops Prod. 64 (2015) 52–58, https:// doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.003.
- [33] A. Limayem, S.C. Ricke, Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects, Prog. Energy Combust. Sci. 38 (2012) 449–467, https://doi.org/10.1016/j.pecs.2012.03.002.
- [34] M.A.Z. Bundhoo, R. Mohee, Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: a review, Int. J. Hydrogen Energy 41 (2016) 6713–6733, https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.057.
- [35] E. Elbeshbishy, B.R. Dhar, G. Nakhla, H. Lee, A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation, Renew. Sustain. Energy Rev. 79 (2017) 656–668, https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.075.
- [36] E. Palmqvist, B. Hahn-Hägerdal, Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition, Bioresour. Technol. 74 (2000) 25–33, https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00161-3.
- [37] F. Monlau, C. Sambusiti, A. Barakat, M. Quéméneur, E. Trably, J.P. Steyer, H. Carrère, Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review, Biotechnol. Adv. 32 (2014) 934–951, https://doi.org/10.1016/ j.biotechadv.2014.04.007.
- [38] M.E. Nissilä, C.H. Lay, J.A. Puhakka, Dark fermentative hydrogen production from lignocellulosic hydrolyzates - a review, Biomass Bioenergy 67 (2014) 145–159, https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.04.035.
- [39] D. Xin, Z. Sun, L. Viikari, J. Zhang, Role of hemicellulases in production of fermentable sugars from corn stover, Ind. Crops Prod. 74 (2015) 209–217, https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.017.
- [40] L.R. V De Sá, T.C. De Oliveira, T.F. Dos Santos, A. Matos, M.C. Cammarota, E.M.M. Oliveira, V.S. Ferreira-Leitão, Hydrogenase activity monitoring in the fermentative hydrogen production using heat pretreated sludge: a useful approach to evaluate bacterial communities performance, Int. J. Hydrogen Energy 36 (2011) 7543–7549, https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.03.119.
- [41] E.A. Ximenes, C.R. Felix, O sistema celulolítico de microrganismos anaeróbios: uma mini-revisão sobre o celulossoma, Univ. Ciências Da Saúde. 1 (2008) 335–341, https://doi.org/10.5102/ucs.v1i2.516.
- [42] E. Morag, E.A. Bayer, R. Lamed, Relationship of cellulosomal and noncellulosomal xylanases of Clostridium thermocellum to cellulose-degrading enzymes, J. Bacteriol. 172 (1990) 6098–6105, https://doi.org/10.1128/ jb.172.10.6098-6105.1990.
- [43] S. Marichamy, B. Mattiasson, Rapid production of cellulase-free xylanases by solventogenic Clostridia from rumen, Enzym. Microb. Technol. 37 (2005) 497–504, https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.08.043.
- [44] I.S.K. Wooshin Park, Seung H. Hyun, Sang-Eun Oh, Bruce E. Logan, Removal of headspace CO2 increases biological hydrogen production, Environ. Sci. Technol. 39 (2005) 4416–4420, https://doi.org/10.1021/es048569d.
- [45] G. Luo, D. Karakashev, L. Xie, Q. Zhou, I. Angelidaki, Long-term effect of inoculum pretreatment on fermentative hydrogen production by repeated batch cultivations: homoacetogenesis and methanogenesis as competitors to

hydrogen production, Biotechnol. Bioeng. 108 (2011) 1816-1827, https://doi.org/10.1002/bit.23122.

- [46] A.C.C. Chang, Y.H. Tu, M.H. Huang, C.H. Lay, C.Y. Lin, Hydrogen production by the anaerobic fermentation from acid hydrolyzed rice straw hydrolysate, Int. J. Hydrogen Energy 36 (2011) 14280–14288, https://doi.org/10.1016/ j.ijhydene.2011.04.142.
- [47] Y. Mu, H.Q. Yu, G. Wang, Evaluation of three methods for enriching H2producing cultures from anaerobic sludge, Enzym. Microb. Technol. 40 (2007) 947–953, https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.033.
- [48] L.T. Angenent, K. Karim, M.H. Al-Dahhan, B.A. Wrenn, R. Domíguez-Espinosa, Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater, Trends Biotechnol. 22 (2004) 477–485, https://doi.org/10.1016/ j.tibtech.2004.07.001.
- [49] P.C. Hallenbeck, Fermentative hydrogen production: principles, progress, and prognosis, Int. J. Hydrogen Energy 34 (2009) 7379–7389, https://doi.org/ 10.1016/j.ijhydene.2008.12.080.
- [50] Y. Zhang, B. Han, T.C. Ezeji, Biotransformation of furfural and 5hydroxymethyl furfural (HMF) by Clostridium acetobutylicum ATCC 824 during butanol fermentation, Nat. Biotechnol. 29 (2012) 345–351, https:// doi.org/10.1016/j.nbt.2011.09.001.
- [51] P. Kongjan, I. Angelidaki, Extreme thermophilic biohydrogen production from wheat straw hydrolysate using mixed culture fermentation: effect of reactor configuration, Bioresour. Technol. 101 (2010) 7789–7796, https://doi.org/ 10.1016/j.biortech.2010.05.024.
- [52] M.R. Siqueira, V. Reginatto, Inhibition of fermentative H2 production by hydrolysis byproducts oflignocellulosic substrates, Renew. Energy 80 (2015) 109–116, https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.01.070.
- [53] B.E.L. Baêta, D.R.S. Lima, J.G.B. Filho, O.F.H. Adarme, L.V.A. Gurgel, S.F.D. Aquino, Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysates by two-stage anaerobic digestion process, Bioresour. Technol. 218 (2016) 436–446, https://doi.org/10.1016/ j.biortech.2016.06.113.
- [54] P. Kongjan, S. O-Thong, M. Kotay, B. Min, I. Angelidaki, Biohydrogen production from wheat straw hydrolysate by dark fermentation using extreme thermophilic mixed culture, Biotechnol. Bioeng. 105 (2010) 899–908, https:// doi.org/10.1002/bit.22616.
- [55] G. Cao, N. Ren, A. Wang, D.J. Lee, W. Guo, B. Liu, Y. Feng, Q. Zhao, Acid hydrolysis of corn stover for biohydrogen production using Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum W16, Int. J. Hydrogen Energy 34 (2009) 7182–7188, https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.07.009.
- [56] X. Tang, N. Ren, J. Xu, Evaluation of hydrogen production from corn cob with the mesophilic bacterium Clostridium hydrogeniproducens HR-1, Int. J. Hydrogen Energy 38 (2013) 9104–9110, https://doi.org/10.1016/ j.ijhydene.2013.05.066.
- [57] D. Rorke, E.B. Gueguim Kana, Biohydrogen process development on waste sorghum (Sorghum bicolor) leaves: optimization of saccharification, hydrogen production and preliminary scale up, Int. J. Hydrogen Energy 41 (2016) 12941–12952, https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.06.112.
- [58] A. Bielen, M. Verhaart, J. van der Oost, S. Kengen, Biohydrogen production by the thermophilic bacterium caldicellulosiruptor saccharolyticus: current status and perspectives, Life 3 (2013) 52–85, https://doi.org/10.3390/ life3010052.
- [59] M. Ljunggren, G. Zacchi, Techno-economic analysis of a two-step biological process producing hydrogen and methane, Bioresour. Technol. 101 (2010) 7780–7788, https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.009.
- [60] S. Srikanth, S. Venkata Mohan, Regulating feedback inhibition caused by the accumulated acid intermediates during acidogenic hydrogen production through feed replacement, Int. J. Hydrogen Energy 39 (2014) 10028–10040, https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.04.152.
- [61] S. Van Ginkel, B.E. Logan, Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids, Environ. Sci. Technol. 39 (2005) 9351–9356, https://doi.org/10.1021/es0510515.
- [62] D.T. Jones, D.R. Woods, Acetone-butanol fermentation revisited, Microbiol. Rev. 50 (1986) 484–524, doi:3540574.
- [63] X.J. Zheng, H.Q. Yu, Inhibitory effects of butyrate on biological hydrogen production with mixed anaerobic cultures, J. Environ. Manag. 74 (2005) 65-70, https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2004.08.015.
- [64] E.W.J. Van Niel, P.A.M. Claassen, A.J.M. Stams, Substrate and product inhibition of hydrogen production by the extreme thermophile, Caldicellulosiruptor saccharolyticus, Biotechnol. Bioeng. 81 (2003) 255–262, https://doi.org/ 10.1002/bit.10463.
- [65] S.S. Veeravalli, S.R. Chaganti, J.A. Lalman, D.D. Heath, Effect of furans and linoleic acid on hydrogen production, Int. J. 38 (2013) 12283–12293, https:// doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.035.