



# XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

## Avaliação do Potencial Fermentativo da Glicerina para Produção de Hidrogênio Biológico

Mariana de Oliveira Faber<sup>1</sup> e Viridiana Santana Ferreira-Leitão<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Tecnologia – Laboratório de Biocatálise, Divisão de Catálise e Processos Químicos  
CEP:20081-312, n° 82/302. Rio de Janeiro/RJ – E-mail: mariana.faber@int.gov.br

### RESUMO

*O aumento da produção de biodiesel nos últimos anos acarretou o aumento da quantidade de glicerina residual deste processo. Uma forma interessante de aproveitar este resíduo é utilizando-o como substrato para a produção de hidrogênio, através do processo de fermentação anaeróbia, no qual as enzimas hidrogenases atuam na etapa de oxidação do hidrogênio ( $H^+$ ) para a produção de hidrogênio biológico ( $bioH_2$ ). Neste trabalho avaliou-se o potencial fermentativo da glicerina na produção de hidrogênio biológico, tendo como agente microbiano o lodo anaeróbio de uma estação de tratamento de esgoto. Este processo mostrou-se atrativo ao possibilitar a produção de 2,44 mols de hidrogênio para cada mol de glicerol contido no resíduo da produção de biodiesel, com consumo de 99,37% do substrato disponibilizado para a fermentação.*

Palavras-chave: Hidrogênio Biológico, Glicerina, Aproveitamento de Resíduo, Fermentação Anaeróbia, Hidrogenases.

### INTRODUÇÃO

O hidrogênio é um gás de grande interesse, com aplicação em diferentes ramos da indústria química, como na produção de fertilizantes, no tratamento de petróleo e como fluido de refrigeração. O uso do hidrogênio como combustível é vantajoso tanto do ponto de vista ambiental quanto do ponto de vista energético, pois sua combustão gera três vezes mais energia que os combustíveis fósseis usuais (gasolina e diesel) tendo apenas vapor d'água como subproduto (WONG, WU & JUAN, 2014).

A condução do processo em pressão atmosférica e valores reduzidos de temperatura (30 – 40°C), além da possibilidade de utilização de resíduos industriais como matéria-prima tornam a produção biológica de hidrogênio bastante atrativa (CHEN *et al.*, 2015; ELSAMADONY & TAWFIK, 2015; GIOANNIS *et al.*, 2014; MA *et al.*, 2011; PATTRA *et al.*, 2008; REN *et al.*, 2009; TENCA *et al.*, 2011) frente aos demais processos.

A atuação das enzimas hidrogenases tem papel fundamental na produção de hidrogênio biológico. Estas enzimas estão presentes tanto nos microrganismos produtores de  $H_2$  quanto nos consumidores deste gás, catalisando a reação de oxidação do hidrogênio ( $2H^+ \leftrightarrow H_2$ ). As hidrogenases são classificadas de acordo com o tipo de metal presente em seu sítio ativo, desta forma, as [Fe-Fe]-hidrogenases são comumente encontradas nos microrganismos produtores de  $H_2$ , enquanto as [Ni-Fe]-hidrogenases e as [Ni-Fe-Se]-hidrogenases são relacionadas aos microrganismos consumidores de  $H_2$  (DAS *et al.*, 2006). Muitos autores



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

relacionam o nível de expressão de hidrogenases à produção de  $H_2$ , principalmente em bactérias do gênero *Clostridium* (WANG, OLSON e CHANG, 2008; CHANG *et al.*, 2006.)

Neste trabalho foi avaliado o potencial da glicerina proveniente do processo de produção de biodiesel como matéria-prima para a geração de hidrogênio, utilizando como agentes fermentativos as bactérias anaeróbias presentes no lodo biológico de uma estação de tratamento de esgoto, inóculo rico em bactérias do gênero *Clostridium* (produtores de [Fe-Fe]-hidrogenases), mas também arqueias metanogênicas consumidoras de  $H_2$ .

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Inóculo e Substrato

Utilizou-se como inóculo um consórcio de bactérias provenientes do lodo anaeróbio, gentilmente cedido pela CEDAE, coletado na estação de tratamento de esgoto localizada no Rio de Janeiro/RJ. Este material biológico foi caracterizado quanto ao teor de sólidos suspensos voláteis (SSV) obtendo-se o valor de 39,85 g/L. Com o objetivo de inibir a ação de arqueias metanogênicas presentes no lodo anaeróbio, o mesmo foi submetido a um pré-tratamento ácido (pH 2,0; 60 min.), com ajuste de pH feito por adição de HCl 10M ou NaOH 5M.

A glicerina residual de um processo de produção de Biodiesel foi utilizada como fonte de carbono para as fermentações. A demanda química de oxigênio (DQO) desta glicerina foi de 16,22 kgO<sub>2</sub>/L e o teor de glicerol foi de 14,6 mol/L.

#### Fermentação

A avaliação do potencial fermentativo da glicerina residual do biodiesel foi realizada em quintuplicata, utilizando-se frascos tipo penicilina de 100 mL, contendo 90 mL de meio de produção, composto por: lodo anaeróbio, glicerina e água. A proporção entre os componentes do meio variou de acordo com a relação DQO:SSV desejada. O ajuste do pH a valores de interesse (5,5; 6,5 e 7,5) foi realizado sob adição de HCl 10M/ NaOH 5M. Este meio de produção foi purgado com N<sub>2</sub> por 45 s para assegurar a ausência de O<sub>2</sub>, estabelecendo-se um ambiente propício para a atuação das bactérias anaeróbias presentes no lodo. Em seguida os frascos foram lacrados e encubados a 160 rpm nas temperaturas avaliadas (35°C ou 40°C).

#### Métodos Analíticos

Em todos os experimentos coletou-se amostras das fases gasosa e líquida.

Amostras da fase gasosa foram analisadas por cromatografia gasosa seguindo a metodologia descrita por Sá e colaboradores (2015) para quantificação de hidrogênio.

Para quantificação dos teores de glicerol, 1,3-propanodiol (PDO), ácido acético e ácido butírico utilizou-se amostras da fase líquida. Estas amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 30 min. O sobrenadante obtido foi filtrado com membranas 0,22 µm e analisado por cromatografia líquida seguindo a metodologia descrita por Sá e colaboradores (2013).

A concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) do lodo anaeróbio e a demanda química de oxigênio (DQO) da glicerina foram determinadas de acordo com metodologias descritas em Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (1998).

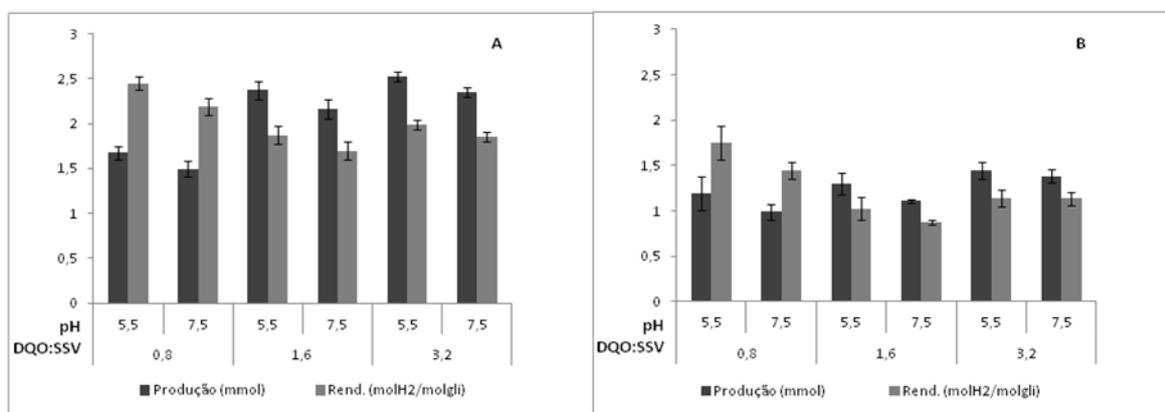
### RESULTADOS E DISCUSSÕES

O consumo da glicerina pelo consórcio microbiano presente no lodo anaeróbio se dá em três fases: acidogênese, acetogênese e metanogênese. Nesta última etapa ocorre o consumo do  $H_2$  para formação de metano pelas arqueias metanogênicas. O pré-tratamento do



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

inóculo foi realizado com objetivo de inibir a ação destes microrganismos, porém as arqueias metanogênicas não são completamente eliminadas pelo pré-tratamento ácido. Comparando-se os ensaios realizados em pH 5,5 com aqueles realizados em pH 7,5 (figura 1), observou-se a superioridade dos resultados obtidos em pH 5,5. A faixa de pH entre 6 e 8 favorece a atuação das arqueias metanogênicas, portanto em pH 5,5 espera-se que a população de microrganismos consumidores de H<sub>2</sub> esteja inibida, que a população de microrganismos produtores do gás de interesse esteja enriquecida e, conseqüentemente, que haja maior quantidade de H<sub>2</sub> no meio.



**Figura 1 - Produção e Rendimento de H<sub>2</sub> via fermentação anaeróbia empregando-se diferentes valores de pH e DQO:SSV. Tempo de fermentação: 23 h, Temperaturas: 35°C (A) e 40°C (B)**

Na figura 1 pode-se observar também que os ensaios realizados a 35°C (A) possibilitaram melhores resultados, tanto em termos de produção de H<sub>2</sub> quanto em termos de rendimento, quando comparados com os ensaios realizados a 40°C (B), indicando que a temperatura de 35°C é mais propícia para a produção de H<sub>2</sub>.

**Tabela 1 - Rendimento de H<sub>2</sub> e Consumo de Glicerol em Diferentes Condições de Fermentação**

T(°C)	DQO:SSV	pH	Rend. (molH <sub>2</sub> /molgli)	Consumo de Glicerol
35	0,8	5,5	2,44 ± 0,07	99,37%
		7,5	2,19 ± 0,08	99,18%
	1,6	5,5	1,87 ± 0,09	97,82%
		7,5	1,70 ± 0,10	97,98%
	3,2	5,5	1,98 ± 0,05	90,44%
		7,5	1,85 ± 0,05	90,17%
40	0,8	5,5	1,75 ± 0,18	89,96%
		7,5	1,44 ± 0,08	87,82%
	1,6	5,5	1,02 ± 0,12	86,93%
		7,5	0,87 ± 0,02	85,89%
	3,2	5,5	1,14 ± 0,09	57,45%
		7,5	1,14 ± 0,07	49,58%



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Nos ensaios em que se empregou razões DQO:SSV menores o consumo de glicerol aproximou-se da totalidade, como pode ser observado na tabela 1, permitindo maiores rendimentos, enquanto nos ensaios em que se empregou razão DQO:SSV mais elevada a produção de H<sub>2</sub> foi superior, devido à maior oferta de substrato no meio, porém o consumo deste substrato não foi completo, levando à redução do rendimento.

### CONCLUSÕES

A aplicação de resíduos industriais como matérias-primas para processos biotecnológicos é de grande importância para o desenvolvimento sustentável e para a consolidação da Química Verde no Brasil. Neste contexto, a glicerina gerada no processo de produção do biodiesel mostrou-se um substrato promissor para a produção de hidrogênio biológico, vetor energético atrativo no cenário atual.

Desta forma, a utilização da glicerina residual como substrato para a fermentação anaeróbia a 35°C, pH 5,5 e razão DQO:SSV de 0,8 possibilitou a produção de 1,67 mmol de H<sub>2</sub>, representando o rendimento de 2,44 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>glicerol</sub> e a produtividade de 0,1 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/(mol<sub>glicerol</sub>.h<sup>-1</sup>).

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APHA. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20<sup>th</sup> edition.
- CHANG JJ, CHEN WE, SHIH SY, YU SJ, LAY JJ, WEN FS, HUANG CC. 2006. Molecular detection of the clostridia in an anaerobic biohydrogen fermentation system by hydrogenase mRNA-targeted reverse transcription-PCR. *Applied Microbiology Biotechnology* 70:598-604.
- Chen P, Wang Y, Yan L, Wang Y, Li S, Yan X, Wang N, Liang N, Li H. 2015. Feasibility of biohydrogen production from industrial wastes using defined microbial co-culture. *Biological Research* 48:24.
- DAS D, DUTTA T, NATH K, KOTAY SM, DAS AK, VEZIROGLU TN. 2006. Role of Fe hydrogenase in biological hydrogen production. *Current Science* 90:1627-1637.
- Elsamadony M, Tawfik A. 2015. Potential of biohydrogen production from organic fraction of municipal Gioannis GD, Friargiu M, Massi E, Muntoni A, Poletini A, Pomi R, Spiga D. 2014. Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey: Influence of pH. *Int. journal of hydrogen energy* 39:20930-2094.
- Ma S, Wang H, Wang Y, Bu H, Bai J. 2011. Bio-hydrogen production from cornstalk wastes by orthogonal design method. *Renewable Energy* 36:709-713.
- Patra S, Sangyoka S, Boonmee M, Reungsang A. 2008. Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. *Int. journal of hydrogen energy* 33:5256-5265.
- Ren N, Wang A, Cao G, Xu J, Gao L. 2009. Bioconversion of lignocellulosic biomass to hydrogen: Potential and challenges. *Biotechnology Advances* 27:1051-1060.
- Sá LRV, Cammarota MC, Oliveira TC, Oliveira EMM, Matos A, Ferreira-Leitão VS. 2013. Pentoses, hexoses and glycerin as substrates for biohydrogen production: An approach for Brazilian biofuel integration. *Int. journal of hydrogen energy* 38:2986-2997.
- Sá LRV, Moutta RO, Bom EPS, Cammarota MC, Ferreira-Leitão VS. 2015. Fermentative biohydrogen production using hemicellulose fractions: Analytical validation for C5 and C6-sugars, acids and inhibitors by HPLC. *Int. journal of hydrogen energy* 40:13888-3900.
- solid waste (OFMSW) using pilot-scale dry anaerobic reactor. *Bioresource Technology* 196:9-16.
- Tenca A, Schievano A, Perazzolo F, Adani F, Oberti R. 2011. Biohydrogen from thermophilic co-fermentation of swine manure with fruit and vegetable waste: Maximizing stable production without pH control. *Bioresource Technology* 102:8582-8588.
- Wong YM, Wu TY, Juan JC. 2014. A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 34:471-482.
- WANG MY, OLSON BH, CHANG JS. 2008. Relationship among growth parameters for *Clostridium butyricum*, *hydA* gene expression, and biohydrogen production in a sucrose-supplemented batch reactor. *Applied Microbiology Biotechnology* 78:525-532.