



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Produção biotecnológica de hidrogênio, etanol e outros produtos a partir do glicerol da reação de formação de biodiesel.

Mestranda: Janaina Berne da Costa

Julho de 2010

Porto Alegre-RS

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Janaina Berne da Costa

Produção biotecnológica de hidrogênio, etanol e outros produtos a partir do glicerol da reação de formação de biodiesel.

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Química

Profa. Dr^a. Maria do Carmo Ruaro Peralba
Orientadora

Porto Alegre, Julho de 2010.

A presente dissertação foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre Agosto/2008 e Julho/2010, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação da Professora Dra. Maria do Carmo Ruaro Peralba. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Osvaldo Faria

Profa. Dra. Clarisse Maria S. Piatnicki

Prof. Dr. João Henrique Z dos Santos

Janaina Berne da Costa

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Professora. Dr^a. Maria do Carmo Ruaro Peralba pela orientação, apoio, ensinamentos, amizade e incentivo realizados ao longo deste trabalho.

Aos professores Dimitrios Samios e Marco Antônio Záchia Ayub pelo apoio financeiro, aprendizagem e oportunidade de trabalhar em seus projetos e grupos de pesquisa.

As bolsistas Elisângela Souza, Fernanda Bregalda, Fernanda Carrion e Juliana Holbach e a amiga Daniele Misturini por todo o apoio, dedicação e empenho oferecidos durante o curso do mestrado.

Aos colegas de laboratório do ICTA pela amizade e auxílio durante os trabalhos.

Aos demais colegas da UFRGS e amigos pela amizade, apoio e coleguismo.

A empresa Braskem e aos Químicos André Elicker e Ricardo Zimmer pelas análises realizadas durante o decorrer do trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Aos meus familiares pelo apoio e incentivo e em especial ao meu namorado Igor Arriada Pereira por toda a dedicação, paciência, amor e compreensão.

TRABALHOS GERADOS A PARTIR DOS RESULTADOS DESCRITOS NA PRESENTE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO.

Rossi, D. M.; Costa, J. B.; Souza, E. A.; Peralba, M. C. R.; Ayub, M. A. Z. Samios, D. **Comparison of different pretreatment methods to produce hydrogen from sludge using residual glycerol from biodiesel**, submetido.

Rossi, D. M.; Costa, J. B.; Souza, E. A.; Peralba, M. C. R.; Ayub, M. A. Z. **Isolation of bacteria from environmental consortium to convert raw glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol and ethanol**, submetido.

Costa, J. B.; Rossi, D. M.; Peralba, M. C. R.; Samios, D.; Ayub, M. A. Z. **“Degradação biotecnológica do glicerol residual oriundo da síntese de biodiesel”** 15° Encontro Nacional de Química Analítica e 3° Congresso Iberoamericano de Química Analítica, Salvador-BA, Brasil, 2009.

Rossi, D. M.; Costa, J. B.; Peralba, M. C. R.; Samios, D.; Ayub, M. A. Z. **“Seleção de bactérias degradadoras de glicerol utilizando análise de produtos em cromatografia líquida de alta eficiência”** 15° Encontro Nacional de Química Analítica e 3° Congresso Iberoamericano de Química Analítica, Salvador-BA, Brasil, 2009.

Rossi, D. M.; Costa, J. B.; Peralba, M. C. R.; Samios, D.; Ayub, M. A. Z. **“Isolamento e seleção de bactérias de lodo industrial capazes de degradar glicerol para a produção de bioprodutos”** IX Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, Maringá-PR, Brasil, 2009.

Rossi, D. M.; Costa, J. B.; Peralba, M. C. R.; Samios, D.; Ayub, M. A. Z. **“Degradação biotecnológica de glicerol oriundo da síntese de biodiesel por consórcio microbiano ambiental”** IX Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, Maringá-PR, Brasil, 2009.

Peralba, M. C. R.; Ayub, M. A. Z. Samios, D.; Costa, J. B.; Rossi, D. M. **“Proposta integrada científico-tecnológica e ambiental para produção do biodiesel: II. O aspecto ambiental da transformação biológica do glicerol”**

II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, Brasília-DF, Brasil, 2009.

Costa, J. B.; Peralba, M. C. R.; Rossi, D. M.; Samios, D.; Ayub, M. A. Z.
“Bioconversão bacteriana do glicerol residual oriundo da síntese de biodiesel: seleção de bactérias produtoras de hidrogênio” *VII Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental, Porto Alegre-RS, Brasil, 2010.*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 GLICEROL.....	4
2.2 HIDROGÊNIO.....	6
2.2.1 Aplicações do Hidrogênio.....	11
2.3 MICRORGANISMOS E MEIOS DE CULTURA	11
2.4 CONDIÇÕES OPERACIONAIS E FÍSICO-QUÍMICAS	12
2.4.1 Inóculo	13
2.4.2 Culturas Puras.....	13
2.4.3 Culturas Mistas.....	13
2.4.4 Efeito da Presença dos Fosfatos e Íons Metálicos	14
2.4.5 Efeito da Temperatura.....	14
2.4.6 Importância do pH	15
2.5 FONTES DE MICRORGANISMOS DE INTERESSE	15
2.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS.....	16
3 OBJETIVOS.....	18
3.1 OBJETIVO GERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 INSTALAÇÕES.....	19
4.2 OBTENÇÕES DO LODO E DO GLICEROL	19
4.3 MANUTENÇÃO DAS CULTURAS DOS MICRORGANISMOS	19
4.4 CONTROLE DE CONTAMINAÇÕES	20
4.5 SELEÇÃO E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE HIDROGÊNIO.....	20
4.6 FERMENTAÇÃO EM AGITADOR ORBITAL COM AS BACTÉRIAS ISOLADAS.....	21
4.7 IDENTIFICAÇÃO DOS MICROORGANISMOS	22
4.8 ENSAIOS EM BIOREATORES UTILIZANDO MICROORGANISMO ISOLADO	23
4.9 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL “PLACKETT-BURMAN”(P-B).....	23
4.10 PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO	25
4.11 MÉTODO DO CAMINHO DE ASCENDÊNCIA MÁXIMA	26
4.12 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR).....	26
4.13 ESTUDOS COMPARATIVOS DE DIFERENTES MÉTODOS DE PRÉ-TRATAMENTOS PARA O ENRIQUECIMENTO DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO ATRAVÉS DO CONSÓRCIO MICROBIANO	28
4.13.1 Pré-Tratamento	29
4.13.2 Procedimento Experimental	29
4.14 MÉTODOS ANALÍTICOS	30
4.14.1 Determinação da Biomassa dos Produtos Formados.....	30

4.14.2 Análises Cromatográficas	30
4.14.3 Determinação da Densidade Óptica (DO)	31
4.14.4 Determinação do pH.....	32
4.14.5 Determinação dos Sólidos Suspensos Voláteis (SSV).....	32
4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1 DEGRADAÇÃO DO GLICEROL.....	34
5.2 SELEÇÃO E ISOLAMENTO DOS MICROORGANISMOS.....	36
5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS MICROORGANISMOS	39
5.4 FERMENTAÇÃO EM BIOREATOR.....	40
5.5 ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	44
5.5.1 Planejamento Plackett-Burman.....	44
5.5.2 Planejamento Fatorial Fracionário	48
5.5.3 Caminho de Ascendência Máxima.....	51
5.5.4 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)	52
5.6 PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO X PRÉ-TRATAMENTOS DO LODO.....	58
5.7 DEGRADAÇÃO DO SUBSTRATO X PRÉ-TRATAMENTOS	59
5.8 BIOMASSA X PRÉ-TRATAMENTOS	61
5.9 EFEITO DO PH FINAL SOBRE A ROTA METABÓLICA	62
5.10 METABÓLITOS SOLÚVEIS FORMADOS EM FUNÇÃO DOS DIFERENTES PRÉ-TRATAMENTOS	63
6. CONCLUSÕES.....	64
7. REFERÊNCIAS.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleo vegetal.....	3
Figura 2. Principais setores industriais de utilização da glicerina	5
Figura 3. Rotas bioquímicas de fermentação do glicerol.....	10
Figura 4. Esquema geral de um processo fermentativo.....	12
Figura 5. Bioreator submerso de 2 L (Biostat B Model, B. Braun Biotech International, Alemanha).....	20
Figura 6. Ampola utilizada para coleta do gás produzido no bioretor.....	31
Figura 7. Degradação do glicerol comercial, produção de ácidos e de 1,3-propanodiol em cultivo anaeróbio realizado em bioreator no período de 72 horas, empregando consórcio microbiano ambiental.....	35
Figura 8. Degradação do glicerol residual, produção de ácidos e de 1,3-propanodiol em cultivo anaeróbio realizado em bioreator no período de 72 horas, empregando consórcio microbiano ambiental.....	35
Figura 9. Ensaio anaeróbio realizados em agitador orbital para os quatro isolados que apresentaram capacidade de degradação do glicerol, produção de H ₂ e etanol depois de 24 de cultivo, nas condições de operação: temperatura 35 °C e 150 rpm. Quantidade de glicerol não degradado (g.L ⁻¹), etanol (g.L ⁻¹) e hidrogênio (% mol) produzidos.....	37
Figura 10. Ensaio aeróbio realizado em agitador orbital para os quatro isolados que apresentaram capacidade de degradação do glicerol, produção de H ₂ e etanol depois de 24 de cultivo, nas condições de operação: temperatura 35 °C e 150 rpm. Quantidade de glicerol não degradado (g.L ⁻¹), etanol (g.L ⁻¹) e hidrogênio (% mol) produzidos.....	38
Figura 11. Cromatogramas das análises dos produtos de fermentação do cultivo anaeróbio para o isolado 1 realizado em agitador orbital. (a) zero hora de cultivo; (b) 24 horas de cultivo.....	39
Figura 12. Bactéria isolada 1 crescida em ágar Mcconkey.....	40
Figura 13. Bactéria isolada 5 crescida em ágar Nutriente.....	40

Figura 14. Ensaio realizado em bioreator após 35 horas de cultivo em condições de aerobiose com isolado BLb01.....	42
Figura 15. Ensaio realizado em bioreator após 35 horas de cultivo em condições de anaerobiose com isolado BLb01,.....	43
Figura 16. Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a obtenção da produção de H ₂ (% mol), interação entre (T) x K ₂ HPO ₄	56
Figura 17. Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a obtenção da produção de H ₂ (% mol), interação entre (T) x KH ₂ PO ₄	57
Figura 18. Efeito da produção cumulativa de hidrogênio pelos tratamentos: dessecação, térmico, congelamento, ácido, base e controle.....	59
Figura 19. Efeito da degradação do glicerol depois de 36 horas de cultivo com os diferentes pré-tratamentos.....	60
Figura 20. Efeito dos sólidos suspensos voláteis (SSV) versus métodos pré-tratamentos do lodo.....	61
Figura 21. Gráfico do pH final em função dos diferentes tratamentos.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Níveis das variáveis, utilizadas no planejamento experimental Plackett-Burman para avaliação dos nutrientes e condições de operação sobre a produção de hidrogênio realizado em agitador orbital.....	24
Tabela II. Níveis das variáveis, utilizadas no planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} para avaliação dos nutrientes e condições de operação sobre a produção de hidrogênio realizado em agitador orbital.....	25
Tabela III. Delineamento dado caminho de ascendência máxima com 5 ensaios e seus respectivos valores de temperatura e K_2HPO_4	26
Tabela IV. Matriz do delineamento composto central rotacional com seus respectivos valores codificados e variáveis reais utilizadas para a produção de hidrogênio (% mol) realizado em agitador orbital.....	27
Tabela V. Ensaios do planejamento Plackett-Burman tendo como resposta a produção de hidrogênio em % mol depois de 24 horas de cultivo.....	45
Tabela VI. Resultados estatísticos e efeitos das variáveis estudadas para a produção de hidrogênio para o planejamento Plackett-Burman.....	48
Tabela VII. Ensaios do delineamento Fatorial Fracionário 2^{6-2} em níveis codificados tendo como resposta a produção de hidrogênio em % mol realizadas em agitador orbital depois de 24 horas de cultivo.....	49
Tabela VIII. Efeitos estimados para a produção de hidrogênio resultante do delineamento fatorial fracionário.....	50

TABELA IX. Planejamento dos experimentos pela metodologia de caminho de ascendência máxima e resposta de produção de hidrogênio em % mol em 24 horas de cultivo.....	52
TABELA X. Valores codificados, variáveis reais e resposta da produção de hidrogênio (% mol) para os ensaios do delineamento composto central rotacional realizado em agitador orbital depois de 24 horas de cultivo.....	53
Tabela XI. Coeficientes de regressão para a resposta da produção de hidrogênio (% mol).....	54
Tabela XII. Anova para a resposta da produção de Hidrogênio.....	55
Tabela XIII. Metabólitos solúveis formados pelos diferentes pré-tratamentos	63

ABREVIATURAS

Acetil-CoA – acetilcoenzima A

ATP – trifosfato de adenosina

CECOM – Centro de Combustíveis

DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional

DHA – dihidroxiacetona

DHA_k – dihidroxiacetona kinase

DO – densidade óptica

GDHt – glicerol desidratase

GHD – glicerol desidrogenase

H₂ – hidrogênio

HPLC – High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

3-HPA – 3-hidroxipropionaldeído

ICTA – Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos

LB – lúria bertani

MS – massa seca de células (g L⁻¹)

MSR – Metodologia de Superfície de Resposta

NAD – nicotinamida adenina dinucleotideo

nm – nanômetro

P-B – Plackett & Burman

PDOR – 1,3-propanodiol oxidoreductase

rpm – rotações por minuto

SSV – sólidos suspensos voláteis

UFC – unidades formadoras de colônias

UASB – Upflow anaerobic sludge blanket digestion (Digestor anaeróbio de fluxo ascendente)

ABSTRACT

Glycerol is the main product resulting from the biodiesel synthesis from vegetable oils and animal fat, being equal to 10% of the biodiesel production. Glycerol is a byproduct of many industrial processes becoming a potentially attractive substrate for obtaining higher aggregate value products through bacterial action. Due to its high production and being, as a consequence, a future problem if not consumed, an alternative use for glycerol is its conversion in more useful products as hydrogen, ethanol, 1-3-propanediol etc. The transformation of glycerol by biotechnological processes can be socially attractive since there is a great interest in seeking alternatives for using this product avoiding its accumulation in the environment. The present work aims to select bacteria able to degrade residual glycerol from biodiesel synthesis forming hydrogen and ethanol, products of high social interest, as byproducts. Several microorganisms were tested as far as glycerol degrading is concerned. Initially, tests with environmental microbial consortium (sludge) were carried out isolating and identifying the bacteria present in it. Afterwards, through anaerobic fermentations, the strain with the greatest glycerol degradation potential and conversion in byproducts as hydrogen and ethanol was selected. The bacterium *Klebsiella pneumoniae* BLb01 presented 100% glycerol degradation with the best capacity of hydrogen and ethanol production. After the strain selection, tests of growing conditions optimization for hydrogen production were carried out using experimental planning type Placket-Burman, Fractional Factorial and Central Rotational Compound Delineation. The results showed that the highest hydrogen production (45 mol%) was achieved with the growing medium consisting of: glycerol 30 g.L⁻¹, pH = 9, T = 39°C, yeast extract 3 g.L⁻¹, K₂HPO₄ 3 g.L⁻¹. In parallel studies using the same environmental microbial consortium with different pre treatments (drying, thermal, basic, acid and freezing) were carried out. The drying treatment presented the best result for glycerol degrading (66% and hydrogen production (34 mol%).

Key words: Hydrogen, Glycerol, Biodiesel, Ethanol.

RESUMO

O glicerol é o principal produto obtido da síntese do biodiesel a partir de óleos vegetais e gordura animal, sendo gerado em 10 % da produção do biodiesel. Glicerol é um subproduto de muitos processos industriais tornando-se um substrato potencialmente atrativo para a produção de produtos de valor agregado através de ação bacteriana. Devido a sua alta produção, e sendo, conseqüentemente, um problema futuro caso este não seja consumido, uma alternativa para utilização do glicerol é a sua conversão em produtos de alta utilidade, tais como o hidrogênio, etanol, 1,3-propanodiol etc. A transformação do glicerol por processos biotecnológicos pode ser socialmente atrativa visto que existe grande interesse em buscas de alternativas para a utilização deste produto evitando seu acúmulo no meio ambiente. O presente trabalho teve como objetivo selecionar bactérias capazes de degradar glicerol residual da síntese química de biodiesel, e ter como subprodutos a formação de H₂ e etanol, produtos de alto interesse social. Vários microrganismos foram testados quanto à ação de degradação do glicerol. Inicialmente, realizaram-se testes com consórcio microbiano ambiental (lodo), com isolamento e identificação das bactérias nele presentes. A partir desta etapa foi selecionada, através de fermentações anaeróbias, a cepa (bactéria) de maior potencial na degradação do glicerol e conversão em bioprodutos tais como, hidrogênio e etanol, sendo a bactéria *Klebsiella pneumoniae* BLb01 a que apresentou 100 % de degradação do glicerol residual com a melhor capacidade de produção de H₂ e etanol. Após a seleção da cepa, realizaram-se testes de otimização das condições de cultivo para a produção de hidrogênio, utilizando planejamento experimental do tipo Plackett-Burman, Fatorial Fracionário e Delineamento Composto Central Rotacional. Os resultados obtidos mostraram que a maior produção de hidrogênio (45 % mol) foi obtida com o meio de cultivo constituído da seguinte composição: (30 g.L⁻¹ glicerol, pH 9, T de 39 °C, 3 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 3 g.L⁻¹ de K₂HPO₄ g.L⁻¹ e 1,0 g.L⁻¹ KH₂PO₄). Paralelamente foram realizados estudos utilizando este mesmo consórcio microbiano ambiental com diferentes pré-tratamentos (dessecação, térmico, básico, ácido e congelamento). O tratamento de dessecação apresentou o melhor desempenho na degradação do glicerol (66 %) e produção de H₂ (34 %mol).

Palavras-chave: Hidrogênio, Glicerol, Biodiesel, etanol.

1. INTRODUÇÃO

A intensiva busca por fontes alternativas de energia e processos sustentáveis visando à redução da poluição ambiental e o aquecimento global do planeta tem estimulado o mercado mundial de combustíveis limpos. Os biocombustíveis, como o biodiesel, representam uma alternativa renovável e ambientalmente segura aos combustíveis fósseis. Sua produção encontra-se em crescimento acelerado, e como consequência, a quantidade de subprodutos gerados de sua produção. O glicerol é o principal produto obtido durante a síntese do biodiesel a partir de óleos vegetais e gordura animal. De maneira geral, 10 % do volume total do biodiesel produzido é constituído por glicerol, o qual é impuro e de baixo valor econômico. O glicerol é um subproduto de muitos processos industriais tornando-se um substrato potencialmente atrativo para a produção biotecnológica de produtos de valor agregado. Uma alternativa para utilização do glicerol é a sua conversão em produtos de grande utilidade, tais como hidrogênio e etanol. A transformação do glicerol por processos biotecnológicos pode ser uma escolha viável, uma vez que existe uma grande necessidade de buscas alternativas para sua utilização, evitando que se torne um problema no futuro devido a sua acumulação.

Neste trabalho, empregou-se o subproduto glicerol como componente do meio de fermentação para a produção de hidrogênio e etanol utilizando a bactéria isolada espécie *Klebsiella pneumoniae*,

Destaca-se o caráter inovador deste trabalho, uma vez que poucos relatos na literatura são encontrados relacionados com a produção de hidrogênio e etanol a partir do glicerol da síntese de biodiesel.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O século XX foi caracterizado como o século do petróleo. A sociedade moderna acostumou-se a desfrutar do conforto oferecido por esta matéria-prima não renovável, na forma de combustíveis e produtos químicos de uso diário, como os plásticos. Derivados do petróleo, esta nova classe de materiais tem sido largamente utilizada desde meados do século passado, substituindo a madeira, os metais e até mesmo o concreto, dando início ao que chamamos de petroquímica. No entanto, o constante aumento da demanda por fontes de energia, as mudanças climáticas causadas pelo aquecimento da atmosfera e o esgotamento das reservas de petróleo de fácil extração, aliado a um desenvolvimento socioeconômico mais intenso, sobretudo nos países em desenvolvimento, têm incentivado a utilização de insumos renováveis, que possam substituir, ao menos parcialmente, os combustíveis de origem fóssil como petróleo, carvão e gás natural.¹ A utilização de fontes alternativas de energia é umas das grandes prioridades atuais, que vem contribuir significativamente para contornar os graves problemas ocasionados pelo desenvolvimento tecnológico. Um combustível, em particular, que apresenta elevado potencial como biocombustível é o biodiesel.²

Biodiesel é um combustível biodegradável derivado de fontes renováveis como óleos vegetais e gordura animal que, em presença de um catalisador reagem quimicamente com o álcool ou o metanol (Figura 1). O óleo vegetal é um triglicerídeo, ou seja, é um tri éster derivado da glicerina. Sob ação de um catalisador básico, ou mesmo ácido, e na presença de metanol ou etanol, o óleo sofre uma reação de transesterificação formando três moléculas de ésteres metílicos ou etílicos dos ácidos graxos, e liberando a glicerina.³

Devido aos inúmeros incentivos governamentais que impulsionam a produção de biodiesel no mundo, tal combustível está sendo produzido largamente, e um fator preocupante frente a este exacerbado crescimento, é o destino do glicerol excedente, já que para cada tonelada de biodiesel obtido são gerados 100 kg de glicerol, provocando efeitos adversos à economia do biodiesel.^{2,4}

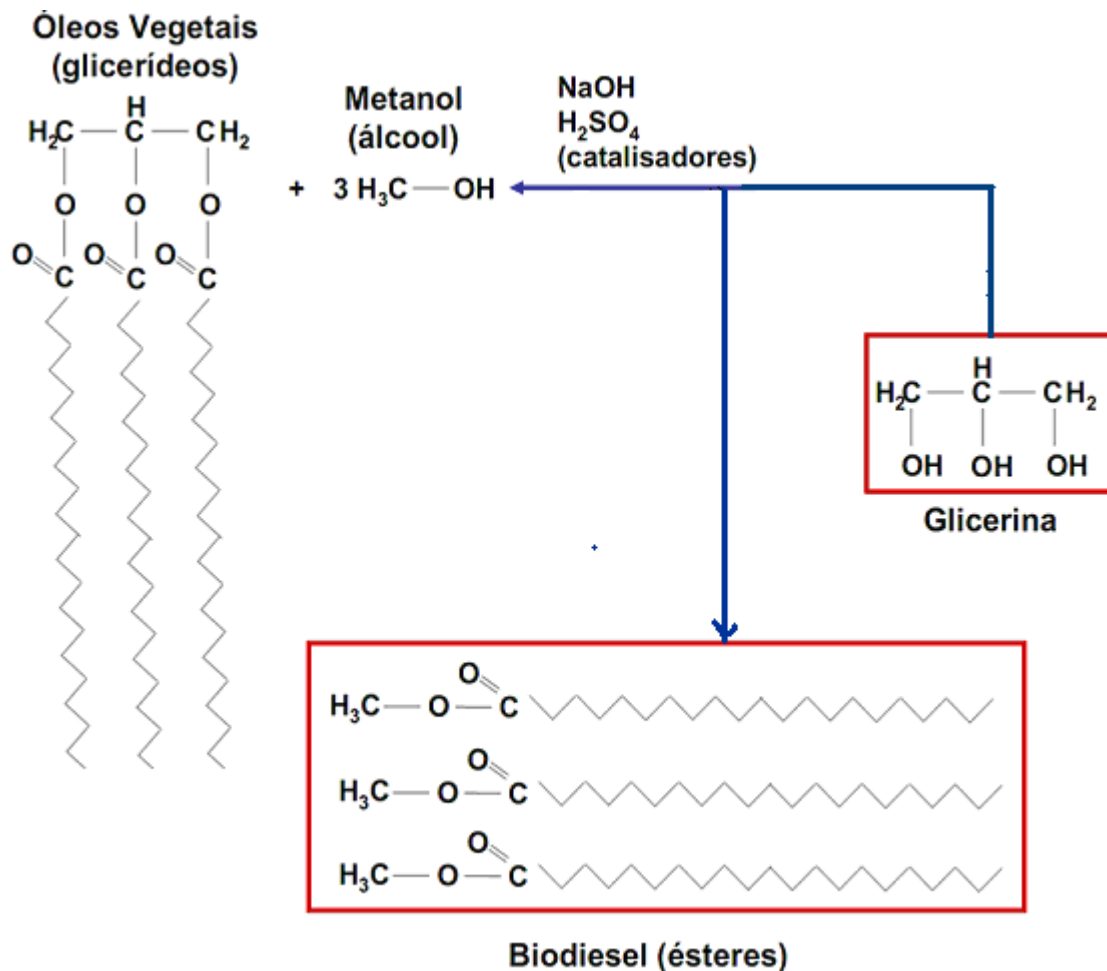


Figura 1. Esquema de produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleo vegetal.²

Com o intuito de evitar futuros problemas derivados da acumulação de glicerol e para tornar a produção de biodiesel mais competitiva, torna-se necessária a busca de alternativas para o uso do glicerol bruto gerado nesta produção. Este subproduto, na forma pura, possui inúmeras aplicações industriais. O glicerol oriundo do biodiesel apresenta impurezas como água, sais, ésteres, álcool e óleo residual, que lhe conferem um baixo valor.⁵ A rentabilidade de vários processos químicos depende em parte, da venda dos subprodutos, permitindo a redução dos custos de produção e conseqüentemente, do preço final do produto. Dessa forma, existe um grande interesse na purificação do glicerol ou no seu reaproveitamento direto, sem tratamento, o que proporcionará à viabilização do processo de produção de biodiesel, permitindo que este se torne competitivo no crescente mercado de

biocombustíveis. Os processos para sua purificação incluem filtração, destilação a vácuo, descoloração e troca de íons para a remoção principalmente de K^+ e Na^+ utilizados como catalisadores.⁶ No entanto, os tratamentos de purificação são de custo excessivamente elevados para pequenos e médios produtores nacionais de biodiesel. Devido a este fato, uma maior quantidade de efluentes contendo glicerol poderá ser descartada no meio ambiente sem nenhum tratamento, aumentando conseqüentemente os problemas e riscos ambientais.

A conversão microbiana de glicerol por processos biotecnológicos em produtos de maior valor agregado como biomassa e biomoléculas, é uma alternativa relevante para a maior valorização da produção de biodiesel.⁷ O glicerol poderá substituir tradicionais carboidratos, assim como sacarose e glicose em muitos processos de fermentação industrial e poderá ser usado para obter outros metabólitos assim como etanol, hidrogênio e ácidos orgânicos.^{8,9} Neste sentido, a biotecnologia moderna, com todo seu avanço trará grandes contribuições e permitirá a obtenção de biomoléculas e produtos com importantes propriedades.⁴

2.1 GLICEROL

Glicerol é o nome comum do composto orgânico 1,2,3-propanotriol, descoberto por Carl W. Scheele em 1779 durante a separação de uma mistura aquecida de PbO preparada com óleo de oliva.¹ Os seus sinônimos são glicerina, trihidroxipropano, glicil álcool, gliceril e 1,2,3-trihidroxipropano. Na natureza, o glicerol existe em vegetais (soja, mamona, babaçu, girassol, palma, algodão, coco, dendê, pinhão manso) e animais em formas combinadas de glicerina com ácidos graxos.¹⁰ Em microrganismos eucarióticos, o glicerol constitui o principal composto formado para regular as variações de atividade de água em ambientes altamente osmofílicos. O glicerol na sua forma pura apresenta-se como um líquido viscoso, incolor, inodoro e higroscópico, com sabor doce, solúvel em água e álcool, insolúvel em éter e em clorofórmio.¹¹

Devido às suas características físicas e químicas e ao fato de ser inócuo, o glicerol puro apresenta diferentes aplicações. A Figura 2 mostra uma distribuição percentual de aplicações mais usuais da glicerina. Apesar do glicerol apresentar estas aplicações na forma pura, poucos estudos estão sendo direcionados para a

utilização de glicerol bruto na forma direta.¹²

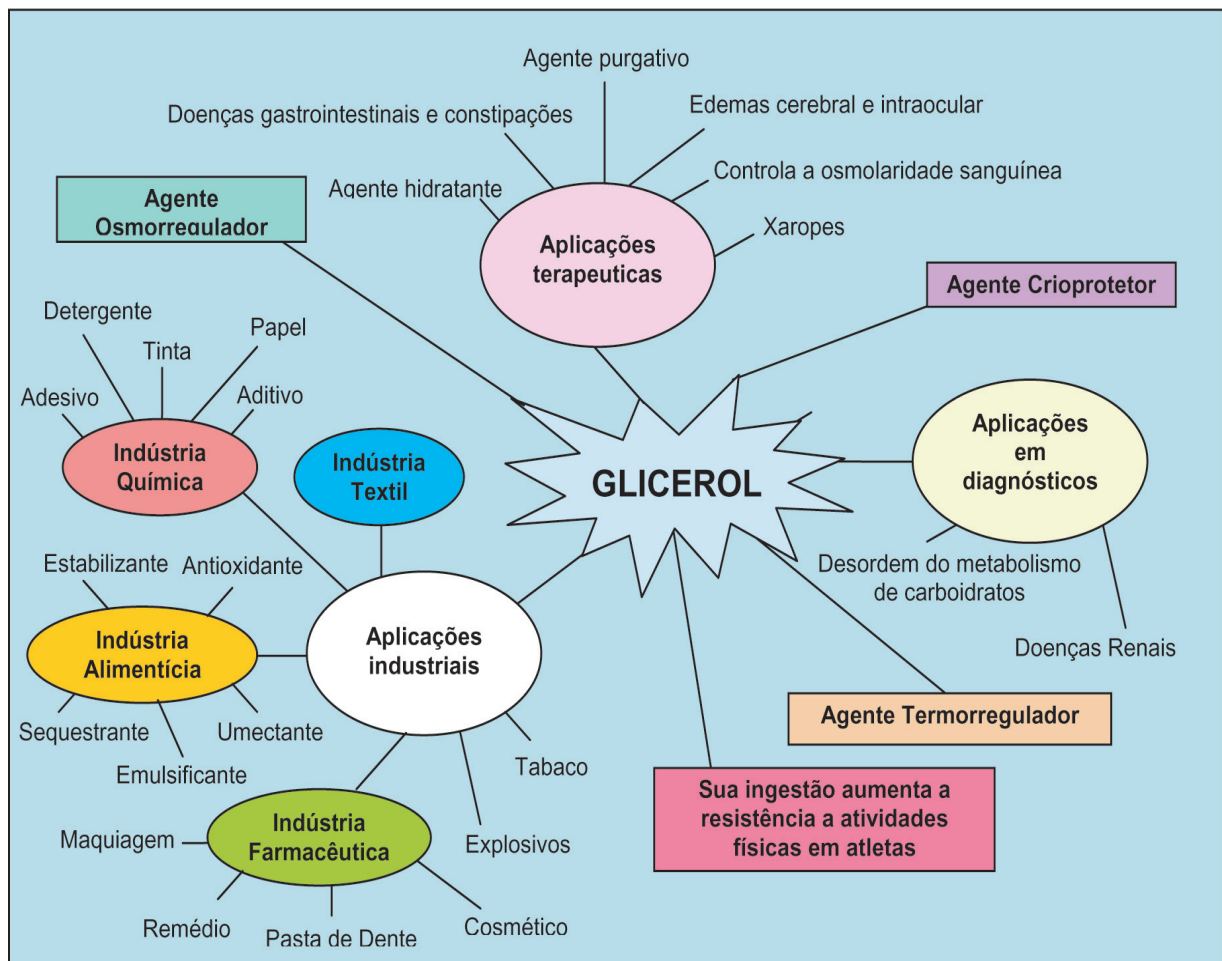


Figura 2. Principais setores industriais de utilização da glicerina.¹

As características físicas, químicas e nutricionais do glicerol bruto dependem do tipo de ácido graxo (gordura animal ou óleo vegetal) e do tipo de catálise empregada na produção de biodiesel. No entanto, a procura pela glicerina purificada é muito maior, devida ao seu valor econômico. A aplicação do glicerol na indústria está condicionada ao grau de pureza, que deve ser igual ou superior a 95%. Para obter grau de pureza superior a 95% (p/p) (grau alimentício ou farmacêutico), o glicerol deve ser submetido à destilação, mas sob custo elevado. Por outro lado, o glicerol bruto contém elementos nutricionais, como, fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio, e que são factíveis de serem utilizados por microrganismos para o seu crescimento durante processos fermentativos.¹³

O glicerol é considerado uma fonte de carbono altamente assimilável por

bactérias e leveduras sob condições aeróbicas e anaeróbicas para a obtenção de energia metabólica, como regulador do potencial redox e para a reciclagem de fosfato inorgânico dentro da célula.¹⁴ Vários estudos foram desenvolvidos visando à utilização de glicerol como fonte de carbono por microrganismos, especialmente por bactérias. Muitos deles apontam principalmente a mecanismos de assimilação de glicerol por estes microrganismos para a produção de compostos intermediários de polímeros, resinas e aditivos para combustíveis.^{7, 9, 15}

Muitos tratamentos biológicos utilizando glicerol residual vêm sendo pesquisados. Pesquisadores vêm estudando o tratamento de glicerol residual utilizando a fermentação de um óleo-degradável com um fungo *Rhodotorula mucilaginosa*.¹⁶ A conversão biológica do glicerol residual em vários outros produtos assim como butanol, lipídios, e 1,3-propanodiol, também vem sendo investigados.^{17,18}

2.2 HIDROGÊNIO

Hidrogênio (H₂) é uma fonte de combustível limpo, com alta produção de energia (122 KJ/g). Ele está sendo considerado uma fonte de combustível promissora no futuro¹⁹, pois, não produz nenhum gás de efeito estufa, água é o único bio-produto resultante de sua combustão.²⁰ Apesar de seu tremendo potencial como um combustível “limpo e verde”, atualmente 95% do hidrogênio é produzido de gás sintetizado, usando fontes não renováveis de combustível fóssil tais como o gás natural, óleo, e carvão.^{21, 22}

O maior obstáculo à utilização de hidrogênio como combustível é a sua indisponibilidade na natureza e a necessidade de encontrar métodos de produção a baixo custo. A transição de uma economia baseada nos combustíveis fósseis para uma economia do hidrogênio configura enormes desafios técnicos em nível da produção, armazenamento e distribuição do mesmo.² A carência de hidrogênio não está limitada a sua utilização como fonte energética, mas produção de certos produtos químicos, na hidrogenação de óleos e gorduras na indústria alimentar, na produção de equipamentos eletrônicos, no processamento do aço, etc. O Programa Americano de Hidrogênio estima que em 2025 a contribuição do hidrogênio para o mercado global de energia atingirá de 8 a 10% e que em 2040 haverá veículos a

hidrogênio em todos os estados americanos.⁶

Geralmente, são quatro os processos básicos para a produção do gás hidrogênio a partir de fontes primárias de energia não-fósseis: eletrólise da água; processos termoquímicos; processos radiolíticos e processos biológicos.¹⁹

As formas convencionais de produção de hidrogênio apresentam balanço energético desfavorável, uma vez que para a geração de hidrogênio via eletrólise consome-se de 4,5 a 5 kWh.m⁻³. Para gerar H₂ em eletrolizadores industriais de alta eficiência e na reforma de vapor de metano são necessárias a utilização de alta quantidade de energia para propiciar temperaturas de 970 a 1100 K e pressões superiores a 3,5 Mpa.^{23, 24}

A geração biológica de hidrogênio como um bio-produto do metabolismo de microorganismos é uma nova área de desenvolvimento tecnológico, que oferece uma produção de hidrogênio a partir de uma variedade de recursos renováveis.²⁰ A produção biológica de hidrogênio pela fermentação anaeróbica de substratos orgânicos promete ser um meio econômico e sustentável. A produção de hidrogênio por fermentação tem sido tratada com pouca atenção, comparado com a produção por microorganismos fotossintéticos que tem sido extensivamente estudada.²¹ Já, a produção de etanol a partir de microorganismos é amplamente estudada, utilizando diversas fontes como: açúcares de cana e de beterraba, amidos provenientes de grãos e biomassa lignocelulósica (um complexo de vários polissacarídeos). Os estudos da produção de hidrogênio também estão mais focados na utilização de açúcares como a glicose.⁷ Poucos estudos da produção de etanol e hidrogênio a partir do glicerol têm sido encontrados na literatura.

A obtenção de hidrogênio por via biológica pode ocorrer por meio de dois processos: fotossintético e processo fermentativos, sendo que a fermentação é tecnicamente mais simples quando comparado com os fotossintéticos e apresenta bons rendimentos tendo como vantagens altas velocidades de produção de hidrogênio, a taxa de produção é constante, diversas fontes de carbono podem ser utilizadas como matéria-prima, o crescimento dos microorganismos fermentativos é rápido, menor energia é necessária.²⁵ A dificuldade da fermentação está em selecionar culturas de microorganismos que não contenham nenhum tipo de bactéria consumidora de hidrogênio, tais como bactérias metanogênicas ou sulforedutoras.^{6,26}

Há vários tipos de microrganismos, tais como anaeróbios, aeróbios, bactérias fotossintéticas e cianobactérias que podem produzir hidrogênio. A produção de hidrogênio via fermentação anaeróbica de bactérias vem sendo estudada para um grande grupo de bactérias puras fermentativas assim como: *Clostridium*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Klebsiella pneumoniae*.²⁷⁻³⁰ Alguns pesquisadores utilizaram microrganismos anaeróbios naturais de um lodo de um digestor anaeróbico para gerar hidrogênio a partir de celulose em cultivos em batelada.³¹

O hidrogênio produzido a partir de biomassa e/ou da fração biodegradável de resíduos, para utilização como biocombustível é também denominado de bio-hidrogênio. A produção de bio-hidrogênio combinada com o tratamento de resíduos orgânicos, integra os princípios do desenvolvimento sustentável e da minimização e tratamento de resíduos, numa clara aproximação as chamadas "tecnologias verdes". Os critérios a serem levados em conta na escolha do tipo de resíduo a ser usado na produção de bio-hidrogênio são: a disponibilidade, custo, conteúdo em hidratos de carbono e biodegradabilidade. Açúcares simples como glicose, sacarose, e lactose são biodegradáveis e, portanto, são substratos preferenciais para a produção de H₂, embora de custo elevado. Efluentes de indústrias alimentares como de azeite, padarias, leite, queijo podem ser também ser usados para a produção de bio-hidrogênio. Também devem ser consideradas a seleção do inóculo, a seleção das rotas metabólicas e das populações microbianas e as condições operatórias de pH, a temperatura e a concentração do substrato. A produção de bio-hidrogênio é viável e está demonstrada, mas ainda não existe tecnologia comercialmente disponível e há várias questões práticas relacionadas com a exeqüibilidade do desenvolvimento de aplicações comerciais.⁶

Recentemente, Ito e colaboradores reportaram a produção de hidrogênio e etanol do glicerol residual utilizando uma *Enterobacter aerogeneses* HU-101.⁷ Isto é altamente atrativo, pois o H₂ pode ser aplicado em células a combustível para gerar eletricidade e aquecimento, enquanto o etanol pode ser usado cru como combustível ou ainda como suplemento para a gasolina e ainda como reagente para a produção de biodiesel ao invés de metanol. Embora *E. aerogeneses* HU-101 possa produzir H₂, CO₂, etanol, 2,3-butanodiol, 1,3-propanodiol, lactato, e succinato de vários carboidratos assim como açúcares e açúcares alcoólicos, esta bactéria produz predominantemente H₂, CO₂ e etanol a partir do glicerol.

O Brasil também vem investindo na produção biológica do hidrogênio. A empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) produziu uma nova espécie de mandioca em que o amido foi substituído por glicose. A partir desta mandioca, a Embrapa está desenvolvendo projetos para produção de etanol, biopolímeros e hidrogênio.³²

Já os pesquisadores da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (USP) em parceria com a Universidade da República (Udelar), no Uruguai, desenvolveram um projeto para obter hidrogênio por meio do tratamento das águas residuais. Essas águas são oriundas de algum tipo de processo, industrial ou residencial (como os esgotos, por exemplo), e precisam ser tratadas e devolvidas ao meio ambiente.³³

Muitos caminhos têm sido propostos para a produção de diversos produtos. A Figura 3 ilustra a rota bioquímica da fermentação do glicerol. As enzimas-chave e os genes correspondentes para a fermentação do glicerol têm sido identificados e caracterizados somente em *Citrobacter freundii* e *Klebsiella pneumoniae*. Após a entrada do glicerol na célula por difusão, este pode ser metabolizado por dois modos paralelos compreendendo quatro enzimas codificadas pelo regulon dha. O primeiro modo é a oxidação do glicerol pela glicerol desidrogenase (GDH) a dihidroxiacetona (DHA) com a geração de equivalentes redutores (NADH_2), o qual é então fosforilado pela dihidroxiacetona quinase (DHAK) e direcionado para o metabolismo central. Depois o piruvato é então convertido a acetilcoenzima A (acetil-CoA), dióxido de carbono e hidrogênio pela oxidoredutase ferredoxina pirúvico e hidrogenase. O piruvato também pode ser convertido a acetil-Coa e formato, que pode ser prontamente convertido a hidrogênio e a dióxido de carbono pelas bactérias tais como *Escherichia coli*. Acetil-Coa é finalmente convertido em acetato, butirato e etanol dependendo do microorganismo e das condições do ambiente. NADH_2 é utilizado na formação de butirato e etanol e o NADH_2 residual pode ser oxidado produzindo hidrogênio e NAD. O ATP é gerado na formação do butirato e acetato do acetil-CoA.³⁴ O segundo modo é a desidratação do glicerol a 3-hidroxi propionaldeído (3-HPA) pela glicerol desidratase (GDHt), o qual é convertido a 1,3 propanodiol pela enzima 1,3 propanodiol oxidoredutase (PDOR com a oxidação de NADH_2).^{35,36}

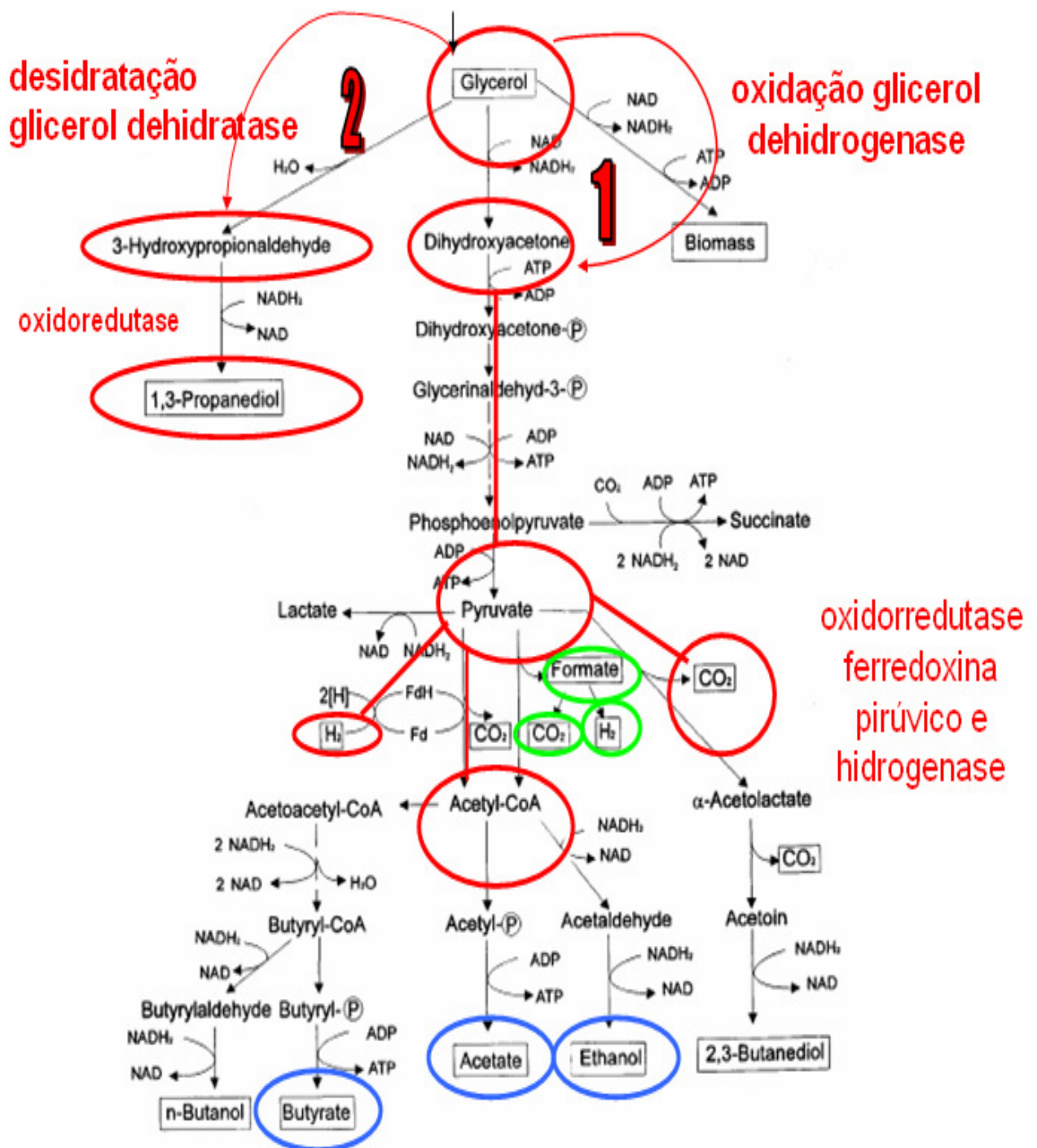


Figura 3. Rotas bioquímicas da fermentação do glicerol. ³⁷

Em 2007, Li e Fang estudaram a produção de hidrogênio utilizando resíduo de biodiesel contendo glicerol com *Klebsiella pneumoniae* DSM 2026.34 Os autores fizeram uma otimização dos componentes do meio de cultivo usando o método Plackett-Burman onde encontraram um meio que aumentou em cinco vezes a produção de hidrogênio (57,6 mL/50 mL de meio) comparado com o meio padrão (11,6 mL/50 mL de meio) após 24 horas de fermentação.

2.2.1 Aplicações do Hidrogênio

Hidrogênio é um portador de energia versátil com potencial para uso extensivo na geração de eletricidade e muitas outras aplicações. Aproximadamente metade de todo o hidrogênio produzido é usado para a produção de amônia, no qual, na maioria das vezes é utilizado para fazer fertilizantes. Fora isto, 37% é usado na refinaria de óleo para remover as impurezas ou para o aprimoramento do óleo pesado em frações mais leves e produtos de maior valor; 8% na produção de metanol e 4% numa larga variedade de químicos, metalurgia e outros. 1% da produção de hidrogênio é usado para programas espaciais. O uso de hidrogênio no futuro é provável estar no setor de transportes, onde irá ajudar a reduzir a poluição.³⁸

2.3 MICRORGANISMOS E MEIOS DE CULTURA

O sucesso de um dado processo fermentativo depende muito de uma correta definição de quatro pontos básicos: o microorganismo, o meio de cultura, a forma de condução do processo fermentativo e as etapas de recuperação do produto. Na (Figura 4) encontra-se um esquema geral de um processo fermentativo, na qual se buscou ressaltar alguns pontos essenciais. Na verdade, estes quatro pilares de um processo fermentativo interagem enormemente, sendo necessário buscar defini-los de forma conjunta, levando em consideração aspectos biológicos e econômicos, o que torna bastante complexa esta adequada definição. Para tornar clara essa idéia, pode-se mencionar que sempre se pretende empregar meios de cultura baratos, mas deve-se lembrar que o microorganismo deve encontrar neste meio, condições adequadas para realizar a conversão pretendida.³⁹

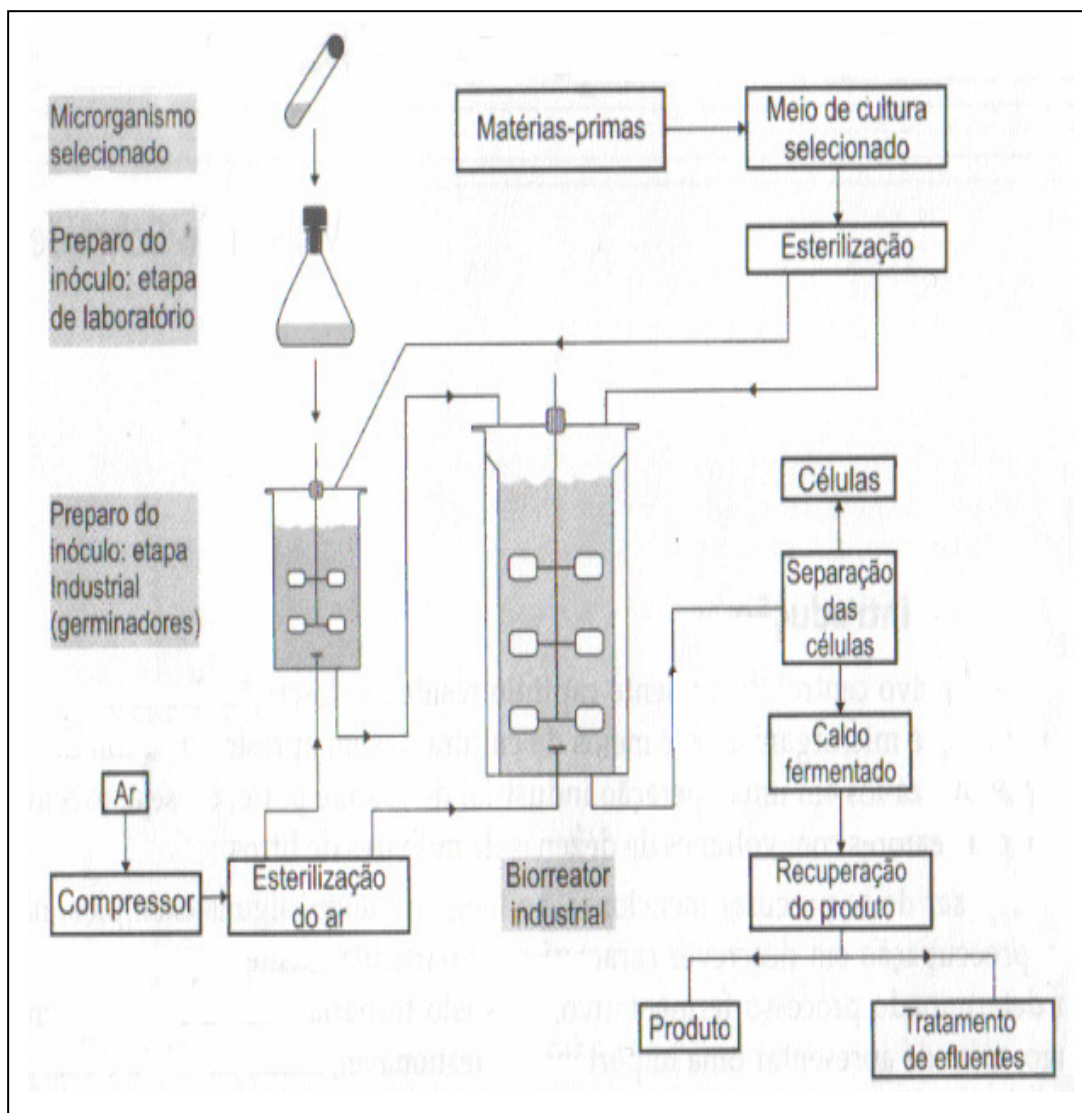


Figura 4. Esquema geral de um processo fermentativo. ³⁹

2.4 CONDIÇÕES OPERACIONAIS E FÍSICO-QUÍMICAS

A produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia depende de uma série de condições e parâmetros operacionais e físico-químicos que influenciam o processo: destacam-se o tipo de inóculo e de substrato, temperatura, presença e concentração de nitrogênio, fosfatos, íons metálicos e pH. ⁴⁰

2.4.1 Inóculo

Entende-se por inóculo a biomassa que se adiciona ao meio de fermentação (substrato e outros componentes) com objetivo de produzir um determinado composto. O efeito do inóculo é considerável, especialmente em trabalhos em escala de bancada. Segundo Kawagoshi e colaboradores, o inóculo é um dos fatores determinantes na produção de hidrogênio, pois no estudo realizado pelos referidos autores demonstrou-se que em um mesmo meio, de igual condição nutricional e concentração de substrato, houve variação na produção de hidrogênio.⁴⁰

2.4.2 Culturas Puras

Uma cultura pura é composta por um único tipo de microorganismo. Os gêneros *Clostridium*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Klebsiella pneumoniae* são os mais utilizados como inóculo para a produção de hidrogênio por via fermentativa.²⁷ As espécies do gênero *Clostridium*, são gram-positivas, em forma de bastão e estritamente anaeróbias, enquanto as espécies do gênero *Enterobacter* são gram-negativas, em forma de bastão e anaeróbias facultativas.³⁴ Muitos dos estudos realizados com estas culturas empregaram sistemas descontínuos, utilizando glicose como substrato. Contudo, a utilização de resíduos orgânicos contendo fontes de carbono, em regime contínuo, é de grande interesse tendo em vista a aplicação industrial.⁴¹

2.4.3 Culturas Mistas

Existem consórcios de bactérias em ambientes naturais, como lodos residuais, que podem ser utilizados como inóculos para a produção de hidrogênio, por via anaeróbia. Os processos de fermentação para a produção de hidrogênio utilizando culturas mistas, em comparação com os que utilizam culturas puras, são mais simples de manusear e controlar, podendo inclusive ser capaz de metabolizar uma quantidade maior de substratos. No consórcio microbiano ambiental existem

vários tipos de bactérias que produzem hidrogênio o qual pode vir a ser consumido pelas bactérias consumidoras de hidrogênio durante o processo global de fermentação, o que é uma desvantagem, pois induz a diminuição do rendimento final de produção. Uma das formas de contornar esse efeito é a aplicação de um pré-tratamento para suprimir a atividade das bactérias consumidoras de hidrogênio, preservando a viabilidade das bactérias produtoras de hidrogênio. Existem diversos tipos de tratamento para este efeito, tais como, choque térmico ou adição de compostos químicos como clorofórmio, 2 - bromoetanosulfato e isopropano. Entre estes, o mais aplicado é o choque térmico.⁴¹

2.4.4 Efeito da Presença dos Fosfatos e Íons Metálicos

A presença de fosfatos é vantajosa para a produção de hidrogênio, devido ao seu valor nutricional e à sua capacidade de efeito tampão. Foi demonstrado que um aumento da concentração de fosfatos pode aumentar a viabilidade das bactérias produtoras de hidrogênio, resultando num aumento do rendimento do processo, sendo que, concentrações muito elevadas podem conduzir a uma redução do hidrogênio produzido.^{42,43}

Em relação aos íons metálicos, estudos focaram-se sobre o Fe (II), em quantidades traço, pois, caso contrário, inibiriam a atividade das bactérias produtoras de H₂. Estes íons influenciam o processo de fermentação sendo sua presença fundamental para o metabolismo da enzima hidrogenase.^{34,41}

2.4.5 Efeito da Temperatura

A temperatura é um dos parâmetros operacionais que mais influencia o processo de fermentação para a produção de hidrogênio. O aumento da temperatura pode conduzir a um aumento da produção de hidrogênio, sendo que temperaturas muito elevadas podem conduzir a uma diminuição da viabilidade e rendimento por parte de bactérias produtoras de hidrogênio.⁴¹ A temperatura ótima para culturas puras em condições mesófilas é de 37 °C e para as termófilas 55 °C.³⁴ Para culturas mistas em regime descontínuo, a produção de etanol, ácido acético, e H₂

aumentaram com o aumento da temperatura de 20 °C para 35 °C, e diminuíram para temperaturas entre os 35 °C e 55 °C. Este comportamento pode estar relacionado a alguma alteração do metabolismo ou rota metabólica induzido por determinadas bactérias que são dominantes a certas temperaturas.

2.4.6 Importância do pH

Outro fator muito importante para o processo de produção de hidrogênio, por via biológica, é o pH, pois ele altera a atividade da enzima hidrogenase, bem como as rotas metabólicas das bactérias produtoras de hidrogênio podendo diminuir a sua concentração. Vários autores demonstraram que valores de pH entre 6 e 7 conduzem a rendimentos mais elevados em hidrogênio.⁴¹

2.5 FONTES DE MICRORGANISMOS DE INTERESSE

Microrganismos que possam ter interesse podem ser obtidos das seguintes formas: isolamento a partir de recursos naturais; compra em coleções de culturas; obtenção de mutantes naturais e obtenção de microrganismos recombinantes por técnica de engenharia genética. O isolamento de microrganismos a partir de recursos naturais, tais como solo, água, plantas etc., sempre foi uma atividade de grande importância para a obtenção de novas linhagens de interesse industrial.

Trata-se de uma atividade que envolve muito trabalho experimental, porém pode conduzir ao isolamento de linhagens melhor produtoras de um dado produto.³⁹

A compra de coleções de culturas é bastante viável, tendo em vista a existência de muitas coleções em vários países, destacando-se a “Agricultural Research Service Culture Collection” (EUA), também conhecido como “NRRL Culture Collection” e a Coleção de Culturas Tropical (Campinas-SP). O contato com estas coleções é muito facilitado, podendo-se utilizar os recursos da internet para tal tarefa.³⁹

Quando uma dada célula se prolifera, há sempre uma pequena possibilidade de surgimento de mutantes naturais. Os quais podem ser isolados e ensaiados objetivando a verificação de sua potencialidade de produção. As técnicas de

engenharia genética também designada tecnologia de DNA recombinante, trouxeram um imenso avanço nas possibilidades de se obter células mais produtivas, ou células produtoras de substâncias que normalmente não produzem.³⁹

2.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS

O planejamento experimental é baseado em princípios estatísticos onde os pesquisadores podem extrair do sistema em estudo o máximo de informações úteis, fazendo um número mínimo de experimentos. Os métodos utilizados são ferramentas poderosas com os quais vários objetivos específicos podem ser alcançados. Podem-se fabricar produtos com melhores características, diminuir o tempo de seu desenvolvimento, aumentar a produtividade de processos, minimizar a sensibilidade de produtos as variações de condições ambientais e assim por diante.⁴⁴

No desenvolvimento de produtos e processos é muito comum os pesquisadores listarem um grande número de variáveis a serem avaliadas. Acima de 8 variáveis a metodologia desenvolvida em 1946 por Plackett & Burman, se bem utilizada, é muito valiosa para uma seleção prévia das variáveis.⁴⁵

A metodologia do planejamento fatorial fracionário, associada à análise de superfície de resposta, é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativas e erro.⁴⁵

A metodologia de superfície de resposta (MSR) é uma importante ferramenta no processo e na obtenção de um produto. É uma coleção de dados experimentais e técnicas de otimização que permitem ao experimentador determinar a relação entre a resposta e as variáveis independentes.⁴⁶

Atualmente, a MRS tem sido amplamente aplicada para diferentes propósitos em processos químicos e bioquímicos.⁴⁷ Os métodos utilizados independem da natureza do problema a que são aplicados. Eles servem para estudar reações químicas, sistemas biológicos, processos mecânicos e também varrer todas as possíveis escalas de interesse, desde uma reação em bancada até um processo industrial operando em larga escala.⁴⁴ Geralmente esses métodos são aplicados em

sequência, exatamente na ordem aqui descrita. A aplicação sequencial dos mesmos implica em obtenção dos melhores resultados de um para a execução do outro, isto é, os melhores resultados do planejamento do método Plackett & Burman são aplicados no método fatorial fracionário e os melhores resultados deste são aplicados no método de superfície de resposta, gerando a validação ou não do método.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral: selecionar bactérias capazes de degradar glicerol da síntese de biodiesel, e ter como produtos a formação de hidrogênio e etanol.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar, em bioreatores submersos, um consórcio microbiano ambiental (lodo) proveniente de um digestor anaeróbio de fluxo ascendente (UASB) quanto a capacidade de degradação do glicerol da síntese de biodiesel;
- Isolamento, seleção e identificação de microrganismos presentes no lodo que utilizaram o glicerol como fonte de carbono para produção de hidrogênio e etanol;
- Estudo em bioreatores submersos, da produção de hidrogênio e etanol, com o microorganismo (isolado) que apresentou capacidade de degradar o subproduto glicerol.
- Otimização das condições de cultivo em batelada em agitador orbital (*shaker*) para a produção de hidrogênio, utilizando planejamento experimental;
- Estudos em batelada com diferentes métodos de pré-tratamento do consórcio microbiano ambiental (lodo) para avaliar o enriquecimento da produção de hidrogênio utilizando o glicerol, subproduto do biodiesel, como substrato.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 INSTALAÇÕES

Os experimentos biotecnológicos foram realizados no laboratório de Biotecnologia no Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos (ICTA/UFRGS). As análises por cromatografia a líquido foram realizadas no laboratório de Cromatografia da Engenharia Química e do Centro de Combustíveis (CECOM), localizados na Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As análises do gás produzido foram realizadas no laboratório de cromatografia gasosa da Empresa Braskem, localizada no Pólo Petroquímico em Triunfo-RS.

4.2 OBTENÇÕES DO LODO E DO GLICEROL

O glicerol proveniente da síntese química da produção do biodiesel a partir do óleo de soja foi gentilmente cedido de uma empresa produtora de biodiesel localizada em Passo Fundo, RS, Brasil. Este resíduo tem a seguinte composição: 82,82 % de glicerol, 5,91 % de NaCl, 5,50 % cinzas, 11,20 % umidade e pH 4,84 . O lodo (consórcio microbiano) foi obtido de uma estação de tratamento de efluentes, da parte inferior de um reator UASB de uma empresa de Porto Alegre (Solae Company, Brasil), o qual foi coletado em frascos “Duran” de 2 L e mantido refrigerado a 4 °C . As coletas foram realizadas conforme a necessidade dos experimentos, sendo o mesmo armazenado em geladeira por no máximo 30 dias.

4.3 MANUTENÇÃO DAS CULTURAS DOS MICRORGANISMOS

Todos os microrganismos utilizados neste estudo foram mantidos em placas de Petri (Bioplast, Brasil), em meio LB (Luria Bertani) e armazenadas em refrigerador a 4 °C por períodos de 30 dias. As colônias foram transferidas de uma placa para outra mensalmente, de modo a assegurar a inocuidade e a capacidade metabólica das cepas para os ensaios de fermentações em agitador orbital e em bioreator. Uma cultura de cada isolado foi conservada em glicerol a - 18 °C.

4.4 CONTROLE DE CONTAMINAÇÕES

Durante as coletas de amostras de todos os experimentos eram realizados ensaios de coloração de Gram com posterior inspeção microscópica que objetivava averiguar a inocuidade do sistema (risco de contaminação).

4.5 SELEÇÃO E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE HIDROGÊNIO

Vários trabalhos publicados citam a utilização de lodo de tratamentos domésticos ou industriais como substrato para a produção fermentativa de hidrogênio e subprodutos, como etanol e ácidos [20, 35, 49]. A partir desta informação a primeira etapa do trabalho teve como objetivo avaliar o lodo (consórcio microbiano ambiental), quanto à capacidade de degradação do glicerol, bem como selecionar microorganismos com potencial de produção de hidrogênio e etanol provenientes do consórcio microbiano ambiental.

Os ensaios foram realizados em bioreatores submersos (Figura 5), de 2 L (Biostat B model, B. Braun Biotech International, Alemanha) com 70 g.L⁻¹ de glicerol residual (grau de pureza 82,82 %).



Figura 5. Bioreator submerso de 2 L (Biostat B model, B. Braun Biotech

International, Alemanha)

Um experimento controle com glicerol comercial (grau de pureza > 95 %) foi realizado nas mesmas condições. Os reatores foram inoculados com 10 % do volume do bioreator (200 mL) de consórcio microbiano ambiental, previamente tratado (20 min. a 90 °C). As condições de operação foram: temperatura de 35 °C, pH 7,0 e 250 rpm. Os bioreatores foram operados em anaerobiose com um “start” de nitrogênio de 30 minutos antes de serem inoculados. O meio de cultivo utilizado continha (g.L⁻¹): 70 glicerol; 4 (NH₄)₂SO₄; 0,01 MnSO₄.H₂O; 0,12 MgSO₄. 7H₂O; 0,125 K₂HPO₄; 0,025 FeSO₄.7H₂O; 0,005 CuSO₄.5H₂O; 0,125 CoCl₂. 6H₂O. As amostras foram coletadas dos bioreatores em intervalos de 3 em 3 horas e diluídas, em série, em 0,1 % de água estéril peptonada, e 0,1 mL foram espalhados em placas contendo ágar nutriente e em ágar McConkey, sendo logo após incubados a 35 °C, sob condições aeróbicas. Para cada diluição foram feitas placas em triplicata. Após a incubação de 24/48 h, as colônias crescidas foram contadas. O resultado foi expresso em unidades formadoras de colônias por volume de amostra (UFC/mL). O número de unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro de amostra analisada determina quantos microrganismos foram capazes de se reproduzir, formando colônias, num dado meio de cultura. Logo após, foram caracterizadas detalhadamente quanto a: cor; forma; elevação; superfície e borda. As morfologias celulares foram determinadas por microscópio óptico e preparadas por coloração de gram.

4.6 FERMENTAÇÃO EM AGITADOR ORBITAL COM AS BACTÉRIAS ISOLADAS

A partir do experimento descrito no item 3.5 foram realizados experimentos aeróbicos e anaeróbicos em agitador orbital (shaker), (Marconi, MA 830) com as 32 bactérias isoladas do consórcio microbiano para verificar quais tinham a capacidade de degradar o glicerol residual e formar bioprodutos.

Os ensaios foram conduzidos em triplicata. O meio utilizado para a fermentação em agitador orbital continha: (g.L⁻¹): 4 (NH₄)₂SO₄, 0,52 K₂HPO₄, 0,25 KH₂PO₄, 0,2 MgSO₄.7H₂O, 1,5 extrato de levedura, 1 peptona bacteriológica, 1 mL de solução contendo elementos traço, 30 glicerol residual . A solução

contendo elementos traço foi composta por (g.L⁻¹): 0,1 MnCl₂. 4 H₂O; 0,06 H₃BO₃; 0,0037 CuSO₄. 5H₂O; 0,2 CoCl₂. 6 H₂O; 0,025 NiCl₂.6 H₂O; 0,035 Na₂MoO₄. 2 H₂O; 0,14 ZnSO₄ 7H₂O; 0,9 mL HCl 37 %. A composição da solução traço foi a mesma para todos os experimentos.

O pré-inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio, os quais, foram inoculados e incubados a 35 °C e 150 rpm, “overnight”, para preparo dos inóculos.

Os experimentos aeróbios foram realizados em Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de meio de cultura. Os cultivos anaeróbios foram realizados em frascos de penicilina hermeticamente lacrados de 60 mL de volume com 30 mL de meio de cultura. As bactérias foram inoculadas a 5 % (v/v) com uma seringa hipodérmica, logo após, os frascos, foram fechados com tampas de borracha e lacrados com selos de alumínio. Para garantir as condições anaeróbicas, o meio utilizado (o mesmo descrito acima) foi pré-aquecido durante 20 minutos, esfriado a temperatura ambiente e borbulhado com nitrogênio.

4.7 IDENTIFICAÇÃO DOS MICROORGANISMOS

O seqüenciamento das amostras foi realizado no Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o seqüenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os DNAs-molde (30 a 45 ng) foram marcados utilizando-se 3,2 pmol do primer 5'-NNNNNNNNNNNN-3' e 2 µL do reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 seg, 55 °C por 5 seg e 60 °C por 4 min. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol e lavagem com etanol 60 %. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida, desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no seqüenciador automático. Os dados de seqüenciamento foram coletados utilizando-se o programa Data Collection v1. 0.1 (Applied Biosystems) com os parâmetros Dye Set “Z”; Mobility File

“DT3100POP6{BDv3}v1. mob”; BioLIMS Project “3100_Project1”; Run Module 1 “StdSeq50_POP6_50cm_cfv_100”; e Analysis Module 1 “BC-100SR_Seq_FASTA.saz”.

4.8 ENSAIOS EM BIOREADORES UTILIZANDO MICROORGANISMO ISOLADO

As fermentações foram realizadas em bioreatores de cultivo submerso contendo 2 L de meio, (1800 mL de meio e 200 mL de inóculo padronizado com DO = 1) sob condições anaeróbias e aeróbias para o isolado 1. Os fermentadores foram equipados com eletrodo de oxigênio dissolvido, termopar, agitador e pH metro. Os cultivos realizados foram mantidos a temperatura de 37 °C, pH 7,0 e 1 vvm (volume de ar por minuto) agitação de 200 e 300 rpm (rotações por minuto) para a condição anaeróbia e aeróbia, respectivamente. O tempo de cultivo foi de 35 horas e as amostras foram retiradas em intervalos de 3 em 3 horas durante as 24 horas iniciais. A composição do meio utilizado foi à mesma do experimento realizado em agitador orbital, descrito anteriormente. Todos os experimentos foram feitos em duplicata. A concentração de glicerol restante e dos subprodutos formados foi determinada através de análise cromatográfica.

4.9 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL “PLACKETT-BURMAN”(P-B)

A influência dos principais componentes do meio de cultivo para a produção de hidrogênio foi avaliada em ensaios utilizando agitador orbital conforme descritos no item 3.6 para cultivo anaeróbio.

Para determinar quais nutrientes e condições de operação que apresentaram efeito significativo na produção do hidrogênio para o isolado 1, um planejamento experimental do tipo Plackett-Burman foi realizado. Neste estudo,

onze variáveis (X_1 : glicerol; X_2 : pH inicial; X_3 : temperatura; X_4 : extrato de levedura; X_5 : peptona; X_6 : NH_4Cl ; X_7 : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; X_8 : KH_2PO_4 ; X_9 : K_2HPO_4 ; X_{10} : $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; X_{11} : $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foram selecionadas em 20 experimentos e 4 repetições no ponto central. A matriz do planejamento, com as respectivas concentrações, temperaturas e pH estão apresentados na Tabela I. Cada variável é representada em dois níveis, denominada de alto nível, (+1), baixo nível (-1) e ponto central (0). A produção de hidrogênio após 24 horas foi dada como resposta. Variáveis com níveis maiores de 95 % de confiança foram consideradas significativas na produção do hidrogênio. Os critérios empregados para a escolha das variáveis e seus respectivos valores foi através de estudos prévios na literatura.

Tabela I. Níveis das variáveis, utilizadas no planejamento experimental Plackett-Burman para avaliação dos nutrientes e condições de operação na produção de hidrogênio realizado em agitador orbital.

Parâmetros	Símbolo	Baixo nível	Ponto central	Alto nível
		(-1)	(0)	(+1)
Glicerol (g.L^{-1})	X_1	5	20	35
pH	X_2	4	6	8
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	X_3	25	31	37
E.levedura (g.L^{-1})	X_4	0	2,5	5
Peptona (g.L^{-1})	X_5	0	2,5	5
NH_4Cl (g.L^{-1})	X_6	0	2,5	5
NH_4SO_4 (g.L^{-1})	X_7	0	2,5	5
KH_2PO_4 (g.L^{-1})	X_8	0	1,5	3
K_2HPO_4 (g.L^{-1})	X_9	0	1,5	3
$\text{FESO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g.L^{-1})	X_{10}	0	0,05	0,1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g.L^{-1})	X_{11}	0	0,1	0,2

4.10 PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO

A partir dos resultados obtidos com o primeiro planejamento experimental Plackett-Burman, foi realizado um segundo planejamento do tipo fatorial fracionário com as nove variáveis que tiveram efeito significativo na produção do hidrogênio. Seis destas variáveis foram consideradas para o experimento fatorial fracionário e são listadas na Tabela II. As outras três variáveis foram fixadas nos seus melhores valores. De acordo com o conceito de experimento fatorial fracionário de dois níveis, uma matriz com seis variáveis (2^6) seria baseada em 64 experimentos, fato que se torna impraticável. Então, foi adotado um experimento fatorial fracionário 2^{6-2} com resolução IV que reduziu o número de experimentos para 16. A Tabela II mostra a matriz do experimento com as seis variáveis utilizadas para avaliar os efeitos na produção do hidrogênio.

Tabela II. Níveis das variáveis, utilizadas no planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} para avaliação dos nutrientes e condições de operação sobre a produção de hidrogênio realizado em agitador orbital.

Parâmetros	Símbolo	Baixo nível	Ponto central	Alto nível
		(-1)	(0)	(+1)
Glicerol (g.L ⁻¹)	X ₁	30	40	50
pH	X ₂	7	8	9
Temperatura (°C)	X ₃	31	34	37
E.levedura (g.L ⁻¹)	X ₄	3	5	7
KH ₂ PO ₄ (g.L ⁻¹)	X ₅	1	3	5
K ₂ HPO ₄ (g.L ⁻¹)	X ₆	1	3	5

4.11 MÉTODO DO CAMINHO DE ASCENDÊNCIA MÁXIMA

O método do caminho de ascendência máxima é um procedimento realizado no planejamento de experimentos com o intuito de buscar novas regiões de estudo das variáveis independentes estudadas. Esta busca é realizada seqüencialmente ao longo de um caminho de ascendência, na direção do máximo aumento da resposta.⁴⁹ Neste trabalho, este método foi usado para verificar se existia uma melhor região de estudo das variáveis: temperatura e K_2HPO_4 . Para delinear estes experimentos, foi calculada a razão entre o valor do coeficiente linear da temperatura e o coeficiente linear da K_2HPO_4 , ambos obtidos no planejamento fatorial fracionário, obtendo-se assim uma série de 5 experimentos. A Tabela III representa o planejamento experimental do caminho de ascendência máxima com 5 ensaios com seus respectivos valores de temperatura e K_2HPO_4 . Foram fixados os seguintes componentes do meio: glicerol (30 g.L^{-1}); pH 9,0 e extrato de levedura (3 g.L^{-1})

Tabela III. Delineamento dado caminho de ascendência máxima com 5 ensaios e seus respectivos valores de temperatura e K_2HPO_4 .

Ensaio	Temperatura (°C)	K_2HPO_4 (g.L^{-1})
1	37	3
2	41	4
3	45	5
4	49	6
5	53	7

4.12 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR)

A otimização das condições de cultivo, selecionadas pelo delineamento P-B, e para maximizar a produção de hidrogênio foi determinada com um DCCR.

Foi realizado um fatorial completo 2^3 , incluindo os 6 pontos axiais e 4 repetições no ponto central, totalizando 18 ensaios. A Tabela IV apresenta as variáveis codificadas utilizadas no planejamento para a produção de hidrogênio (H_2) em % mol. Foram fixados os seguintes componentes do meio: glicerol (30 g.L^{-1}); pH 9,0 e extrato de levedura (3 g.L^{-1})

Tabela IV. Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional com seus respectivos valores codificados e variáveis reais utilizadas para a produção de hidrogênio (% mol) realizado em agitador orbital.

Variáveis ^a /níveis ^b			
Ensaio	X ₁ (Temperatura)	X ₂ (K ₂ HPO ₄)	X ₃ (KH ₂ PO ₄)
1	(37) – 1	(2,2) – 1	(2,2) – 1
2	(37) – 1	(2,2) – 1	(5,8) + 1
3	(37) – 1	(5,8) + 1	(2,2) – 1
4	(37) – 1	(5,8) + 1	(5,8) + 1
5	(45) + 1	(2,2) – 1	(2,2) – 1
6	(45) + 1	(2,2) – 1	(5,8) + 1
7	(45) + 1	(5,8) + 1	(2,2) – 1
8	(45) + 1	(5,8) + 1	(5,8) + 1
9	(35) – 1,68	(4) 0	(4) 0
10	(47) + 1,68	(4) 0	(4) 0
11	(41) 0	(1) – 1,68	(4) 0
12	(41) 0	(5,8) + 1,68	(4) 0
13	(41) 0	(4) 0	(1) – 1,68
14	(41) 0	(4) 0	(5,8) + 1,68
15	(41) 0	(4) 0	(4) 0
16	(41) 0	(4) 0	(4) 0
17	(41) 0	(4) 0	(4) 0
18	(41) 0	(4) 0	(4) 0

^a X₁ – Temperatura em (°C); X₂ – K₂HPO₄ em (g.L⁻¹); X₃ – KH₂PO₄ em (g.L⁻¹)

^b (+) alto nível; (–) baixo nível; (0) ponto central.

A equação (1) polinomial de segunda ordem para as variáveis estudadas está apresentada a seguir:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum \beta_{ii} x_i^2 \quad (1)$$

Onde Y representa a resposta, β_0 a constante, β_i o coeficiente do efeito linear, β_{ii} o coeficiente do efeito quadrático, β_{ij} o coeficiente da interação dos efeitos, x_i e x_j o nível codificado da variável X_i e X_j . A equação quadrática (1) foi usada para grafar as superfícies de resposta para as variáveis.

As variáveis testadas foram codificadas de acordo com a seguinte equação:

$$x_i = \left(\frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \right) \quad (2)$$

Onde x_i é o valor codificado e X_i é o valor real da variável independente, X_0 é o valor real do ponto central e ΔX_i é o valor da diferença entre os pontos.

4.13 ESTUDOS COMPARATIVOS DE DIFERENTES MÉTODOS DE PRÉ-TRATAMENTOS PARA O ENRIQUECIMENTO DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO ATRAVÉS DO CONSÓRCIO MICROBIANO

A produção de hidrogênio por bactérias presentes em resíduos orgânicos com capacidade de produzir o gás hidrogênio, não somente trata o resíduo orgânico, como também gera um combustível limpo. Os processos que usam culturas mistas são mais práticos do que aqueles que usam culturas puras, porque são mais fáceis de controlar e operar.²⁰ O objetivo deste experimento foi comparar cinco métodos de pré-tratamento (térmico, congelamento, dessecação, ácido e base) em testes em batelada a 35 °C com pH inicial 7,0 utilizando o subproduto glicerol como substrato, com o propósito de obter o melhor método de pré-tratamento para o enriquecimento da produção de hidrogênio pelas bactérias presentes no consórcio microbiano ambiental (lodo).

4.13.1 Pré-Tratamento

O lodo utilizado foi o mesmo utilizado nos experimentos em bioreator. Antes de começar os experimentos com o lodo foi realizada uma pré-aclimatização deixando em agitador orbital a 35 °C durante 24 horas. Foi feito um experimento controle utilizando o lodo da maneira que foi coletado. O pré-tratamento térmico foi conduzido fervendo o lodo a 100 °C durante 15 minutos; o pré-tratamento congelamento foi executado mantendo o lodo a -10 °C durante 24 horas, seguido após o descongelamento e manutenção do mesmo a 30 °C durante 6 horas; o pré-tratamento dessecação foi realizado colocando o lodo por 2 horas em estufa a 105 °C e armazenamento em dessecador por 2 horas; o pré-tratamento ácido foi executado ajustando o lodo a pH 3,0 utilizando HCl 1M durante 24 horas; o pré-tratamento básico foi realizado ajustando o lodo em pH 10,0 utilizando NaOH 1M durante 24 horas.

4.13.2 Procedimento Experimental

Os experimentos em batelada foram realizados em duplicata em frascos de penicilina hermeticamente lacrados de 60 mL de volume com 30 mL de meio de cultura. O meio utilizado para a fermentação em agitador orbital continha em (g.L⁻¹): 4(NH₄)₂SO₄; 0,125 K₂HPO₄; 0,12 MgSO₄.7H₂O; 0,01 MnSO₄.H₂O; 0,025 FeSO₄.7H₂O; 0,005 CuSO₄.5H₂O; 0,125 CoCl₂. 6 H₂O; 30 glicerol; 1 mL de solução contendo elementos traço. Para manter a capacidade tamponante foi adicionado 8 g.L⁻¹ de NaHCO₃ ao meio. O lodo foi inoculado a 10 % (3 mL) e o pH inicial foi ajustado a 7,0 com solução HCl 1M ou NaOH 1M. Em cada frasco foi adicionado fluxo de gás nitrogênio por 1 minuto para garantir condições de ausência de oxigênio. Após os frascos foram fechados com tampas de borracha e selados com lacre de alumínio, sendo colocados em agitador orbital a 35 °C e 120 rpm. Foram confeccionados 8 frascos para cada experimento, em duplicata, e coletados nos seguintes tempo de cultivo 0, 6, 10, 12, 14, 18, 24 e 36 horas. O gás H₂ formado foi analisado por cromatografia gasosa.

4.14 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.14.1 Determinação da Biomassa dos Produtos Formados

Para determinação da biomassa ou massa de células secas, (MS g.L⁻¹), amostras de 10 mL de caldo fermentativo foram centrifugadas em centrífuga Modelo 4R 15, marca Sigma a 3500 g por 15 min a 4 °C. As amostras centrifugadas foram lavadas com água destilada e seca em tubos plásticos previamente pesados a 80 °C até atingir peso constante em estufa a vácuo (Fanem 315 SE).

O sobrenadante resultante foi utilizado para estimar a concentração dos produtos líquidos formados bem como a degradação do glicerol. Este foi filtrado em membrana de acetato de celulose (Sartorius-Germany) de 0,22 µm de diâmetro de poro, sendo mantidos em freezer a – 4 °C em ependorfs de 2 mL.

4.14.2 Análises Cromatográficas

A análise dos produtos formados foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando um equipamento Shimadzu equipado com uma coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) na temperatura de 65 °C, detector de índice de refração e fase móvel constituída de ácido sulfúrico 0,005 M (0,8 mL/min). Para a aquisição dos dados foi utilizado o sistema “Lc Solution”.

As análises do gás hidrogênio (H₂) foram realizadas num cromatógrafo Agilent modelo 6890N equipado com detector de condutividade térmica e válvula de injeção para gases de 10 vias, configurada com reversão de fluxo. A coluna utilizada foi uma Poropak Q, 80 a 100 mesh, em aço inoxidável com 6 pés de comprimento e 1/8” de diâmetro externo, nas seguintes condições de análise: Temperatura do forno: 80 °C (isotérmico); temperatura da válvula (valve box): 60 °C ; Temperatura do detector: 150 °C; Fluxo na coluna (N₂): 18 mL/min; Fluxo do gás de referência (N₂): 18 mL/min. Para a aquisição dos dados foi utilizado o sistema “TotalChrom Client/Server”. As amostras foram coletadas em ampolas de vidro (Figura 6), confeccionadas e adaptadas para a coleta do gás na saída do condensador do bioreator.



Figura 6. Ampola utilizada para coleta do gás produzido no bioretor.

4.14.3 Determinação da Densidade Óptica (DO)

A avaliação da turbidez de uma cultura microbiana constitui um método rápido de estimar a concentração celular. Um feixe de luz focado numa suspensão microbiana é parcialmente desviado (dispersão da luz) pelas células, e a percentagem de luz não desviada (transmitância, T) é medida por recurso a um espectrofotômetro. Este método é utilizado para acompanhar o crescimento microbiano com base no aumento da DO medida a um comprimento de onda particular⁴⁰. Todos os inóculos foram padronizados em DO = 1.

A medida de DO de células foi realizada num espectrofotômetro (Modelo Ultraspec 3100 pro, marca Amersham Biosciences) a 600 nm.

4.14.4 Determinação do pH

O pH das amostras foi determinado em pHmetro (PHTEK, PHS 3B) com eletrodo de vidro combinado e padrões de pH 4 e 7.

4.14.5 Determinação dos Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)

Os sólidos suspensos voláteis (SSV) foi determinado de acordo com “Standard Methods for Examination of Water and Waster and Wastewater”.⁵⁰

Os SSV são determinados pela diferença dos valores obtidos pelos sólidos suspensos totais (SST) e dos sólidos suspensos fixos (SSF) em mg.L^{-1} . SST é a matéria que fica retida após a passagem de um volume de amostra por um filtro de fibra de vidro (material que não perde peso a temperatura de $550\text{ }^{\circ}\text{C}$) a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$. Já o SSF é a matéria que permanece retida no filtro após uma ignição do mesmo a uma temperatura de $550\text{ }^{\circ}\text{C}$. O procedimento experimental consistiu em colocar um cadinho de porcelana juntamente com filtro (micro filtro fibra de vidro GH 30 – AH φ $47 \pm 0,5$ mm) em estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora. Depois foi colocado em dessecador durante 20 minutos e o conjunto (cadinho + filtro) foi pesado em balança analítica obtendo-se a massa (M_1). Após, 10 mL de lodo foi filtrado em aparelho de filtração através do filtro de fibra de vidro utilizando vácuo, em seguida o filtro foi colocado novamente no cadinho e na estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ por mais 1 hora, pesou-se novamente e obteve-se a M_2 . Por último colocou-se o filtro e o cadinho em uma mufla a $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. Logo após ter esfriado pesou-se novamente o conjunto e obteve-se a M_3 . Os sólidos suspensos voláteis foi o que evaporou do filtro. O cálculo foi realizado conforme a equação (3).

Equação (3):

$$\text{SSV} = \text{SST} - \text{SSF} \quad (\text{mg/L});$$

onde SSV= sólidos suspensos voláteis,

SST= sólidos suspensos totais; SSF= sólidos suspensos fixos

$\text{SST} = (M_2 - M_1) / \text{volume da amostra}$ e $\text{SSF} = (M_3 - M_1) / \text{volume da amostra}$; $M = \text{massa}$

4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O software Statistica 7.0 (Statsoft, USA) foi usado para análises gráficas e de regressão dos dados. A análise estatística do modelo foi realizada pela análise de variância (ANOVA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DEGRADAÇÃO DO GLICEROL

Os ensaios realizados em bioreator com consórcio microbiano ambiental tiveram bons resultados em relação à utilização do glicerol comercial e residual. A (Figura 7) e (Figura 8) mostram os cultivos realizados com glicerol comercial e residual, respectivamente. De acordo com a (Figura 7), pode-se observar o consumo total do glicerol comercial em 32 horas, onde a produção máxima de 1,3 - propanodiol foi de $22,84 \text{ g.L}^{-1}$. Para o cultivo com glicerol residual (Figura 8), a produção do 1,3-propanodiol foi um pouco menor, $19,92 \text{ g.L}^{-1}$, com um consumo total de glicerol. Também foi verificado em ambos os cultivos a produção de ácidos em pequenas quantidades durante a fermentação. Estes ácidos estão relacionados com os bioprodutos de fermentação das bactérias existentes no consórcio microbiano. Enterobactérias, como *Klebsiella pneumoniae* e *Citrobacter freundii* tem como principais bioprodutos o ácido acético e o etanol. Já a espécie *Clostridium* é conhecida por formar somente ácido butírico como bioproduto, indicando que o consórcio microbiano utilizado neste trabalho continha ambas as espécies citadas.

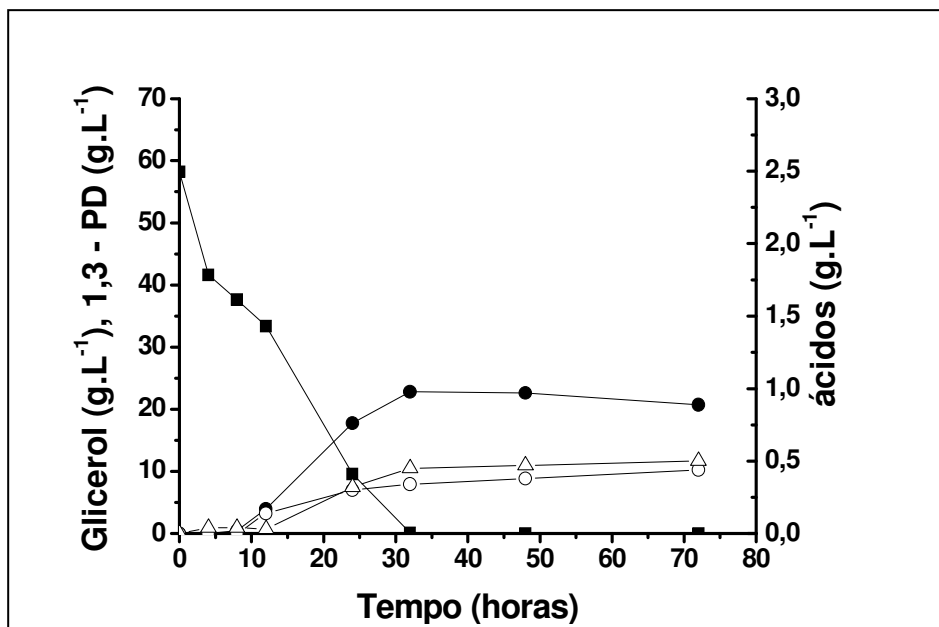


Figura 7. Degradação do glicerol comercial, produção de ácidos e de 1,3-propanodiol em cultivo anaeróbico realizado em bioreator no período de 72 horas, empregando consórcio microbiano ambiental: (■) glicerol comercial, (●) 1,3 - propanodiol, (○) ácido acético e (Δ) ácido butírico. 1,3-PD= 1,3-propanodiol.

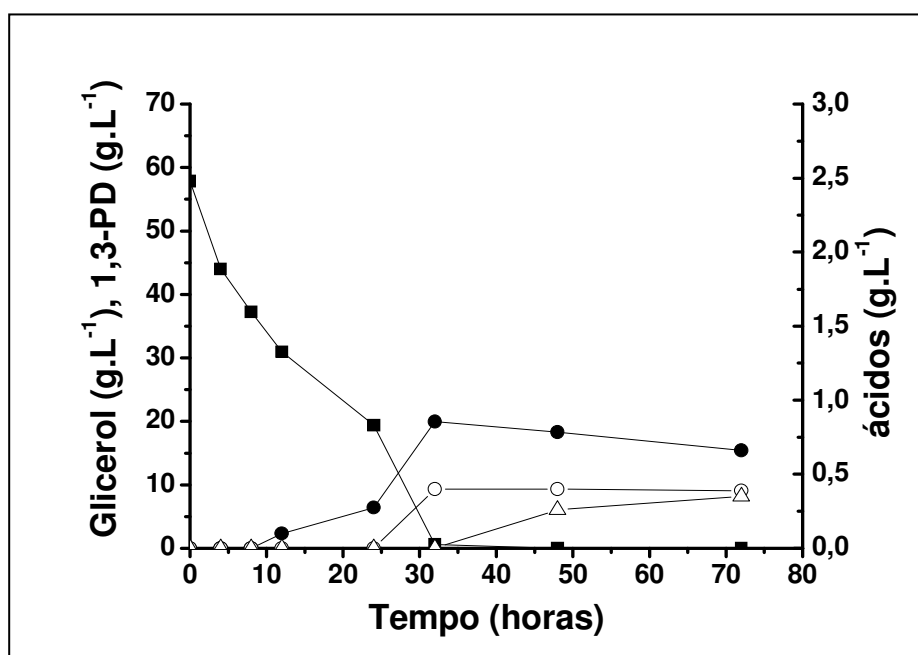


Figura 8. Degradação do glicerol residual, produção de ácidos e de 1,3-propanodiol em cultivo anaeróbico realizado em bioreator no período de 72 horas, empregando consórcio microbiano ambiental: (■) glicerol residual, (●) 1,3 - propanodiol, (○) ácido acético e (Δ) ácido butírico. 1,3PD= 1,3-propanodiol.

Após 24 horas de cultivo, foi determinada a produção de hidrogênio, através da coleta de amostra do gás produzido pelo bioreator, utilizando glicerol residual. A análise revelou uma produção de 0,3 % mol de hidrogênio.

Um consórcio microbiano é uma complexa população de espécies diferentes de microorganismos que atuam juntos em uma comunidade. Em um consórcio microbiano podem se encontrar organismos com diferentes capacidades metabólicas. Isto inclui organismos que são proteolíticos (capazes de degradar proteínas e aminoácidos) organismos que são sacarolíticos (capazes de degradar vários açúcares); organismos que são lipolíticos (capazes de digerir lipídios ou gorduras); e organismos que tem capacidade de degradar celulose.⁴¹ Estas diferentes capacidades metabólicas permitem que o consórcio trabalhe junto na degradação de uma variedade de resíduos. Muitos pesquisadores têm utilizado consórcio microbiano para a produção de hidrogênio a partir de várias fontes de carbono como, por exemplo, sacarose, celulose, glicose, etc.^{41, 51,52} O trabalho de Ito e colaboradores foi o único encontrado na literatura que utilizou glicerol de biodiesel para produzir hidrogênio e álcool etílico, fazendo uso de uma *Enterobacter aerogenes* HU-101, cujos resultados foram superiores ao encontrado no presente trabalho.⁷ Este fato motivou o isolamento de microorganismos do consórcio microbiano do presente trabalho, de modo a obter uma cepa de melhor capacidade de degradação do glicerol e conseqüentemente maior produção de hidrogênio e etanol.

5.2 SELEÇÃO E ISOLAMENTO DOS MICROORGANISMOS

O isolamento das bactérias em bioreatores utilizando glicerol residual do biodiesel foi realizado para selecionar as bactérias que poderiam usar esta fonte de carbono para produzir hidrogênio e etanol. Trinta e dois tipos de colônias bacterianas foram isoladas e repicadas em placas em meio LB. As cepas apresentaram características de bactérias gram-negativas exceto a cepa 18 que foi característica de gram-positiva. Logo após o isolamento, os testes em agitador orbital para avaliação da degradação do glicerol bem como da capacidade de formação dos produtos hidrogênio e etanol, nas condições aeróbias e anaeróbias, mostraram que das trinta e duas bactérias selecionadas, quatro apresentaram

capacidade de degradação do glicerol e produção de hidrogênio e etanol. As outras bactérias não apresentaram capacidade de produzir H₂ e etanol, nem de degradar o glicerol. A (Figura 9) e (Figura 10) apresentam gráficos de barras com as médias e os desvios padrão dos resultados de glicerol não degradado após 24 horas de cultivo, bem como a formação de hidrogênio e etanol para os isolados 1; 5; 31 e 33. A produção de hidrogênio só ocorre na ausência de oxigênio, ou seja, em anaerobiose. A (Figura 9) apresenta os resultados referentes ao cultivo anaeróbico, onde foi observado a maior produção de hidrogênio para o isolado 1 com uma produção de 31,16 % mol de hidrogênio seguido pela isolado número 5 com 18,95 % mol de hidrogênio. O glicerol do meio foi quase que totalmente consumido pelo isolado 1, apresentando uma degradação de em torno de 88%. Os isolados 1 e 5 foram os melhores produtores de etanol, com uma produção em g.L⁻¹ de 2,52 e 2,36 respectivamente. Já em condições de aerobiose (Figura 10) os resultados observados demonstraram que o maior consumo do glicerol ocorreu pelo isolado 5 com uma degradação em torno de 93 %. A produção de etanol foi mais baixa do que no cultivo anaeróbico com um resultado mais expressivo também pelo isolado 5 com uma produção de 1,9 g.L⁻¹.

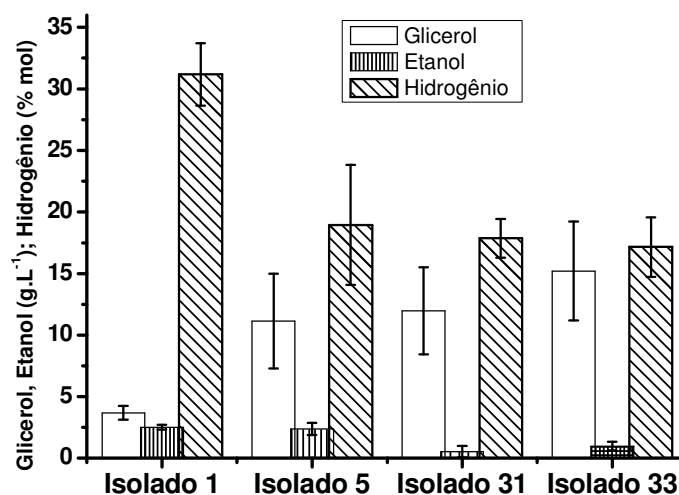


Figura 9. Ensaio anaeróbico realizado em agitador orbital para os quatro isolados que apresentaram capacidade de degradação do glicerol, produção de H₂ e etanol depois de 24 horas de cultivo, nas condições de operação: temperatura 35 °C e 150 rpm. Quantidade de glicerol não degradado (g.L⁻¹), etanol (g.L⁻¹) e hidrogênio (% mol) produzidos.

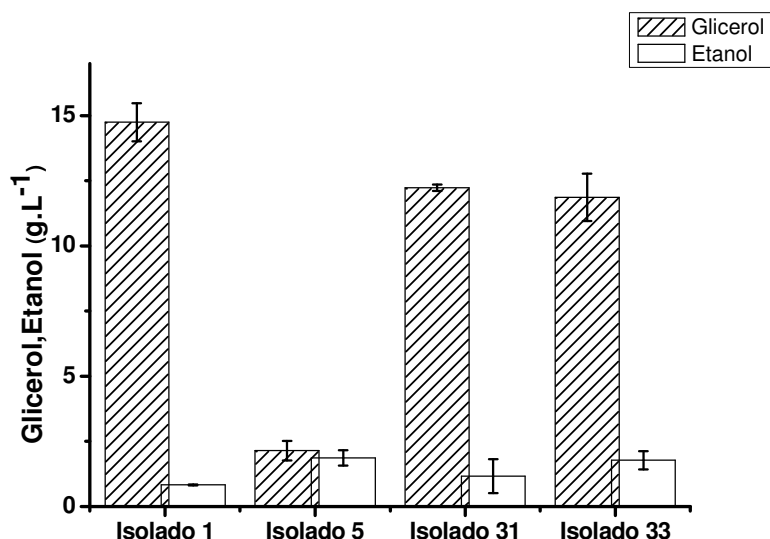


Figura 10. Ensaio aeróbio realizado em agitador orbital para os quatro isolados que apresentaram capacidade de degradação do glicerol, produção de H₂ e etanol depois de 24 horas de cultivo, nas condições de operação: temperatura 35 °C e 150 rpm. Quantidade de glicerol não degradado (g.L⁻¹), etanol (g.L⁻¹) e hidrogênio (% mol) produzidos.

No cultivo anaeróbio juntamente com os produtos formados foi observada a formação de 6,88 g.L⁻¹ de 1,3-propanodiol e pequenas quantidades de ácido acético e ácido láctico. A (Figura 11) apresenta exemplo de dois cromatogramas de HPLC para determinação dos compostos em fase líquida referente ao cultivo anaeróbio da bactéria isolada 1, nos tempos 0 e 24 horas de cultivo. Na (Figura 11A), referente a 0 hora, observa-se apenas o pico do glicerol (30 g.L⁻¹). Os dois picos em torno de 5 e 6 minutos referem-se aos sais do meio de cultivo. Na (Figura 11B), referente a 24 horas de cultivo, percebe-se a degradação do glicerol, uma vez que há decréscimo da área do pico correspondente a este composto (10,17 minutos), cuja área correspondeu à concentração de 3,69 g.L⁻¹. A formação de etanol foi observada, através do pico cromatográfico em 16 minutos (tempo do padrão de etanol). Como mencionado foi também verificada a presença de outros subprodutos tais como ácido láctico, ácido acético e 1,3-propanodiol, picos correspondentes aos tempos de 9,66; 11,08 e 13,09 minutos, respectivamente.

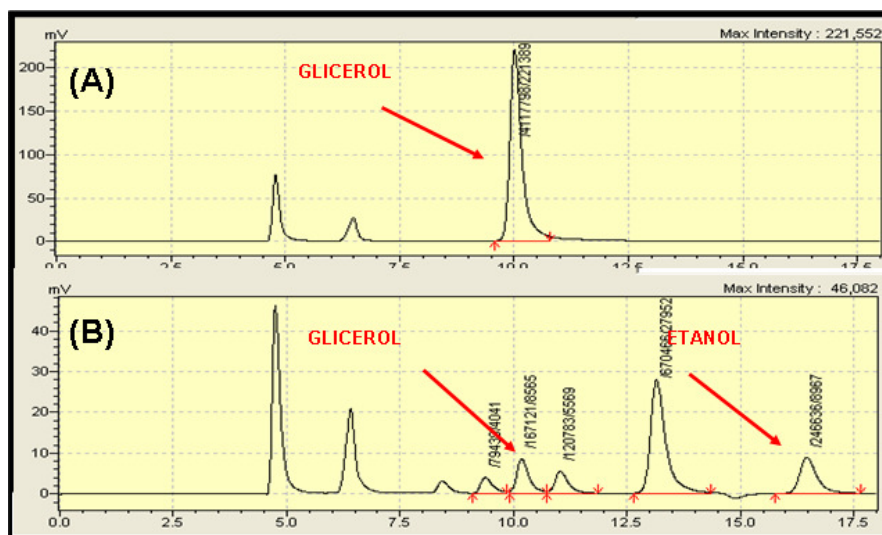


Figura 11. Cromatogramas das análises dos produtos de fermentação do cultivo anaeróbico para o isolado 1 realizado em agitador orbital com as seguintes condições operacionais: 35 °C e 150 rpm utilizando glicerol como fonte de C. (A) zero hora de cultivo; (B) 24 horas de cultivo. Condições cromatográficas: fase móvel - ácido sulfúrico 0,005 M; temperatura do forno - 65 °C; detector - Índice de Refração; coluna - Aminex-HPX87H Biorad.

5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS MICROORGANISMOS

Um seqüenciamento dos isolados 1, 5, 31 e 33 foi realizado no Laboratório ACTGene. As cepas dos quatro novos isolados produtores de hidrogênio e etanol foram identificadas baseadas em testes bioquímicos e testes de caracterização apropriado do gene 16S rDNA. Os resultados dos exames mostraram com 96 % de confiança para o isolado 1 (Figura 12) e 83 % de confiança que os isolados 5 (Figura 13) e 31, que os mesmos pertencem a espécie *Klebsiella pneumoniae*. Já o isolado 33 apresentou 93 % de confiança pertencer à espécie *Pantoea agglomerans*. A bactéria 1 nomeada *Klebsiella pneumoniae* BLb01 foi selecionada para novos estudos visando melhorar a produção dos subprodutos.



Figura 12. Bactéria isolada 1 crescida em Ágar McConkey.

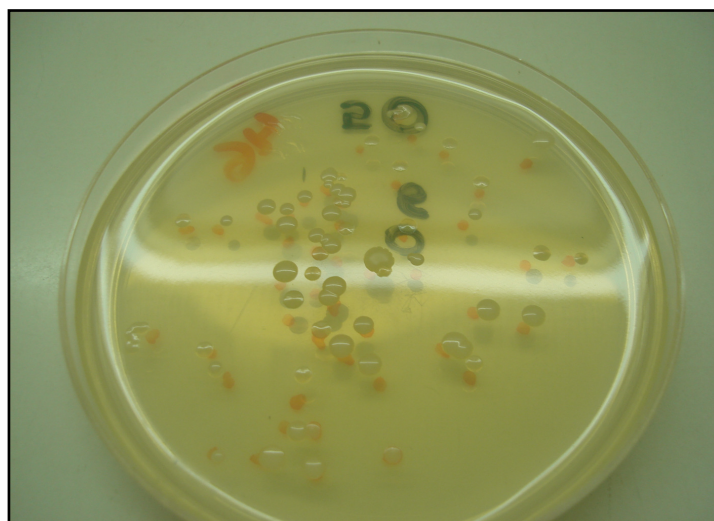


Figura 13. Bactéria isolada 5 crescida em Ágar Nutriente.

5.4 FERMENTAÇÃO EM BIOREATOR

Experimentos em bioreator foram conduzidos com o novo isolado denominado BLb01 em pH controlado. Sob condições de aerobiose foram detectados no meio de cultura a formação de alguns subprodutos em concentrações variadas (Figura 14): etanol; ácido láctico; ácido acético e 1,3 – propanodiol, indicando que a via metabólica de glicerol para o etanol não foi totalmente inibida em

condições aeróbicas. Verifica-se o total consumo do glicerol em 20 horas de cultivo. A produção de etanol foi $3,80 \text{ g.L}^{-1}$ e a taxa de conversão de glicerol a etanol foi de $0,25 \text{ mol/mol}$. A formação de todos os produtos aumentou até as 15 horas de cultivo. Após este tempo de cultivo, todos os produtos apresentaram decréscimo de produção. Isto ocorreu pelo fato de ter esgotado a fonte de carbono (glicerol) e o microorganismo passou então a utilizar os produtos formados para continuar o seu crescimento. No experimento anaeróbio não foi observado este comportamento, no momento em que esgotou a fonte de carbono todos os produtos formados mantiveram-se constantes.

A maior produção de etanol foi encontrada no experimento de fermentação anaeróbia (Figura 15), com $4,98 \text{ g.L}^{-1}$ e uma taxa de conversão de glicerol a etanol de $0,43 \text{ mol/mol}$ em 22 horas de cultivo. No estudo relatado por Ito e colaboradores houve um rendimento de $0,85 \text{ mol/mol}$ em condições anaeróbicas.⁷ Com o decréscimo da aeração, a formação de ácido acético e ácido láctico, foi menor em comparação com condições aeróbicas. É provável que os ácidos produzidos no início foram sendo utilizados até o final da fermentação, indicando que a formação de subproduto dependia das condições de aeração.

Os resultados para o etanol em condições anaeróbicas foram satisfatórios. Estudos de otimização da produção de etanol podem ser feitos em pesquisas futuras.

O subproduto 1,3 – propanodiol também apresentou melhores resultados em condições de anaerobiose, apresentando uma produção máxima em torno de 11 g.L^{-1} em aproximadamente 15 horas de cultivo. Foi observada a produção de hidrogênio em torno de 12 horas de cultivo, cuja produção foi de $1,289 \% \text{ mol}$. Antes e após este período não foi observada produção de H_2 .

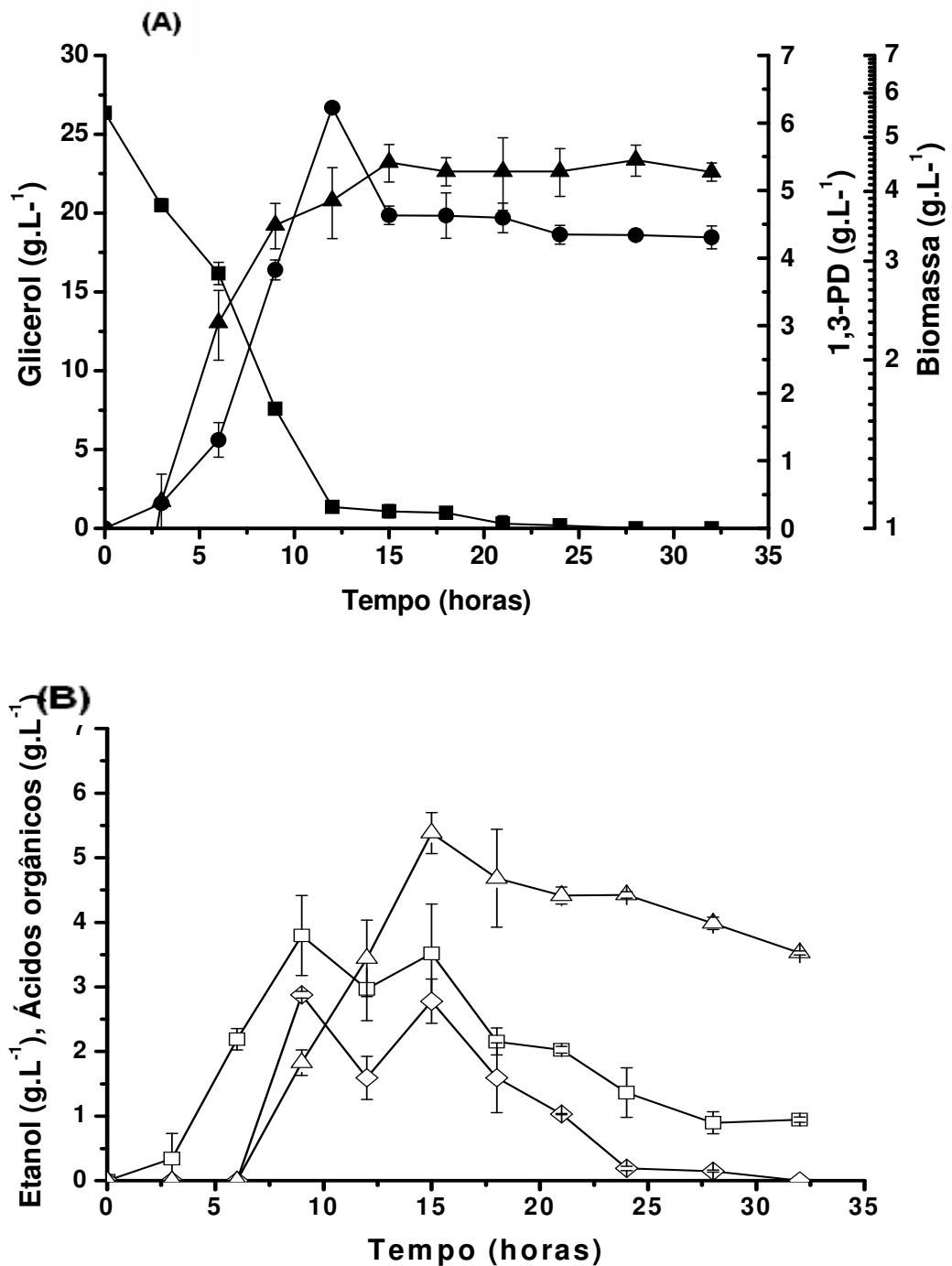


Figura 14. Ensaio realizado em bioreator após 35 horas de cultivo em condições de Aerobiose com isolado BLb01, expressos em g.L⁻¹. (a)- (■) glicerol consumido; (●) formação de 1,3 - Propanodiol, (▲) Biomassa formada; (b)- produtos de fermentação formados: (□) etanol; (Δ) ácido acético e (◇) ácido láctico.

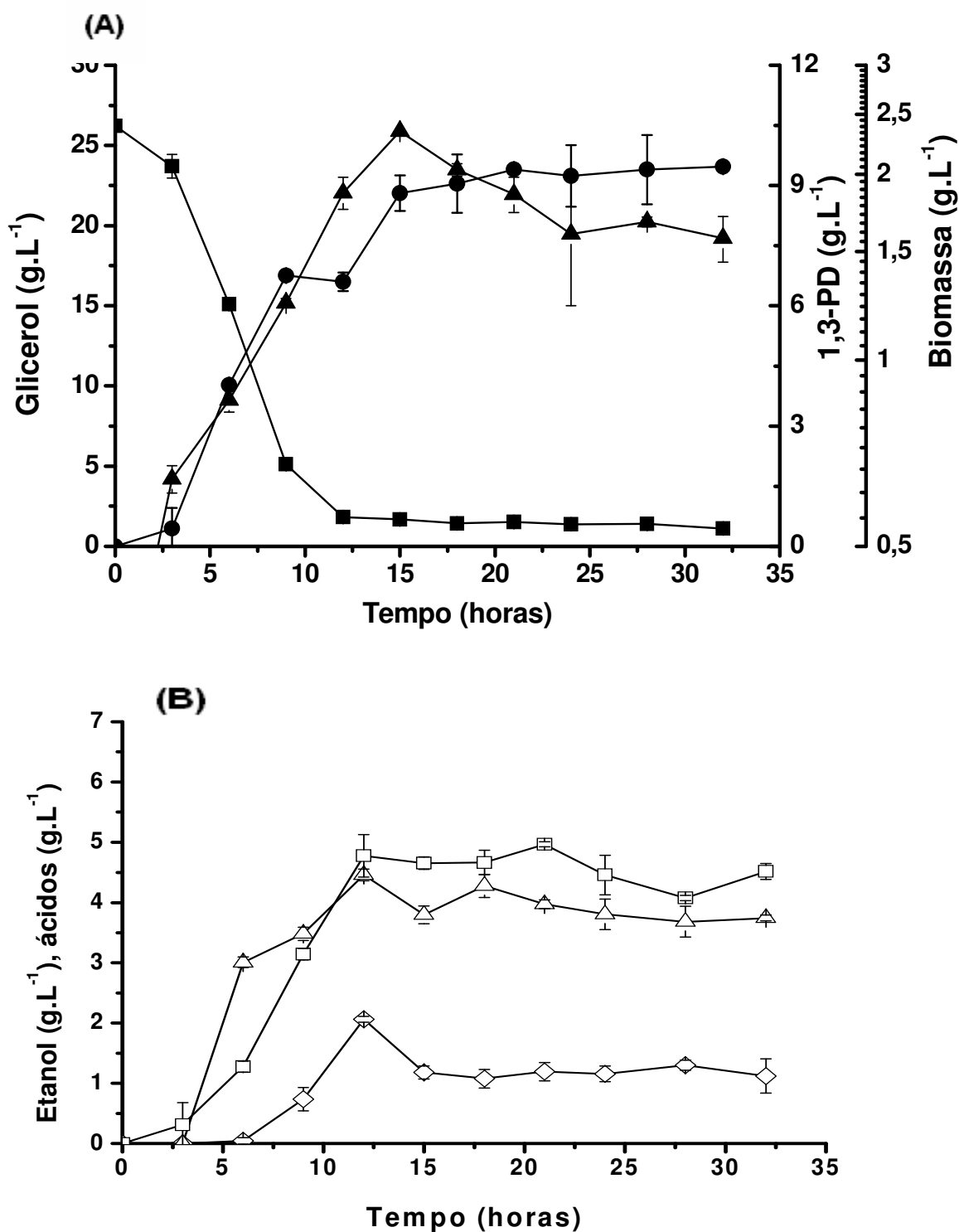


Figura 15. Ensaio realizado em bioreator após 35 horas de cultivo em condições de Anaerobiose com isolado BLb01, expressos em g.L⁻¹. (A): (■) glicerol consumido; (▲) formação de 1,3 - Propanodiol, (●) Biomassa formada. (B): produtos de fermentação formados: (□) etanol; (Δ) ácido acético e (◇) ácido láctico.

5.5 ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO

5.5.1 Planejamento Plackett-Burman

Depois de selecionado o microorganismo de estudo, um planejamento experimental do tipo Plackett-Burman foi utilizado para avaliar o impacto das variáveis: glicerol, pH, temperatura, extrato de levedura, peptona, NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, na produção do hidrogênio pela bactéria isolada 1. A tabela V mostra o planejamento experimental Plackett-Burman para os 20 experimentos e a produção correspondente de hidrogênio (% mol) que variaram entre 2,80 e 29,82 % mol. Esta variação reflete a importância de se otimizar os ensaios para alcançar maiores produções de hidrogênio. As variáveis e seus respectivos valores foram selecionados de acordo com estudos prévios na literatura. Embora a cinética tenha sido realizada até 48 h, as produções mais elevadas de hidrogênio foram sempre observadas em 24 h de cultivo. Após este período, os resultados apresentaram-se constantes. Os resultados obtidos para as produções de hidrogênio sugerem que uma aplicação futura a nível industrial poderá ser viável com uma condição otimizada minimizando assim os custos energéticos operacionais.

Tabela V. Ensaios do Planejamento Plackett-Burman tendo como resposta a produção de hidrogênio em % mol depois de 24 horas de cultivo.

Ensaios	Variáveis/Níveis											Resposta				
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	H ₂ (%mol)
	(g.L ⁻¹)	(pH)	(°C)	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)					
1	(5) -1	(4) -1	(25) -1	(0) -1	(5) 1	(5) 1	(5) 1	(3) 1	(3) 1	(0,1) 1	(0) -1	-1	-1	-1	1	13,09
2	(35) 1	(4) -1	(25) -1	(0) -1	(0) -1	(0) -1	(0) -1	(3) 1	(3) 1	(0,1) 1	(0,2)1	1	1	-1	-1	2,85
3	(5) -1	(8) 1	(25) -1	(0) -1	(0) -1	(5) 1	(5) 1	(0) -1	(0) -1	(0,1) 1	(0,2) 1	1	-1	1	-1	2,80
4	(35) 1	(8) 1	(25) -1	(0) -1	(5) 1	(0) -1	(0) -1	(0) -1	(0) -1	(0,1) 1	(0) -1	-1	1	1	1	8,04
5	(5) -1	(4) -1	(37) 1	(0) -1	(5) 1	(0) -1	(5) 1	(0) -1	(3) 1	(0) -1	(0,2) 1	-1	1	1	-1	17,22
6	(35) 1	(4) -1	(37) 1	(0) -1	(0) -1	(5) 1	(0) -1	(0) -1	(3) 1	(0) -1	(0) -1	1	-1	1	1	24,91
7	(5) -1	(8) 1	(37) 1	(0) -1	(0) -1	(0) -1	(5) 1	(3) 1	(0) -1	(0) -1	(0) -1	1	1	-1	-1	17,55
8	(35) 1	(8) 1	(37) 1	(0) -1	(5) 1	(5) 1	(0) -1	(3) 1	(0) -1	(0) -1	(0,2) 1	-1	-1	-1	-1	28,90
9	(5) -1	(4) -1	(25) -1	(5) 1	(5) 1	(5) 1	(0) -1	(3) 1	(0) -1	(0) -1	(0) -1	1	1	1	-1	12,48
10	(35) 1	(4) -1	(25) -1	(5) 1	(0) -1	(0) -1	(5) 1	(3) 1	(0) -1	(0) -1	(0,2) 1	-1	-1	1	1	18,23
11	(5) -1	(8) 1	(25) -1	(5) 1	(0) -1	(5) 1	(0) -1	(0) -1	(3) 1	(0) -1	(0,2) 1	-1	1	-1	1	15,61
12	(35) 1	(8) 1	(25) -1	(5) 1	(5) 1	(0) -1	(5) 1	(0) -1	(3) 1	(0) -1	(0) -1	1	-1	-1	-1	18,06
13	(5) -1	(4) -1	(37) 1	(5) 1	(5) 1	(0) -1	(0) -1	(0) -1	(0) -1	(0,1) 1	(0,2) 1	1	-1	-1	1	17,84
14	(35) 1	(4) -1	(37) 1	(5) 1	(0) -1	(5) 1	(5) 1	(0) -1	(0) -1	(0,1) 1	(0) -1	-1	1	-1	-1	23,87
15	(5) -1	(8) 1	(37) 1	(5) 1	(0) -1	(0) -1	(0) -1	(3) 1	(3) 1	(0,1) 1	(0) -1	-1	-1	1	-1	29,82
16	(35) 1	(8) 1	(37) 1	(5) 1	(5) 1	(5) 1	(5) 1	(3) 1	(3) 1	(0,1) 1	(0,2) 1	1	1	1	1	29,03
17(C)	(20) 0	(6) 0	(31) 0	(2,5) 0	(0) 0	(0) 0	(0) 0	(1,5) 0	(1,5) 0	(0,05) 0	(0,1) 0	0	0	0	0	19,61
18(C)	(20) 0	(6) 0	(31) 0	(2,5) 0	(0) 0	(0) 0	(0) 0	(1,5) 0	(1,5) 0	(0,05) 0	(0,1) 0	0	0	0	0	18,00
19(C)	(20) 0	(6) 0	(31) 0	(2,5) 0	(0) 0	(0) 0	(0) 0	(1,5) 0	(1,5) 0	(0,05) 0	(0,1) 0	0	0	0	0	20,04
20 (C)	(20) 0	(6) 0	(31) 0	(2,5) 0	(0) 0	(0) 0	(0) 0	(1,5) 0	(1,5) 0	(0,05) 0	(0,1)0	0	0	0	0	19,59

A Tabela VI mostra as análises estatísticas das variáveis estudadas para a produção de hidrogênio. Quando o sinal do efeito da variável testada for positivo, a influência da variável na produção do hidrogênio é maior em um nível elevado (+1); quando o resultado do efeito for negativo, a variável em baixo nível (-1) terá mais importância na produção de hidrogênio. As variáveis que apresentaram um $p < 0.05$ apresentam 95 % de confiança, e por isto, são consideradas significativas na produção de hidrogênio.

Nove variáveis apresentaram 95 % de confiança. O glicerol é a variável mais importante estudada, e ele mostrou efeito positivo na produção do hidrogênio. As maiores produções de hidrogênio foram alcançadas quando a concentração de glicerol foi fixada no nível elevado com o valor de 35 g.L^{-1} , mostrando que a bactéria isolada 1 apresentou uma grande capacidade de degradar o glicerol em concentrações elevadas. Existem poucos trabalhos que utilizam o glicerol da síntese do biodiesel como fonte de carbono para produzir o hidrogênio.^{7,27} A maioria dos artigos usa glicose como a fonte de carbono.^{53, 54, 55} Além da fonte de carbono, a fonte do nitrogênio apresentou ser um parâmetro importante para a produção do hidrogênio. Neste experimento, encontrou-se que o NH_4Cl teve um efeito positivo na produção de hidrogênio. Este resultado está de acordo com estudos de Liu e Fang que também utilizaram planejamento experimental do tipo Plackett-Burman para otimizar a produção de bio-hidrogênio a partir de resíduo de biodiesel.²⁷

Duas fontes orgânicas de nitrogênio foram testadas: peptona e extrato de levedura. Somente o extrato de levedura apresentou efeito significativo. O extrato de levedura apresentou maiores produções de hidrogênio no nível elevado com o valor de 5 g.L^{-1} . A adição de extrato de levedura é fundamental para o crescimento das bactérias, sendo uma fonte rica de nitrogênio, favorecendo a alta conversão do substrato. Pode também ser responsável pela produção de um produto de interesse específico originado do metabolismo do microorganismo.

O pH inicial e a temperatura influenciaram positivamente a produção de hidrogênio. Ambos apresentaram melhores resultados no nível elevado com pH 8 e temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Os resultados de produção de hidrogênio mostraram que um pH inicial mais elevado é necessário, uma vez que após 24 horas há um decréscimo do mesmo para aproximadamente 4,5 a 5,0, impedindo a formação do hidrogênio. O pH é um dos parâmetros chave para a produção de hidrogênio porque ele afeta

diretamente a atividade da enzima hidrogenase bem como a rota metabólica dos microorganismos.⁵⁶ Além disso, com o aumento da temperatura pode-se obter melhores rendimentos de H₂. A temperatura pode afetar o crescimento específico do microorganismo, bem como a taxa de utilização do substrato o que acarreta a mudança dos produtos formados.⁵³

As variáveis NH₄Cl (X₆), K₂HPO₄ (X₈), KH₂PO₄ (X₉) tiveram efeito positivo. Seus efeitos serão discutidos no experimento fatorial fracionário. As variáveis FeSO₄. 7H₂O (X₁₀) e MgSO₄. 7H₂O (X₁₁) tiveram efeito negativo e foram excluídos, pois seu nível mais baixo era de 0 g.L⁻¹.

Zuo e colaboradores executaram uma série de experimentos para investigar os efeitos de diversos fatores na produção de bio-hidrogênio em processos anaeróbicos e os resultados mostraram que diversos fatores, assim como a concentração do substrato, temperatura e o pH inicial podem afetar a produção anaeróbica de bio-hidrogênio em diferentes níveis.⁵⁷ Muitas espécies identificadas para a produção de hidrogênio (*Enterobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus* e *Clostridium*) podem ter seu metabolismo representado por rotas bioquímicas. Assim, as rotas de fermentação que produzem o acetato e o butirato são responsáveis pela produção do hidrogênio. As variações na relação do acetato/butirato são causadas pelas alterações metabólicas devido às mudanças do pH. Quando o pH está em 4,5 ou abaixo deste valor, a rota de fermentação para a produção de hidrogênio pode se deslocar para a produção de ácidos orgânicos seguindo para a produção de álcool.⁵⁸

Tabela VI. Resultados estatísticos e efeitos das variáveis estudadas para a produção de hidrogênio para o planejamento Plackett-Burman.

Variáveis	Parâmetros	Efeitos	P
X ₁	Glicerol	3.434	0.004652*
X ₂	pH	2.413	0.012637*
X ₃	Temperatura	12.248	0.000108*
X ₄	Extrato de levedura	6.196	0.000826*
X ₅	Peptona	1.126	0.087190 ^{n.s.}
X ₆	NH ₄ Cl	2.636	0.009884*
X ₇	(NH ₄) ₂ SO ₄	-0.074	0.878285 ^{n.s.}
X ₈	K ₂ HPO ₄	2.946	0.007219*
X ₉	KH ₂ PO ₄	2.608	0.010179*
X ₁₀	FeSO ₄ . 7H ₂ O	-3.203	0.005682*
X ₁₁	MgSO ₄ . 7H ₂ O	-1.916	0.023657*

* Efeitos significativos a 95 % de confiança;

P = Valor estatístico da probabilidade;

^{n.s.} Não significativo ao nível de 95 % de confiança .

5.5.2 Planejamento Fatorial Fracionário

A tabela VII apresenta as respostas de hidrogênio em % mol após 24 horas de cultivo. Cada variável independente foi avaliada em alto nível (+1) e baixo nível (-1). As análises dos pontos centrais (C) foram incluídas na matriz e a análise estatística foi usada para identificar o efeito de cada variável na produção de hidrogênio.

Tabela VII. Ensaios do delineamento Fatorial Fracionário 2^{6-2} em níveis codificados tendo como resposta a produção de hidrogênio em % mol realizadas em agitador orbital depois de 24 horas de cultivo.

Ensaio	X ₁ (g.L ⁻¹)	X ₂ (pH)	X ₃ (°C)	X ₄ (g.L ⁻¹)	X ₅ (g.L ⁻¹)	X ₆ (g.L ⁻¹)	H ₂ (%mol)
1	(30) -1	(7) -1	(31) -1	(3) -1	(1) -1	(1) -1	16,96
2	(50) 1	(7) -1	(31) -1	(3) -1	(5) 1	(1) -1	24,34
3	(30) -1	(9) 1	(31) -1	(3) -1	(5) 1	(5) 1	22,53
4	(50) 1	(9) 1	(31) -1	(3) -1	(1) -1	(5) 1	14,42
5	(30) -1	(7) -1	(37) 1	(3) -1	(5) 1	(5) 1	37,45
6	(50) 1	(7) -1	(37) 1	(3) -1	(1) -1	(5) 1	30,74
7	(30) -1	(9) 1	(37) 1	(3) -1	(1) -1	(1) -1	32,79
8	(50) 1	(9) 1	(37) 1	(3) -1	(5) 1	(1) -1	38,53
9	(30) -1	(7) -1	(31) -1	(7) 1	(1) -1	(5) 1	14,11
10	(50) 1	(7) -1	(31) -1	(7) 1	(5) 1	(5) 1	13,75
11	(30) -1	(9) 1	(31) -1	(7) 1	(5) 1	(1) -1	9,44
12	(50) 1	(9) 1	(31) -1	(7) 1	(1) -1	(1) -1	7,69
13	(30) -1	(7) -1	(37) 1	(7) 1	(5) 1	(1) -1	25,54
14	(50) 1	(7) -1	(37) 1	(7) 1	(1) -1	(1) -1	26,73
15	(30) -1	(9) 1	(37) 1	(7) 1	(1) -1	(5) 1	40,16
16	(50) 1	(9) 1	(37) 1	(7) 1	(5) 1	(5) 1	36,63
17(C)	(40) 0	(8) 0	(34) 0	(5) 0	(3) 0	(3) 0	15,71
18(C)	(40) 0	(8) 0	(34) 0	(5) 0	(3) 0	(3) 0	16,91
19(C)	(40) 0	(8) 0	(34) 0	(5) 0	(3) 0	(3) 0	14,97
20 (C)	(40) 0	(8) 0	(34) 0	(5) 0	(3) 0	(3) 0	15,37

X₁ – Glicerol; X₂ – pH; X₃ – Temperatura; X₄ – Extrato de Levedura; X₅ – K₂HPO₄; X₆ – KH₂PO₄.

Os resultados do delineamento apresentaram resultados que variaram entre 7,69 e 40,16 % mol de hidrogênio. Observa-se que estes resultados apresentaram valores superiores ao experimento realizado anteriormente. Os pontos centrais apresentaram boa reprodutibilidade dos experimentos.

A tabela VIII mostra as análises estatísticas das variáveis estudadas para a produção de hidrogênio utilizando o delineamento fatorial fracionário. As variáveis que tiveram maior efeito na produção de hidrogênio foram identificadas para o isolado com base em níveis de confiança acima de 95 % ($p < 0,05$).

Tabela VIII. Efeitos estimados para a produção de hidrogênio resultante do delineamento fatorial fracionário.

Variáveis	Parâmetros	Efeitos	P
X ₁	Glicerol	- 7.798	0.004652*
X ₂	pH	2.493	0.010925*
X ₃	Temperatura (°C)	19.090	0.000027*
X ₄	E.levedura	- 4.5421	0.001947*
X ₅	K ₂ HPO ₄	4.001	0.002822*
X ₆	KH ₂ PO ₄	4.395	0.002144*

* Efeitos significativos a 95 % de confiança

P = Valor estatístico da probabilidade

Neste experimento, todas as variáveis avaliadas foram significativas na produção de hidrogênio. O glicerol apresentou efeito negativo, indicando que o aumento da concentração de 30 para 50 g.L⁻¹ não é interessante, pois quando usado concentração muito elevada de substrato poderá ocorrer inibição do crescimento das bactérias pelas impurezas presentes no glicerol gerado da fabricação de biodiesel,

como sais de ácidos graxos e ácidos graxos livres.⁵ Neste segundo experimento de otimização, a faixa de pH estudada foi maior do que no primeiro estudo de otimização usando o P-B, e a variável pH apresentou efeito positivo, ficando evidente a necessidade de um pH inicial elevado, pois ao longo do processo fermentativo ele é reduzido. O extrato de levedura apresentou efeito negativo. Este composto utilizado como fonte de nitrogênio, é um dos nutrientes necessários ao crescimento do microrganismo. A adição de concentrações muito elevadas não foi significativa para o crescimento do microrganismo e não é interessante no ponto de vista econômico, pois se deseja obter um processo com maior produção de hidrogênio, reduzindo o gasto de reagentes de custo elevado. As demais variáveis estudadas apresentaram efeito positivo. Com o aumento da temperatura de 31 °C para 37 °C foi observado o aumento da produção de hidrogênio. A temperatura pode afetar a rota metabólica resultando na mudança dos compostos formados. O efeito da temperatura para a produção de hidrogênio foi avaliado em muitos estudos, dos quais a maioria demonstrou aumento da produção de hidrogênio com o aumento da temperatura.

Ling e Chang avaliaram o efeito da temperatura na faixa de 15 a 34 °C e obtiveram a máxima produção de hidrogênio na temperatura de 34 °C usando hexose como substrato.⁵⁹ Já Yu e colaboradores, que avaliaram a temperatura na faixa de 20 a 55 °C, obtiveram a máxima produção de hidrogênio na temperatura de 55 °C utilizando efluente de uma vinícola como substrato.⁶⁰ Os fosfatos são necessários à produção de hidrogênio pela sua capacidade tamponante.⁶¹

5.5.3 Caminho de Ascendência Máxima

O máximo de produção de hidrogênio atingido com este planejamento foi na temperatura de 41 °C usando 4 g.L⁻¹ K₂HPO₄, com uma produção de H₂ de 41,78 % mol. É observado na Tabela IX que com o aumento da temperatura acima de 41 °C e o aumento de fonte de fosfato implicaram drasticamente na queda da produção de hidrogênio.

Tabela IX. Planejamento dos experimentos pela metodologia de caminho de ascendência máxima e resposta de produção de hidrogênio em % mol em 24 horas de cultivo.

Ensaio	Temperatura (°C)	K ₂ HPO ₄ (g.L ⁻¹)	H ₂ (%mol)
1	37	3	27,94
2	41	4	41,78
3	45	5	3,36
4	49	6	0,13
5	53	7	0,03

5.5.4 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Conforme as condições utilizadas no planejamento DCCR para otimização do meio de cultivo, para a produção de hidrogênio, seus resultados variaram de 0,57 a 48,19 % mol, respectivamente, conforme os resultados após 24 horas de cultivo observado na tabela X. Os pontos centrais apresentaram uma variação pequena, indicando uma boa repetibilidade do processo.

Tabela X. Valores codificados, variáveis reais e resposta da produção de hidrogênio (% mol) para os ensaios do Delineamento Composto Central Rotacional realizado em agitador orbital depois de 24 horas de cultivo.

Variáveis^a/níveis^b				
Ensaio	X₁(Temperatura)	X₂ (K₂HPO₄)	X₃(KH₂PO₄)	H₂ (% mol)
1	(37) – 1	(2,2) – 1	(2,2) – 1	40,32
2	(37) – 1	(2,2) – 1	(5,8) + 1	41,02
3	(37) – 1	(5,8) + 1	(2,2) – 1	39,83
4	(37) – 1	(5,8) + 1	(5,8) + 1	40,01
5	(45) + 1	(2,2) – 1	(2,2) – 1	33,66
6	(45) + 1	(2,2) – 1	5,8) + 1	35,10
7	(45) + 1	(5,8) + 1	(2,2) – 1	9,65
8	(45) + 1	(5,8) + 1	(5,8) + 1	25,16
9	(35) – 1,68	(4) 0	(4) 0	39,57
10	(47) + 1,68	(4) 0	(4) 0	0,57
11	(41) 0	(1) – 1,68	(4) 0	45,56
12	(41) 0	(5,8) + 1,68	(4) 0	45,60
13	(41) 0	(4) 0	(1) – 1,68	48,19
14	(41) 0	(4) 0	(5,8) + 1,68	42,35
15	(41) 0	(4) 0	(4) 0	44,79
16	(41) 0	(4) 0	(4) 0	37,85
17	(41) 0	(4) 0	(4) 0	45,93
18	(41) 0	(4) 0	(4) 0	41,63

^a X₁ – Temperatura em (°C); X₂ – K₂HPO₄ em (g.L⁻¹); X₃ – KH₂PO₄ em (g.L⁻¹)

^b (+) alto nível; (–) baixo nível; (0) ponto central.

Através dos resultados obtidos foi possível determinar os coeficientes de regressão que estão apresentados na tabela XI. Com exceção de X₃ (KH₂PO₄) e das interações de temperatura com KH₂PO₄ (X₁ X₃) e K₂HPO₄ com KH₂PO₄ (X₂ X₃), todos os parâmetros do modelo foram altamente significativos, podendo elaborar um

modelo de equação com as variáveis codificadas:

$$H_2 = 43,16 - 9,02X_1 - 8,79 X_1^2 - 2,59X_2 - 4,05X_1 \cdot X_2 \quad (4)$$

O coeficiente de regressão do modelo ($R^2=0,8727$) mostrou que 87,27% da variabilidade pode ser explicada pelo modelo.

Tabela XI. Coeficientes de regressão para a resposta da produção de hidrogênio (% mol)

	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	T (3)	p - valor
Média	43,16643	1,132818	38,10536	0,000040
X1 (L)	-9,02172	1,960769	-9,20223	0,002714
X1 (Q)	-8,79996	1,962098	-8,96994	0,002924
X2 (L)	-2,59046	1,960769	-2,64229	0,077504
X1 X2 (L)	-4,05488	2,561868	-3,16556	0,050654

$R^2 = 0,8727$, $p < 0,05$, Erro puro = 13,1263.

Analisando-se a Tabela XII para a resposta de produção de H_2 verificamos que o valor de F calculado (22,29) foi maior que o F tabelado (3,18), refletindo a significância estatística da equação do modelo. Isto demonstra que o modelo, como expresso pela equação (4) é um modelo adequado para descrever a resposta de produção de Hidrogênio pela bactéria isolada BLb01.

Tabela XII. ANOVA para a resposta da produção de Hidrogênio.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	2390,88	4	597,72	22,29	3,18
Resíduo	348,68	13	26,82		
Falta de ajuste	309,31	10	30,93	2,36	
Erro puro	39,38	3	13,13		
Total	2739,56	17			

O delineamento composto central rotacional (DCCR) utilizado neste processo foi muito interessante para avaliar os constituintes do meio de fermentação que afetam a produção de hidrogênio. Os modelos foram altamente significativos, sendo possível construir as superfícies de respostas e definir as regiões de interesse. Através da análise das superfícies de resposta (Figura 16) e (Figura 17), os valores máximos obtidos para a produção de hidrogênio (% mol) correspondem à temperatura em torno de 39 °C. Já para as concentrações de fosfato (K_2HPO_4 e KH_2PO_4) verificou-se que dentro da faixa estudada: (1 à 7 g.L⁻¹) a resposta não foi afetada. É uma ótima informação, pois, os fosfatos podem ser mantidos na condição mais conveniente, em termos operacionais e econômicos.

O meio de fermentação deve conter: 30 g.L⁻¹ glicerol; 3 g.L⁻¹ extrato de levedura; 3 g.L⁻¹ K_2HPO_4 ; 1 g.L⁻¹ KH_2PO_4 ; temperatura 39 °C e pH 9,0. A validação dos resultados do modelo foi feita pela resolução da equação (3) obtendo-se o valor predito de 45,33 % mol de hidrogênio, que quando comparados com o valor experimental (44,98 % mol) indicou que o modelo é válido para o intervalo estudado.

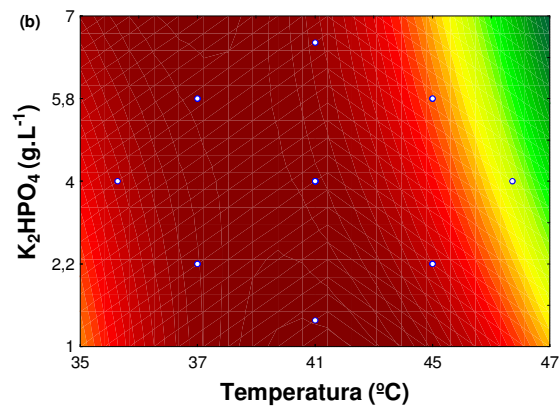
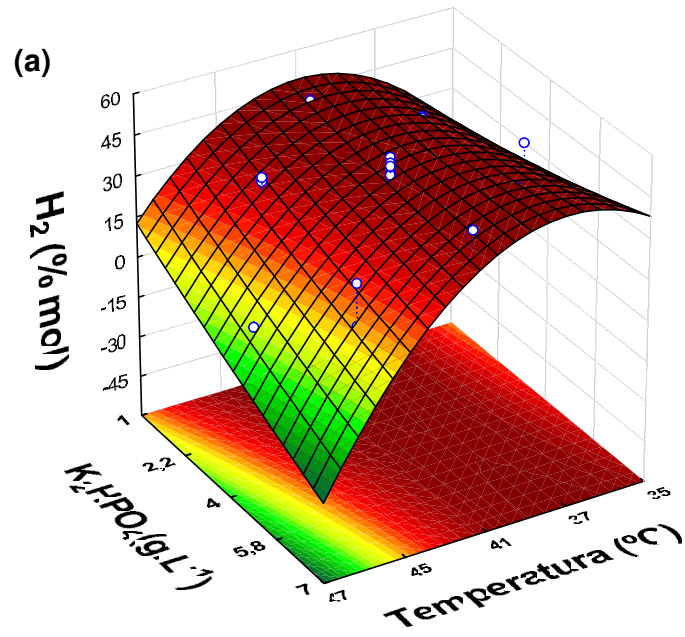


Figura 16. Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a obtenção da produção de H_2 (% mol), interação entre (T) x K_2HPO_4 .

(a)

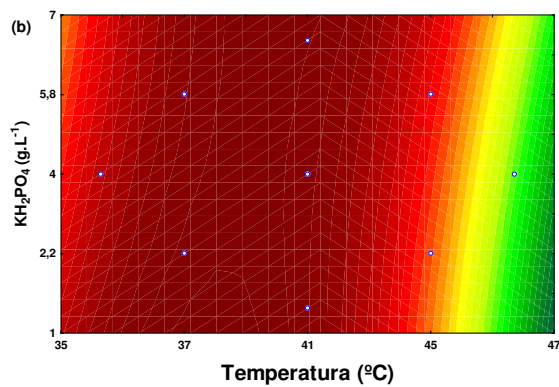
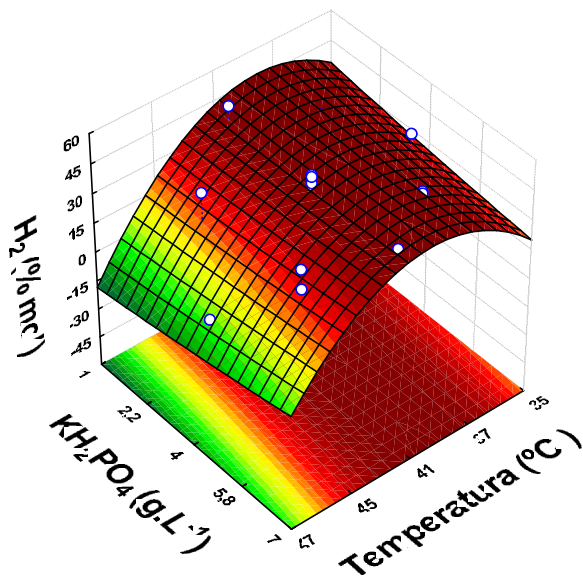


Figura 17. Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a obtenção da produção de H₂ (% mol), interação entre (T) x KH₂PO₄.

5.6 PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO X PRÉ-TRATAMENTOS DO LODO

A (Figura 18) mostra um gráfico de efeito dos diferentes métodos de pré-tratamentos na produção cumulativa de hidrogênio nos testes em batelada. O hidrogênio é produzido sem nenhum tratamento conforme observado no experimento controle, mas a aplicação dos pré-tratamentos resultou em melhoria na produção de H₂. Os resultados observados no gráfico demonstram que o tratamento dessecação apresentou o mais elevado potencial de produção de hidrogênio, seguido pelo tratamento térmico com 34,98 e 27,32 % mol respectivamente, usando glicerol como substrato. Isto ocorreu porque o calor facilita a supressão de bactérias não formadoras de esporos, permitindo o crescimento de bactérias que formam esporos, que são importantes para a produção de hidrogênio. Wang e Wan, conduziram um estudo com cinco métodos de pré-tratamento do lodo.⁴¹ A fermentação para a produção de hidrogênio utilizando glicose como substrato mostrou que o tratamento térmico apresentou o mais elevado potencial de produção de hidrogênio com 215,4 mL. Nos estudos de Mu e colaboradores foi demonstrado que a produção cumulativa de hidrogênio pelo pré-tratamento térmico do lodo também foi a mais elevada entre todos os pré-tratamentos aplicados em seu estudo utilizando sacarose como substrato.⁵² Os autores citados utilizam açúcares como substrato nas fermentações, mas os pré-tratamentos são similares aos apresentados no presente trabalho, onde os tratamentos que utilizaram calor, como o tratamento térmico e dessecação, foram os melhores pré-tratamentos testados em todos os estudos.

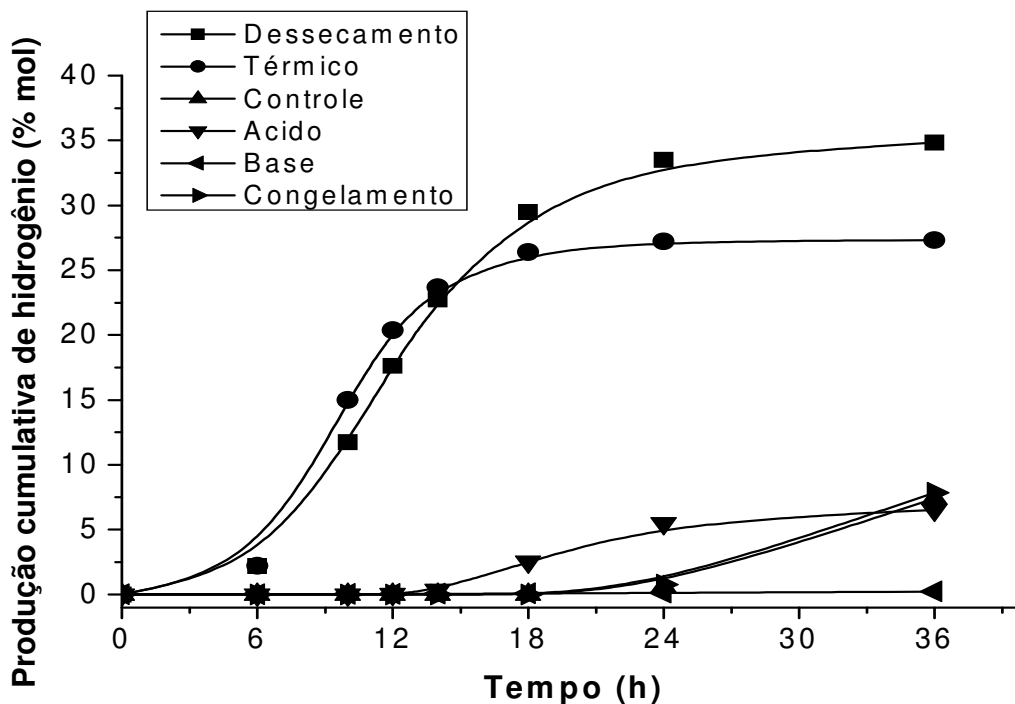


Figura 18. Efeito da produção cumulativa de hidrogênio pelos tratamentos: dessecação, térmico, congelamento, ácido, base e controle.

5.7 DEGRADAÇÃO DO SUBSTRATO X PRÉ-TRATAMENTOS

A eficiência de degradação do substrato foi calculada pela razão da quantidade de glicerol consumida pela quantidade inicial de glicerol. A (Figura 19) mostra a taxa percentual de degradação do substrato com os diferentes pré-tratamentos depois de 36 horas. Os resultados mostram que todos os pré-tratamentos tiveram uma degradação superior ao controle, exceto para o tratamento básico que apresentou uma degradação em torno de 24%, não utilizou boa parte da fonte de carbono glicerol, portanto teve a produção de hidrogênio mais baixa do que os outros tratamentos. De todos os testes com o lodo, os tratamentos dessecação e térmico obtiveram as taxas máximas de degradação do glicerol utilizado como substrato, em torno de 66%, confirmando os resultados mais expressivos de

produção de H₂ de todos os outros tratamentos em estudo e estão em acordo com a literatura que diz que os pré-tratamentos que utilizam calor são os mais eficientes. Ambos pré-tratamentos utilizam calor por isto seu resultados foram bastante parecidos. Mohan e colaboradores obtiveram uma taxa máxima de 87% de degradação do substrato em seu estudo, usando a glicose como fonte de carbono.⁶² Torna-se bastante difícil a comparação de nossos resultados, pois não existem relatos de estudos com lodo na literatura utilizando glicerol como substrato. Uma razão para a menor degradação do substrato pode ser pela elevada concentração inicial de glicerol que pode causar a inibição das bactérias por excesso de substrato.

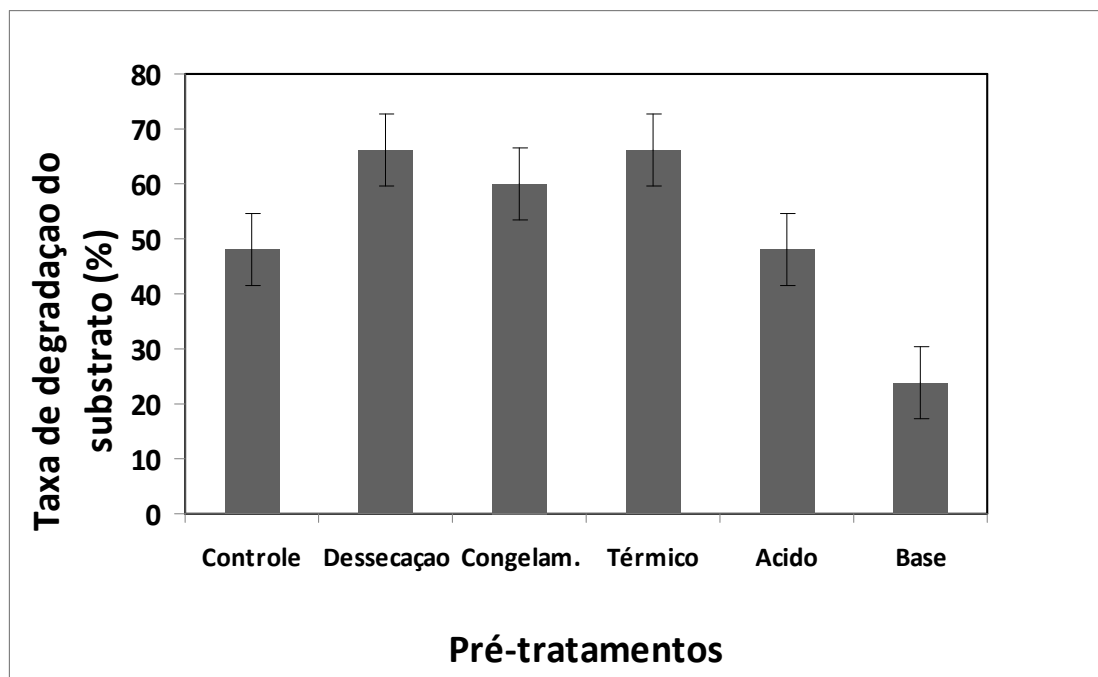


Figura 19. Efeito da degradação do glicerol depois de 36 horas de cultivo com os diferentes pré-tratamentos.

5.8 BIOMASSA X PRÉ-TRATAMENTOS

O SSV (Sólidos Suspensos Voláteis) foi usado neste estudo para representar a biomassa. A (Figura 20) mostra o efeito da biomassa nos diferentes pré-tratamentos depois de 36 horas. Os resultados mostram que a biomassa dos lodos pré-tratados com dessecação, com tratamento térmico, com congelamento e com base, independentemente, foram superiores ao controle durante a fermentação para a produção de hidrogênio, usando glicerol como substrato. Além disto, o tratamento dessecação obteve a maior biomassa, que pode explicar a maior capacidade de produção de hidrogênio, e maior degradação do substrato glicerol. Contudo a biomassa do lodo com pré-tratamento ácido foi menor que o teste controle.

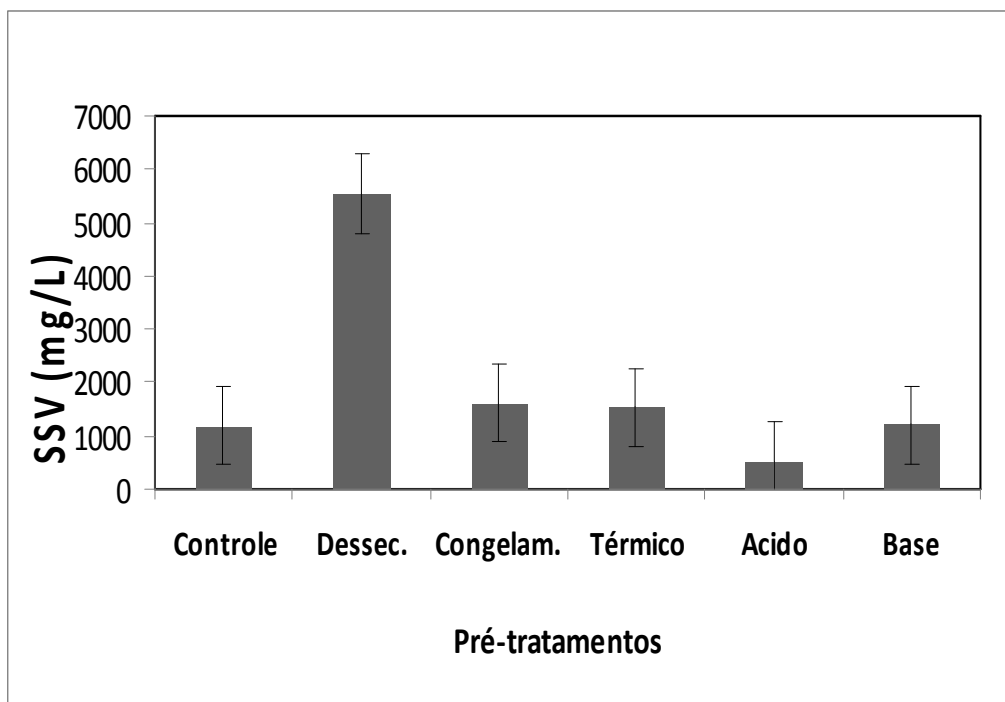


Figura 20. Efeito dos sólidos suspensos Voláteis (SSV) versus métodos pré-tratamentos do lodo.

5.9 EFEITO DO PH FINAL SOBRE A ROTA METABÓLICA

A (Figura 21) mostra o efeito no pH final dos diferentes métodos de pré-tratamento em estudo. É observado que devido ao processo de fermentação o pH final de todos os testes foram menores que o pH inicial 7,0. Em todos os testes o pH final oscilou de 4,58 a 5,90. O pH final dos testes em batelada, neste estudo ficou dentro da faixa apresentada nos estudos de Zhang e Shen.⁶⁴ Em seus estudos o pH final nos testes em batelada foram 5,3 e 4,6, respectivamente. Já os estudos de Ren e colaboradores demonstraram que quando o pH do sistema de fermentação cai abaixo de 4,5, o etanol pode ser produzido durante a fermentação.⁶⁵

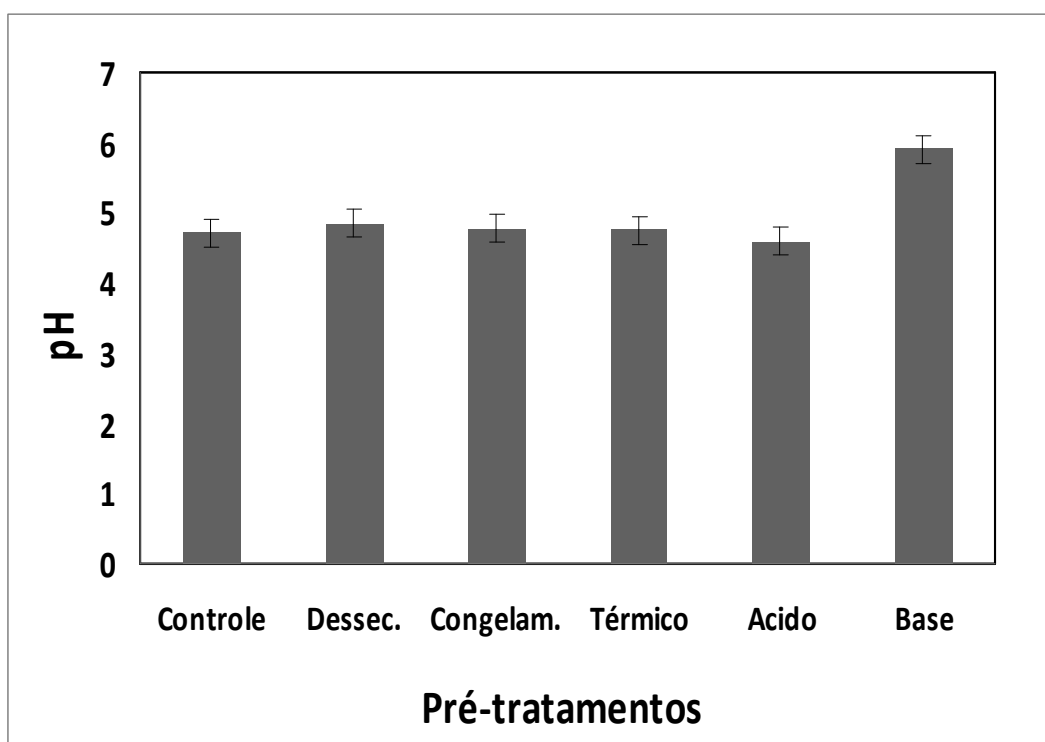


Figura 21. Gráfico do pH final em função dos diferentes tratamentos.

5.10 METABÓLITOS SOLÚVEIS FORMADOS EM FUNÇÃO DOS DIFERENTES PRÉ-TRATAMENTOS

A Tabela XIII resume o efeito dos diferentes métodos de pré-tratamento sobre os tipos e concentrações dos metabólitos solúveis. Os resultados mostram que os principais subprodutos formados durante a fermentação nos diferentes pré-tratamentos aplicados foram: ácido acético, ácido butírico e 1,3 – propanodiol. Não foi observada a formação de etanol, pois o pH depois de 36 horas para nenhum tratamento foi abaixo de 4,5, condição para que ocorra a formação deste subproduto. As concentrações de ácido acético e ácido butírico foram relativamente pequena comparada à formação do subproduto 1,3 - propanodiol no tratamento térmico que apresentou 5,65 g.L⁻¹. Destas substâncias 1,3-propanodiol merece destaque como monômero para produção de poliésteres, poliéteres e poliuretanos, entre eles um novo tipo de poliéster, politrimetileno tereftalato, conhecido como PPT. Pode ser usado também como um extensor de cadeia para a síntese de poliuretanos, lubrificantes, solventes e precursores na indústria química e farmacêutica.⁶⁶

Tabela XIII. Metabólitos solúveis formados pelos diferentes pré-tratamentos.

Pré-tratamento	Concentração dos metabólitos solúveis (g.L ⁻¹)		
	Ácido acético	Ácido butírico	1,3 - Propanodiol
Controle	-	0.80	3.95
Dessecação	2.10	1.83	4.74
Básico	-	-	1.97
Térmico	1.78	2.04	5.65
Congelamento	1.60	1.00	4.94
Ácido	-	1.14	3.33

“-“ não detectado

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu inferir as seguintes conclusões:

A) A bactéria que melhor apresentou capacidade de degradação do glicerol (98%) e produção simultânea de hidrogênio e etanol foi a bactéria isolada denominada de *Klebsiella pneumoniae*, BLb01

B) A aplicação de planejamento experimental do tipo Plackett-Burman, Fatorial Fracionário e Delineamento Central Composto Rotacional permitiu a proposição de um modelo para trabalhar em condições otimizadas de fermentação. A otimização do processo aumentou a produção de H₂ de 29,8 para 44,9 % mol de H₂.

C) Os métodos de pré-tratamento (dessecação; térmico; ácido; básico e congelamento), aplicados ao consórcio microbiano ambiental utilizando o subproduto glicerol, para o enriquecimento da produção de hidrogênio, mostraram que é possível utilizar outras fontes de carbono como substituto do açúcar, ou do amido para produção de hidrogênio. Os pré-tratamentos com calor, tais como, o de dessecação e o térmico acusaram os melhores resultados na produção de hidrogênio, e eficiência de degradação do glicerol.

7. REFERÊNCIAS

- [1]Mota, C. J. A.; Silva, C. X. A.; Gonçalves, V. L. C.; *Quim. Nova.* **2009**, 32, 639.
- [2]Gonçalves, B. R. L.; Perez, L.; Ângelo, A. C. D. Glicerol: Uma Inovadora Fonte de Energia Proveniente da Produção de Biodiesel. *International Workshop Advances in Cleaner Production*, São Paulo-SP, Brasil, 2009.
- [3]Sakai, S.; Yagishita, T; *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, 8, 340.
- [4]Rivaldi, J. D.; Sarrouh, B. F.; Fiorilo, R.; Silva, S. S; *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento.* **2009**, 37, 44.
- [5]Ooi, T. L.; Yong, K. C.; Hazimah, A. H.; Dzulkefly, K.; Wan-yunus, M. Z.; *J. Oleo Sci.* **2004**, 53, 29.
- [6]Revista Eletrônica da Universidade do Minho, disponível na internet: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/5858>, acessado em 14/05/2010.
- [7]Ito, T.; Nakashimada, Y.; Senba, K.; Matsui, T.; Nishio, N.; *J. Biosci. Bioeng.* **2005**, 100, 260.
- [8]Silva, G. P.; Mack, M.; Contiero, J.; *Biotechnol. Adv.* **2009**, 27, 30.
- [9]Papanikolaou, S.; Muniglia, L.; Chevalot, I.; Aggelis, G.; Marc, I.; *J. Appl. Microbiol.* **2002**, 92, 737.
- [10]Lages, F.; Lucas, C.; *Biochem. Biophys. Acta*, **1997**, 8, 1322.
- [11]Wang, Z-X.; Zhuge, J.; Fang, H. Y; Prior, B. A.; *Biotechnol. Adv.* **2001**, 19, 201.
- [12]Dieckelmann, G.; Heinz, H.J.; *The Basics of Industrial Oleochemistry*; Mulheim/Ruhr; Peter Pomp: Germany, 1988, p 13.
- [13]Xiu, Z-L.; Chen, X.; Sun, Y-Q.; Zhang, D-J.; *Biochem. Eng J.* **2007**, 33, 42
- [14]Dillis, S. S.; Apperson, A.; Schmidt, M. R.; Saier, M.H.; *Microbiol. Rev.* **1980**, 44, 385.
- [15]Cheng, K-K.; Zhang, J-A.; Liu, D-H.; Sun, Y.; Liu, H-J.; Yang, M-D.; Xu, J-M.; *Process. Biochem.* **2007**, 42, 740.

- [16] Suehara, K.; Kawamoto, Y.; Fujii, E.; Kohda, J.; Nakano, Y.; Yano, T.; *J. Biosci. Bioeng.* **2005**, 100, 437.
- [17] Andrade, J. C.; Vasconcelos, I.; *Biotechnol. Lett.* **2003**, 25, 121.
- [18] González-Pajuelo, M.; Andrade, J. C.; Vasconcelos I.; *J. Ind. Microbiol. Biot.* **2004**, 31, 442.
- [19] Lay, J.; Lee, Y.; Noike, T.; *Water Res.* **1999**, 33, 2579.
- [20] Cheong, D.; Hansen, C.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 72, 635.
- [21] Das, D.; Veziroglu, T. N.; *Int. J. Hydrogen Energy*, **2001**, 26, 13.
- [22] Dunn, S.; *Int. J. Hydrogen Energy*, **2002**, 27, 235.
- [23] Stojic, D. L.; Marceta, M. P.; Sovilj, S. P.; Miljanic, S.S.; *J. Power Sources*, **2003**, 118, 315.
- [24] Kothari, R.; Buddhi, D.; Sawhney, R. L.; *Renew. Sust. Energ. Rev.* **2008**, 12, 553.
- [25] Hawkes, F. R.; Dinsdale, R.; Hawkes, D. L.; Hussy I.; *J. Hydrogen Energy*, **2002**, 27, 1339.
- [26] Vardar-Schara, G.; Maeda T.; Wood, T. K.; *Microbiol. Biotechnol.* **2008**, 1, 107.
- [27] Liu F., Fang, B.; *Biotechnol. J.* **2007**, 2, 374.
- [28] Rachman, M. A.; Nakashimada, Y.; Kakizono, T.; Nishio, N.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, 49, 450.
- [29] Kumar, N.; Das, D.; *Enzyme Microb. Tech.* **2001**, 280.
- [30] Turcot, J.; Bisailon, A.; Hallenbeck, P. C.; *Int. J. Hydrogen Energy*, **2008**, 33, 1465.
- [31] Ueno, Y.; Kawai, T.; Sato, S.; Otsuka, S.; Morimoto, M.; *J. Ferment. Technol. V.* **1995**, 79 (4), 395.
- [32] Mandioca é alternativa para a produção de hidrogênio e etanol. Disponível em: <http://pt.shvoong.com/humanities/1696236-mandioca-%C3%A9-alternativa-para-produ%C3%A7%C3%A3o/>. Acessado em em 14/05/2010.
- [33] Esgoto pode ser fonte para produção de hidrogênio. Disponível em <http://360graus.terra.com.br/ecologia/default.asp?did=26978&action=reportagemn>

Acessado em em 14/05/2010.

[34]Li, Chenlin.; Fang, H. H. P.; *Environ. Sci. Technol.* 2007, 37, 1.

[35]Barbirato, F.; Soucaille, P.; Bories, A.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, 62(12), 4405.

[36]Ahrens, K.; Menzel, K.; Zeng, A. P.; Deckwer, W. D.; *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, 59(5), 544.

[37]Biebl, K.; Menzel, K.; Zeng, A. P.; Deckwer, W. D.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, 52, 289.

[38]Nath, K.; Das, D.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 68, 533.

[39]Willibaldo, S.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; *Biotecnologia Industrial*; Edgard Blucher, São Paulo, 2001.

[40]Kawagoshi, Y.; Hino, N.; Fujimoto, A.; Nakao, M.; Fujita, Y.; Sugimura S.; Fukukawa, K.; *J. Biosci. Bioeng.* **2005**, 100 (5), 524.

[41]Wang, J.; Wan, W.; *Int. J. Hydrogen Energy.* **2008**, 33(12), 2934.

[42]Bisailon, A.; Turcot, I.; Hallenbeck, P. C.; *Int. J. Hydrogen Energy*, **2006**, 3(11), 1504.

[43]Lay, J. J.; Fan, K. S.; Chang, J. I.; Ku, C. H.; *Int. J. Hydrogen Energy*, **2003**, 28(12), 1361.

[44]Neto, B. B.; Scarmino, I. S.; Bruns, R. E.; *Como fazer experimentos. Pesquisa e desenvolvimento na indústria*. Campinas: Unicamp, 2001, p 401.

[45]Rodrigues, M. I.; lemma, A. F.; *Planejamento de experimentos e otimização de processos. Uma estratégia seqüencial de planejamento*. Campinas, 2005, p 326.

[46]Eren, I.; kayamak-ertekin, F.; *J. Food Eng.* **2007**, 79, 344.

[47]Bas, D.; Boyaci, I.; *J. Food Eng.* **2007**, 78, 836.

[48]Wu, K-J.; Saratale, G. D.; Lo, Y-C.; Chen, W-M.; Tseng, Z-J.; Chang, M-C.; Tsai, B-C.; Chang, J-S.; *Bioresource Technol.* **2008**, 7966.

[49]Montgomery, D. C.; *Design and analysis of experiments*. John Wiley & Sons: New York, 1997, p 689.

- [50]APHA.; *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 20th edition, American Public Health Association, Washington, DC, 1998.
- [51]Ginkel, V. S.; Sung, S.; *Environ. Sci. Technol.* **2001**, 35, 4726.
- [52]Mu, Y.; Yu, H-Q.; Wang, G.; *Enzyme Microb. Tech.* **2007**, 40, 947.
- [53]Jo, J. H.; Lee, D. S; Park, D.; Choe, W-S.; Park, J. M.; *Bioresource Technol.* **2008**, 99, 2061.
- [54]Chen, C-C.; Chen, H-P.; Wu, J-H; Lin, C-Y.; *Int. J. Hydrogen Energy*, **2008**, 33, 1573.
- [55]Seol, E.; Kim, S.; Raj, S. M.; Park, S.; *Int. J. Hydrogen Energy*, **2008**. 1.
- [56]Dabrock, B.; Bahl, H.; Gottschalk, G.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1992** 58(4), 1233.
- [57]Zuo, J.; Zuo, Y.; Zhang, W.; *Water Sci. Technol.* **2005**, 52, 31.
- [58]Turker, L.; Gumus, S.; Tapan, A.; *J. Sci. Ind. Res. India.* **2008**, 67, 994.
- [59]Ling, C. Y.; Chang, R. C.; *Int. J. Hydrogen Energy*, **2004**, 29(7), 715.
- [60]Yu, H. Q.; Zhu, W. R.; Zhang, H. S.; *Int. J. Hydrogen Energy*, **2002**, 27(11), 1359.
- [61]Oh, Y. K.; Seol, E. H., Lee, E. Y.; Park, S.; *Int. J. Hydrogen Energy*, **2002**, 27 (11), 1373.
- [62]Mohan, S. V; Babu, V. L.; Sarma, P. N.; *Bioresource Technol.* **2008**, 99, 59.
- [63]Yang, H.; Shen, J.; *Int. J. Hydrogen Energy.* **2006**, 31, 2137.
- [64]Zhang, Y. F.; Shen, J. Q.; *Int. J. Hydrogen Energy.* **2006**, 31, 441.
- [65]Ren, N. Q.; Wang, B. Z.; Huang, J. C.; *Biotechnol. Bioeng*, **1997**, 54, 428.
- [66]Deckwer, W. D.; *Microbiol. Rev.* **1995**, 16, 143.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)