



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA GEOGRÁFICA, GEOFÍSICA E ENERGIA

Produção de biohidrogénio por fermentação anaeróbia,  
a partir de resíduos fermentescíveis

Ricardo Miguel de Sousa Carapeto Correia

Mestrado em Engenharia da Energia e do Ambiente

2009



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA GEOGRÁFICA, GEOFÍSICA E ENERGIA

# Produção de biohidrogénio por fermentação aneróbia, a partir de resíduos fermentescíveis

Ricardo Miguel de Sousa Carapeto Correia

Mestrado em Engenharia da Energia e do Ambiente

Trabalho de Projecto orientado pela Dra. Paula Alexandra S. Soares Marques e Prof.Doutor  
Jorge Maia Alves

**2009**

## *Agradecimentos*

Aproveito esta oportunidade para agradecer a Dra Paula Marques, minha orientadora neste trabalho, pela superba orientação científica, elevado nível de exigência, sentido de companheirismo e bom humor, que tanto contribuíram para a minha aprendizagem durante este estágio.

Este trabalho não teria sido possível sem a preciosa ajuda da Eng.<sup>a</sup> Lourdes Bartolomeu, Graça Conceição, Dr.<sup>a</sup> Paula Passarinho, Natércia Sousa e Dr.<sup>a</sup> Cristina Justino, às quais, gostaria de expressar o meus sinceros agradecimentos.

Agradeço a todos os estagiários e bolsiros, por toda a ajuda prestada e por terem tornado a minha estadia no estágio muito agradável.

Gostaria de agradecer ao grupo de investigadores formado por Marques S, L Alves, JC Roseiro e FM Gírio, pela cedência do hidrolisado proveniente da produção da pasta de papel, o qual permitiu a realização deste trabalho.

Maca, Di, Mãe e Pai, este trabalho é dedicado a vocês, adoro-vos!

## Abstract

As the world's energy need has been increasing exponentially, it is clear that reducing the dependence on fossil fuels is essential, given the decline of its reserves and the pollution generated by its use for energy. In this context, hydrogen is considered as a "clean" alternative, and a possible viable energy carrier for the future.

The biological production of hydrogen (biohydrogen) represents only about 1% of total production. However, once this process has a favorable energy balance compared to conventional processes, it has been subjected to development during past years, aiming at the improving and increasing yields.

In this study, a microbiological anaerobic production of hydrogen, using different carbon sources, with simultaneous recovery of industrial waste, was conducted.

Thus, in the first phase, based on previous studies with glycerol contained in wastes from the production of biodiesel as substrate, the composition of fermentation medium, in terms of concentration of the most economic valuable compounds (tryptone and yeast extract), was optimized according to the methodology of the Central Composite Design (DCC).

In a second phase, the production of H<sub>2</sub>, under the same operating conditions, using glucose and xylose in synthetic medium and contained in paper sludge hydrolysates, as carbon source, was evaluated.

Finally, the effect of the volume of headspace and the volume of the liquid phase on the process, was carried out.

The results showed that the increase of tryptone and yeast extract concentration resulted in the increase in the volume of hydrogen produced and simultaneously in the decrease in the volume ratio H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, suggesting that in terms of economic analysis, there should be a commitment between the two factors

Moreover, it was observed that the performance of the bacteria was not significantly affected by the presence of compounds other than glucose and xylose in paper hydrolysates, which is an advantage, considering the application of these process to a real system.

Finally, it was found that the increase in the headspace with the increase of the ratio  $V_{\text{Total,reactor}} / V_{\text{liquid phase}}$ , was more efficient in terms of increasing the volumetric efficiency of the process (from 2.5 to 4.5 mL H<sub>2</sub>/mL fermentation medium) than the increase in the volume of the liquid phase at constant ratio, leading to similar values of volumetric efficiency (between 2 and 2.5 mL H<sub>2</sub>/mL fermentation medium).

Key-words: (hydrogen , *Enterobacter aerogenes*, wastes, glycerol, glucose and xylose)

## Resumo

As necessidades energéticas mundiais têm aumentado exponencialmente e a redução da dependência dos combustíveis fósseis é imprescindível, dada a diminuição das suas reservas e a poluição gerada pela sua utilização para obtenção de energia. Nesse sentido, o hidrogénio é considerado uma alternativa "limpa", viável e um possível vector energético do futuro.

Actualmente, a produção de hidrogénio por via biológica (biohidrogénio) representa apenas cerca de 1% do total produzido. Contudo, sendo este um processo com balanço energético favorável relativamente aos convencionais, têm vindo a desenvolver-se estudos no sentido da sua optimização e aumento dos rendimentos obtidos.

Neste trabalho, desenvolveu-se um processo microbiológico anaeróbio de produção de hidrogénio, a partir de diferentes fontes de carbono, com valorização simultânea de resíduos industriais.

Assim, numa primeira fase e com base em estudos realizados anteriormente com glicerol contido em resíduos da produção de biodiesel, como substrato, optimizou-se a composição do meio de

fermentação, em termos da concentração dos compostos de maior valor económico (triptona e extracto de levedura), pela metodologia do Desenho Composto Central DCC).

Numa segunda fase, avaliou-se a produção de  $H_2$  utilizando como substrato, glucose e xilose em meio sintético e contidos em hidrolisados da produção da pasta de papel, nas mesmas condições operacionais.

Por último, estudou-se o efeito do volume da *headspace* e do volume da fase líquida, sobre a resposta do sistema.

Os resultados mostraram que o aumento das concentrações de triptona e de extracto de levedura conduziram a um aumento no volume de hidrogénio produzido mas a um decréscimo da razão volumétrica  $H_2/CO_2$ , o que sugere que, em termos de análise económica, deverá existir um compromisso entre os dois parâmetros.

Além disso, foi também observado que o desempenho da bactéria não foi influenciado significativamente, pela presença de outros compostos além da glucose e xilose, num hidrolisado obtido por via enzimática, a partir de lamas da reciclagem de papel, o que é uma vantagem em termos de aplicação deste processo a um sistema real.

Por último, verificou-se que o aumento do volume da *headspace* com o aumento da razão  $V_{T,reactor}/V_{fase\ líquida}$  foi mais eficiente, em termos do aumento do rendimento volumétrico do processo (de 2,5 para 4,5 mL  $H_2$ /mL meio de fermentação), do que o aumento do volume da fase líquida mantendo constante a referida razão, conduzindo a valores similares de rendimentos volumétricos (entre 2 e 2.5 mL  $H_2$ /mL meio de fermentação).

Palavras-chave: (hidrogénio , *Enterobacter aerogenes*, resíduos, glicerol, glucose e xilose)

# Índice

1.	Revisão da literatura.....	3
1.1	Panorama energético.....	3
1.2	Hidrogénio .....	3
1.3	Processos biológicos de produção de hidrogénio.....	4
1.3.1	Produção de hidrogénio por microalgas .....	4
1.3.2	Produção de hidrogénio por bactérias fotofermentativas .....	4
1.3.1	Digestão anaeróbia .....	4
1.3.2	Fermentação anaeróbia ( <i>dark fermentation</i> ).....	5
1.3.2.1	Parâmetros de influência no processo de <i>dark fermentation</i> .....	7
1.3.2.2	Sistema híbrido .....	8
1.3.2.3	Tipos de substrato .....	9
1.3.2.4	Produção de biohidrogénio a partir de resíduos contendo glicerol.....	10
1.3.2.5	Produção de biohidrogénio a partir de resíduos contendo glucose e xilose.....	10
1.4	Purificação do hidrogénio produzido.....	11
1.5	Biorefinaria .....	11
2.	Materiais e métodos.....	13
2.1	Materiais .....	13
2.1.1	Microrganismo.....	13
2.1.2	Meio de crescimento.....	13
2.1.3	Meio de fermentação .....	13
2.1.4	Reagentes.....	13
2.1.5	Equipamento.....	14
2.1.6	Montagem experimental .....	15
2.2	Métodos .....	16
2.2.1	Obtenção de células de <i>E. aerogenes</i> , utilizadas para a produção de hidrogénio.....	16
2.2.2	Produção de hidrogénio .....	17
2.3	Métodos analíticos .....	18

2.3.1	Determinação do peso seco da biomassa.....	18
2.3.2	Determinação da densidade óptica .....	18
2.3.3	Caracterização dos resíduos utilizados como substrato.....	18
2.3.4	Leitura do volume de gás produzido .....	19
2.3.5	Determinação do conteúdo em H <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub> .....	19
2.3.6	Determinação do conteúdo em etanol.....	19
3.	Resultados e Discussão .....	20
3.1	Obtenção laboratorial de células <i>E. aerogenes</i> .....	20
3.1.1	Crescimento da biomassa .....	20
3.1.2	Recta de calibração, densidade óptica (D.O.) vs peso seco (p.s.).....	20
3.2	Produção de biohidrogénio .....	21
3.2.1	Produção de biohidrogénio a partir de glicerol contido em resíduos da produção de biodiesel .....	21
3.2.1.1	Caraterização físico-química dos resíduos industriais provenientes de uma fábrica de produção de biodiesel .....	22
3.2.1.2	Optimização das concentrações de extracto de levedura e triptona pela Metodologia do Desenho Composto Central (DCC).....	22
3.2.1.3	Consumo de glicerol .....	32
3.2.2	Produção de biohidrogénio a partir de glucose e xilose .....	32
3.2.2.1	Produção de biohidrogénio a partir de soluções sintéticas de glucose e xilose .....	33
3.2.2.2	Produção de biohidrogénio a partir do hidrolisado proveniente de resíduos da produção da pasta do papel .....	33
3.2.2.3	Consumo de glucose e xilose.....	34
3.3	Produção de etanol a partir de glicerol, glucose e xilose .....	34
3.3.1	Influência dos volumes da fase líquida e gasosa .....	36
4.	Conclusões .....	37
5.	Referências .....	38
6.	Anexo – Metodologia do Desenho Composto Central.....	40
6.1	Considerações Gerais.....	40
6.2	Planeamento do desenho factorial.....	40

6.3	Análise de Resultados .....	41
6.3.1	Estimativa dos efeitos e das interações entre factores .....	41
6.3.1.1	Tabela de contraste .....	41
6.3.1.2	Algoritmo de Yates .....	42
6.3.1.3	Avaliação da significância dos efeitos .....	44
6.3.2	Determinação dos coeficientes da equação polinomial de 2ª ordem .....	44
6.3.3	Análise estatística do modelo .....	44
6.4	Metodologia da superfície de resposta.....	45
6.5	Resultados experimentais do Desenho Composto Central.....	46
6.5.1	Desenho Factorial 2 <sup>(2)</sup> .....	46

## Índice de figuras

Fig. 1.1– Esquema da via metabólica por <i>dark fermentation</i> a partir da glucose.....	6
Fig. 2.1 – Montagem utilizada para a produção de hidrogénio por via biológica em regime descontínuo, numa incubadora a 30°C com agitação orbital de 150 rpm. 1. Vaso de reacção; 2 Ponto de recolha de amostra da fase gasosa; 3. Tubo de gás; 4. Bomba peristáltica; 5. Saco de recolha da fase gasosa.....	15
Fig. 2.2 – Esquema da montagem experimental.....	16
Fig. 3.1 – Curva de crescimento de células de <i>E. aerogenes</i> , em meio líquido de crescimento (20 g/L peptona e 5 g/L NaCl) a 30°C com agitação orbital de 150rpm. ....	20
Fig. 3.2 – Recta de calibração, densidade óptica D.O. vs peso seco (p.s.) de suspensões de células de <i>E. aerogenes</i> .....	21
Fig. 3.3 – Superfície de resposta para a razão volumétrica H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> obtida para o saco de recolha. Condições experimentais:[biomassa]=0,38 g/L; [glicerol]=27 g/L; T=30°C; V <sub>total do reactor</sub> /V <sub>fase líquida</sub> =2,3; agitação orbital de 150 rpm; [triptona]=1,2-4,3; [extracto de levedura]=0,5-5 g/L.....	26
Fig. 3.4 – Superfície de resposta para a razão volumétrica H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> obtida na <i>Headspace</i> . Condições experimentais:[biomassa]=0,38 g/L; [glicerol]=27 g/L; T=30°C; V <sub>total do reactor</sub> /V <sub>fase líquida</sub> =2,3; agitação orbital de 150 rpm; [triptona]=1,2-4,3; [extracto de levedura]=1,2-4,3.....	27
Fig. 3.5 – Superfície de resposta para a razão volumétrica H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> tendo em conta o sistema global. Condições experimentais:[biomassa]=0,38 g/L; [glicerol]=27 g/L; T=30°C; V <sub>total do reactor</sub> /V <sub>fase líquida</sub> =2,3; agitação orbital de 150 rpm; [triptona]=0,5-5; [extracto de levedura]=0,5-5 .....	28
Fig. 3.6 – Superfície de resposta para o volume de hidrogénio produzido tendo em conta o sistema global (saco de recolha e <i>Headspace</i> ) em função das concentrações de triptona e extracto de levedura. Condições experimentais:[biomassa]=0,38 g/L; [glicerol]=27 g/L; T=30°C; V <sub>total do reactor</sub> /V <sub>fase líquida</sub> =2,3; agitação orbital de 150 rpm; [triptona]=1,2-4,3; [extracto de levedura]=1,2-4,3 .....	30
Fig. 3.7 – Razão volumétrica H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (●) e volume de hidrogénio produzido (■), para concentrações iguais de triptona e extracto de levedura. Condições experimentais:[biomassa]=0,38 g/L; [glicerol]=27 g/L; T=30°C; V <sub>total do reactor</sub> /V <sub>fase líquida</sub> =2,3; agitação orbital de 150 rpm; [triptona]=0,5-5; [extracto de levedura]=0,5-5.....	31

## Índice de tabelas

Tabela 1.3- Comparação entre a produção de H <sub>2</sub> e outros compostos utilizando diferentes fontes de carbono, por <i>E. aerogenes</i> HU-101 [Nakashimada et al. (2002)] .....	10
Tabela 2.1 - Composição do meio de crescimento da bactéria <i>E. aerogenes</i> .....	13
Tabela 2.2 - Reagentes utilizados para a determinação de glicerol em resíduos da produção de biodiesel. ....	13
Tabela 2.4 - Parâmetros estudados, níveis e expansão considerados para a optimização do processo de produção de biohidrogénio, pela metodologia DCC .....	17
Tabela 3.1 - Caracterização do resíduo industrial contendo glicerol, proveniente da produção de biodiesel .....	22
Tabela 3.2 - Razão volumétrica H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> em função da triptona e extracto de levedura, obtida pela metodologia do Desenho Composto Central. Condições experimentais:[biomassa]=0,38 g/L; [glicerol] <sub>inicial</sub> =27 g/L; T=30°C; V <sub>total do reactor</sub> /V <sub>fase líquida</sub> =2,3; agitação orbital de 150 rpm; [triptona]=0,5-5 g/L; [extracto de levedura]=0,5-5 g/L.....	23
Tabela 3.3 – Estimativa dos efeitos da concentração de triptona e da concentração de extracto de levedura e respectiva interacção, no saco de recolha, na <i>Headspace</i> e no sistema global, da fase gasosa sobre o valor da razão volumétrica H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> .....	24
Tabela 3.5- Volume de hidrogénio em função das concentrações de triptona e extracto de levedura, para o sistema global, para as condições definidas pela metodologia do DCC. Condições experimentais: [biomassa]=0,38 g/L; [glicerol] <sub>inicial</sub> =27 g/L; T=30°C; V <sub>total do reactor</sub> /V <sub>fase líquida</sub> =2,3; agitação orbital de 150 rpm; [triptona]=0,5-5 g/L; [extracto de levedura]=0,5-5 g/L.....	29
Tabela 3.6 - Estimativas dos efeitos e das interacções entre a triptona e extracto de levedura sobre o volume de H <sub>2</sub> para o sistema global, com base na construção das tabelas de contrastes.....	29
Tabela 3.7- valores de teste F e coeficiente de correlação r <sup>2</sup> .....	30
Tabela 3.8 - Variação do consumo de glicerol para as diferentes concentrações de triptona e extracto de levedura. Condições experimentais: [biomassa]=0,38 g/L; [glicerol] <sub>inicial</sub> =27 g/L; T=30°C; V <sub>total do reactor</sub> /V <sub>fase líquida</sub> =2,3; agitação orbital de 150 rpm; [triptona]=0,5-5 g/L; [extracto de levedura]=0,5-5 g/L .....	32
Tabela 3.9 – Produção de biohidrogénio a partir de glucose e xilose em soluções sintéticas. Condições experimentais: [biomassa]=0,38 g/L; T=30°C; V <sub>reactor</sub> /V <sub>líquido</sub> =2,3; agitação orbital de 150 rpm; [triptona]= 5 g/L; [extracto de levedura]= 5 g/L.....	33

Tabela 3.10 – Comparação entre a produção de hidrogénio a partir do hidrolisado e de soluções sintéticas. Condições experimentais: [biomassa]=0,38 g/L; T=30°C; $V_{\text{total do reactor}}/V_{\text{fase líquida}} = 2,3$ ; agitação orbital de 150 rpm; [triptona]= 5 g/L; [extracto de levedura]= 5 g/L .....	34
Tabela 3.11 – Consumo de glucose e xilose na solução sintética e no hidrolisado. Condições experimentais: [biomassa]=0,38 g/L; T=30°C; $V_{\text{total do reactor}}/V_{\text{fase líquida}} = 2,3$ ; agitação orbital de 150 rpm; [triptona]= 5 g/L; [extracto de levedura]= 5 g/L.....	34
Tabela 3.12 – Conteúdo em etanol na fase líquida em função das concentrações de triptona e extracto de levedura, a partir do glicerol. Condições experimentais: [biomassa]=0,38 g/L; T=30°C; $V_{\text{total do reactor}}/V_{\text{fase líquida}} = 2,3$ ; agitação orbital de 150 rpm; [triptona]= 0,5-5 g/L; [extracto de levedura]= 0,5-5 g/L.....	35
Tabela 3.13 – Conteúdo em etanol na fase líquida a partir da glucose e xilose. Condições experimentais: [biomassa]=0,38 g/L; T=30°C; $V_{\text{total do reactor}}/V_{\text{fase líquida}} = 2,3$ ; agitação orbital de 150 rpm; [triptona]=5 g/L; [extracto de levedura]=5 g/L.....	35
Tabela 3.14– Efeito da variação do volume da <i>Headspace</i> e da fase líquida. Condições experimentais: [biomassa]=0,38 g/L; [glucose]=10 g/L; [xilose]=2 g/L; T=30°C; $V_{\text{total do reactor}}/V_{\text{fase líquida}} = 2,3-6,4$ ; agitação orbital de 150 rpm; [triptona]= 5 g/L; [extracto de levedura]=5 g/L.....	36
Tabela 6.1– Planeamento do desenho factorial para dois parâmetros a dois níveis (-1/+1).....	41
Tabela 6.2– Planeamento do desenho factorial expandido para dois parâmetros a dois níveis (1,414/+1,414).....	41
Tabela 6.3 - Tabela de contraste para o desenho factorial $2^{(2)}$ , para os factores: concentração de triptona (A) e concentração de extracto de levedura (B). A resposta considerada foi a razão volumétrica $H_2/CO_2$ .....	42
Tabela 6.4 - Aplicação do algoritmo de Yates, no desenho factorial $2^{(2)}$ , na determinação do efeito e da interacção dos factores: concentração de triptona (A), concentração de extracto de levedura (B). A resposta considerada foi a razão volumétrica $H_2/CO_2$ no saco de recolha .....	43
Tabela 6.5- Aplicação do algoritmo de Yates, no desenho factorial $2^{(2)}$ , na determinação do efeito e da interacção dos factores: concentração de triptona (A), concentração de extracto de levedura (B). A resposta considerada foi a razão volumétrica $H_2/CO_2$ na <i>Headspace</i> .....	43
Tabela 6.6- Aplicação do algoritmo de Yates, no desenho factorial $2^{(2)}$ , na determinação do efeito e da interacção dos factores: concentração de triptona (A), concentração de extracto de levedura (B). A resposta considerada foi a razão volumétrica $H_2/CO_2$ no sistema global .....	43

## 1. Revisão da literatura

### 1.1 Panorama energético

As necessidades energéticas mundiais são satisfeitas em grande parte, a partir de processos que envolvem combustíveis fósseis (cerca de 80% da procura mundial). Se essa tendência se mantiver, prevê-se a situação de esgotamento dos combustíveis fósseis e limitação das reservas existentes. Actualmente, o uso de combustíveis fósseis, tem causado alterações globais no clima, devido principalmente à emissão de substâncias químicas como CO<sub>x</sub>, NO<sub>x</sub>, SO<sub>x</sub>, C<sub>x</sub>H<sub>x</sub>, fuligem, cinzas, gotículas de alcatrão e outros componentes orgânicos, resultado da sua combustão. De modo a minimizar a dependência dos combustíveis fósseis e o seu impacto no ambiente, o hidrogénio é considerado como um vector energético importante no futuro [Das e Veziroglu, (2001)].

Como é do conhecimento geral, o sector dos transportes é responsável por grande percentagem da utilização de combustíveis fósseis líquidos. A substituição total ou parcial da gasolina ou diesel por vectores energéticos renováveis, é sem dúvida, crucial para impedir a crise [Hallenbeck, (2009)].

No âmbito das energias renováveis, o desenvolvimento de processos de produção de energia a partir de biomassa de baixo custo tem vindo a aumentar, nomeadamente na produção de bioetanol, biodiesel e biohidrogénio. Apesar do bioetanol e biodiesel serem no presente, os maiores alvos, o hidrogénio é ainda considerado como a solução mais viável a longo prazo [Lo et al., (2008)].

### 1.2 Hidrogénio

O hidrogénio é o elemento mais abundante no universo, constituindo cerca de três quartos de toda a matéria. Efectivamente, a atmosfera contém aproximadamente 0,07% de hidrogénio, enquanto que a superfície terrestre contém cerca de 0,14%. Trata-se do elemento mais leve, apresentando uma massa volúmica de 0,09 g por litro, enquanto que o mesmo volume de ar apresenta 1,2 g [Das e Veziroglu, (2001)].

Atendendo aos seus benefícios técnicos socio-económicos e ambientais que resultam da sua aplicação, o hidrogénio é considerado por vários autores como o combustível mais promissor do futuro apresentando o valor mais elevado de energia por massa (142 kJ/g) comparativamente aos restantes vectores energéticos e pode ser transportado através de meios convencionais para consumo doméstico/industrial. Trata-se de um gás mais fácil de manusear do que o gás natural. É universalmente aceite como um vector energético ambientalmente limpo, renovável e como uma alternativa ideal aos combustíveis fósseis. A sua oxidação apenas liberta vapor de água. Enquanto combustível, pode ser utilizado tanto em motores de combustão interna como em células de combustível. Actualmente, as indústrias do petróleo e dos fertilizantes são os maiores consumidores de H<sub>2</sub> [Das e Veziroglu, (2008)].

A produção mundial de hidrogénio está descrita na Tabela 1.1.

Tabela 1.1- Produção mundial de hidrogénio a partir de diferentes fontes [Hordeski, (2008)]

Origem	Percentagem (%)
Gás natural	48
Fuel óleo	30
Carvão	18
Electrólise	4

Os processos de produção de hidrogénio tais como, *steam reforming* do gás natural, gasificação do carvão e a electrólise da água são alguns dos mais utilizados. Todavia, estes processos são altamente intensivos energeticamente, ou seja, necessitam de um gasto muito elevado de energia, e a maioria é

prejudicial ao ambiente devido a emissão para o meio ambiente de gases com efeito estufa. Sob este prisma, os processos biológicos ganham maior importância enquanto energias alternativas [Nath e Das, (2004)].

### 1.3 Processos biológicos de produção de hidrogénio

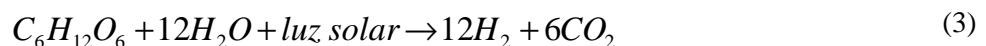
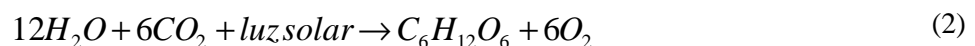
Entre os vários processos de produção de hidrogénio, o biológico apresenta-se como sendo o menos intensivo, dado que pode ocorrer à temperatura e pressão ambientes. Estes processos incluem principalmente, a produção de hidrogénio fotossintética e fermentativa. Apesar do processo fotossintético converter energia solar em hidrogénio, a sua aplicação é bastante limitada devido à baixa eficiência luminosa e a dificuldades no desenho dos reactores. No que respeita à produção fermentativa de hidrogénio, esta apresenta como vantagens, uma grande velocidade de produção e condições operacionais simples. Além disso, pode utilizar variados resíduos orgânicos como fonte de carbono o que é de grande importância pois do ponto de vista económico, além de que permite o tratamento de efluentes e simultaneamente a produção de um energia limpa [Wang e Wan, (2008)].

#### 1.3.1 Produção de hidrogénio por microalgas

As algas verdes e cianobactérias, promovem a separação das moléculas da água em iões hidrogénio e oxigénio através da via directa e indirecta, respectivamente. A conversão da água em hidrogénio molecular pelas algas verdes pode ser representada pela equação 1:

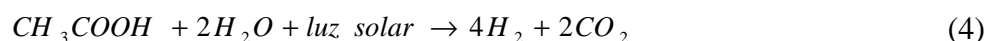


A reacção geral para a formação de hidrogénio a partir da água através das cianobactérias pode ser representada pelas equações 2 e 3:



#### 1.3.2 Produção de hidrogénio por bactérias fotofermentativas

A produção de hidrogénio pelas bactérias fotofermentativas deve-se principalmente à acção da enzima nitrogenase, sob condições de ausência de azoto, utilizando a luz solar e compostos orgânicos (ácidos orgânicos), equação 4.



Estas bactérias fotofermentativas têm sido estudadas há muito tempo devido à sua capacidade de produzir hidrogénio. Podem converter uma vasta gama de resíduos orgânicos de baixo custo como fonte de carbono, em hidrogénio, por acção da luz solar [Das e Veziroglu, (2008)].

#### 1.3.1 Digestão anaeróbia

A digestão anaeróbia é uma tecnologia que permite tratar resíduos e águas residuais, onde o produto final é o biogás: uma mistura de metano (55-75%) e CO<sub>2</sub> (25-45%), os quais podem ser utilizados para

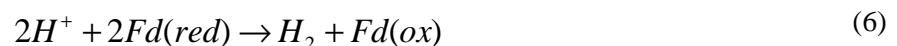
produzir calor, ou gerar eletricidade [Reith et al., (2003)]. O metano pode também ser convertido a hidrogénio a partir de outros processos químicos.

A digestão anaeróbia é levada a cabo por diferentes grupos de microrganismos, que obtêm energia e crescem a partir do metabolismo de compostos orgânicos, em ambiente livre de oxigénio. Este processo pode ser subdividido em 4 fases, de acordo com as características de cada grupo de microrganismos: hidrólise (conversão de biopolímeros insolúveis, em compostos orgânicos solúveis), acidificação (conversão de compostos orgânicos solúveis em ácidos gordos voláteis e CO<sub>2</sub>), acetogénese (conversão de ácidos voláteis em acetato e H<sub>2</sub>) e metanização (conversão de acetato, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> em metano) [Reith et al., (2003)].

### 1.3.2 Fermentação anaeróbia (*dark fermentation*)

A *dark fermentation* é um processo que ocorre em condições anaeróbias (na ausência de oxigénio como aceitador de electrões). Assim, quando a bactéria cresce na presença de substratos orgânicos, estes são degradados por oxidação de modo a fornecer compostos e energia para o seu crescimento. Esta oxidação produz electrões, sendo necessário a sua transferência, de modo a manter a neutralidade eléctrica. Em meio aeróbio, o oxigénio é reduzido e o produto é a água, enquanto que em ambientes anaeróbios, os protões, funcionando como aceitadores de electrões, são reduzidos a hidrogénio molecular.

Durante um processo de fermentação, utilizando como substrato, a glucose, esta é inicialmente convertida a piruvato por via glicolítica. O piruvato por sua vez é oxidado a acetil-CoA, o qual é posteriormente convertido em acetil fosfato resultando na produção de ATP e na produção de iões acetato. A oxidação do piruvato a acetil-CoA requer a redução da ferredoxina (Fd). Esta última, na sua forma reduzida, é oxidada pela enzima hidrogenase, produzindo Fd (oxidado) e libertando electrões que vão formar hidrogénio molecular. A reacção global é representada pelas equações 5 e 6 [Das e Veziroglu, (2008)].



Apresenta-se de seguida a via metabólica da glucose ( Fig. 1.1).

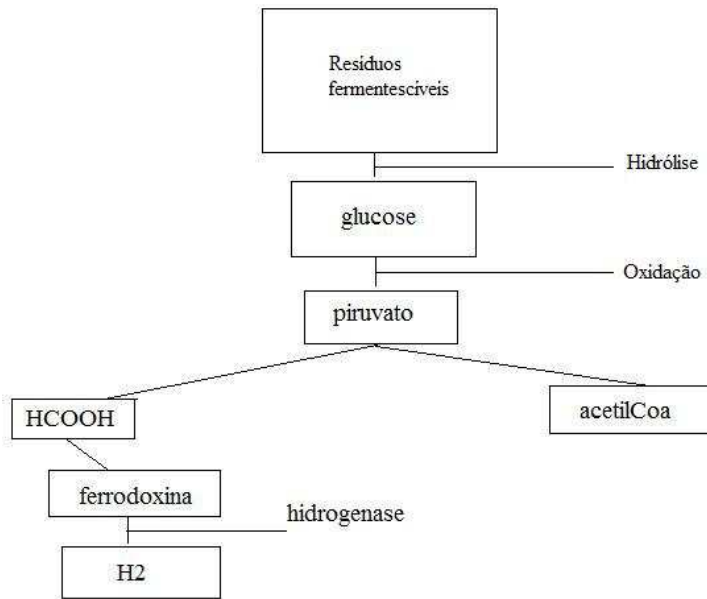


Fig. 1.1– Esquema da via metabólica por *dark fermentation* a partir da glucose.

A fermentação anaeróbia (*dark fermentation*) sendo um processo relativamente simples, permite a produção de hidrogénio a partir de uma vasta gama de substratos, incluindo resíduos industriais e efluentes. Além disso, este processo geralmente ocorre a uma taxa de velocidade elevada e não depende da luz solar [Das e Veziroglu, (2008)].

Num processo microbiológico de produção de hidrogénio, a enzima hidrogenase desempenha um importante papel. Esta enzima tem sido estudado desde 1933 e é surpreendentemente complexa, considerando que promove uma simples reacção química, representada pela equação 7 [Hallenbeck, (2005)].



Os hidratos de carbono, principalmente a glucose, são as fontes de carbono preferenciais para o processo de fermentação, as quais, geralmente dão origem a ácido acético e butírico juntamente com hidrogénio. As bacterias anaeróbias facultativas produzem 2 mol de hidrogénio por mole de glucose, ao passo que as bacterias estritamente anaeróbias produzem 4. Contudo, as facultativas são menos sensíveis ao oxigénio e por vezes são capazes de retomar a produção de hidrogénio após contacto com oxigénio [Das e Veziroglu, (2008)].

A maior desvantagem dos sistemas fermentativos em comparação aos processos convencionais é o baixo rendimento. Em geral, a razão para tal ocorrer, é que o metabolismo anaeróbio evoluiu no sentido de otimizar o crescimento da biomassa, produzindo ácidos orgânicos, e não a produção de hidrogénio [Hallenbeck et al., (2009)].

Assim, em simultâneo com a produção de ácidos gordos voláteis, o processo de *dark fermentation* também produz alcóois, tais como o etanol e o butanol, sendo que a presença de átomos de hidrogénio

nestes sub-produtos implica um decréscimo no rendimento da produção de hidrogénio molecular [Nath e Das, (2004)].

A produção de hidrogénio por *dark fermentation* é influenciada pela concentração de hidrogénio podendo ocorrer a inibição por produto. Assim, o aumento da concentração de H<sub>2</sub>, conduz normalmente, a um desvio da via metabólica no sentido da produção de substratos, tais como o etanol, lactato, acetona, butanol e alanina com conseqüente diminuição do volume de hidrogénio produzido [Nath e Das, (2004)].

### 1.3.2.1 Parâmetros de influência no processo de *dark fermentation*

#### a) Microorganismos produtores de hidrogénio

As bactérias produtoras de hidrogénio podem ser classificadas como, estritamente anaeróbias ou facultativas. Dentro do grupo das estritamente anaeróbias, existem vários microrganismos pertencentes a vários géneros, como por exemplo: *Clostridia* - *C. butyricum*, *C. welchii*, *C. pasteurianum*, *C. beijerincki*. *Rumen bacteria* - *Ruminococcus albus*. No que diz respeito as bactérias anaeróbias facultativas, estas são resistentes ao oxigénio. Estes microrganismos apresentam a vantagem de consumirem rapidamente o oxigénio e desse modo manterem as condições anaeróbias. Ao contrário, as bactérias estritamente anaeróbias, são muito sensíveis ao oxigénio e muitas vezes não sobrevivem em ambientes de baixas concentrações de oxigénio. As espécies facultativas mais utilizadas são a *Enterobacter*, *E. coli* e *Citrobacter* [Reith et al., (2003)].

As bactérias produtoras de hidrogénio podem também ser caracterizadas em função da temperatura de operação: bactérias mesofílicas (25 a 40°C), termofílicas (40 a 65°C) e hipertermofílicas (> 80°C) [Drapcho, (2008)].

Neste estudo, a estirpe da bactéria utilizada, *E. aerogenes*, pertence ao grupo das mesofílicas.

#### b) Temperatura do processo

A temperatura é um dos factores mais importantes no processo de produção de biohidrogénio, na medida em que, foi demonstrado em estudos anteriores que, dependendo da estirpe, existem intervalos ótimos de temperatura para a produção de hidrogénio por fermentação anaeróbia [Wang e Wan, (2008)].

#### c) Tipo de reactor

A produção de hidrogénio por *dark fermentation* pode ser realizada utilizando reactores em regime contínuo ou em regime descontínuo (*batch*). Um elevado número de estudos de *dark fermentation* foram levados a cabo em regime descontínuo (*batch*), pois as condições operacionais neste tipo de regime são simples. Contudo, as operações à escala industrial requerem processos em regime contínuo por razões práticas de engenharia [Wang e Wan, (2008)].

#### d) pH

O pH é um parâmetro muito importante na produção de hidrogénio por processos microbiológicos, na medida em que pode afectar a actividade das enzimas hidrogenases, conduzindo assim a uma alteração na via metabólica. Vários autores demonstraram que numa gama apropriada, o aumento de pH, nomeadamente entre 6-7, pode conduzir ao aumento da produção de hidrogénio por fermentação anaeróbia [Wang e Wan, (2008)].

#### e) Efeito da presença de iões azoto

A presença de azoto no meio de fermentação é importante, pois foi demonstrado em estudos anteriores que o aumento da sua concentração conduziu a um aumento do crescimento da biomassa e por conseguinte a um aumento da produção de hidrogénio. A fonte de azoto mais

utilizada por vários autores foi a amónia, sendo que neste estudo, a fonte de azoto utilizada foi a triptona e o extracto de levedura, que além do azoto fornecem também aminoácidos, vitaminas e carbono [Wang e Wan, (2008)].

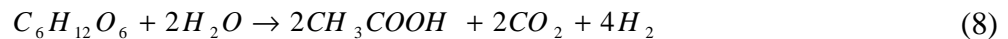
### 1.3.2.2 Sistema híbrido

Como referido anteriormente, alguns dos subprodutos da produção de  $H_2$  por *dark fermentation* são os ácidos gordos voláteis (AGV), os quais são nefastos para o meio ambiente. Assim, com vista ao tratamento do meio resultante da fermentação, vários outros processos podem ser utilizados em seguimento (formando um sistema híbrido), com a produção de outros gases com valor energético, como o biogás ou até mesmo o hidrogénio. De seguida apresentam-se três possíveis sistemas híbridos

a) *Dark fermentation* seguido do processo de fotofermentação

Neste tipo de sistema, os ácidos orgânicos de baixo peso molecular, são depois convertidos em hidrogénio por bactérias fotofermentativas numa segunda fase, utilizando um foto-bioreactor. A reacção global do processo pode ser representada através das equações 8 e 9.

Fase 1. *Dark fermentation*



Fase 2. Fotofermentação



Portanto, teoricamente, é evidente que utilizando a glucose como único substrato na *dark fermentation*, onde o ácido acético é um subproduto predominante, pode se esperar um total de 12 moles de hidrogénio por mole de glucose [Das e Veziroglu, (2008)].

Num estudo, foi produzido com sucesso, hidrogénio utilizando efluentes de lagares de azeite a partir de um sistema híbrido de duas fases, onde o rendimento triplicou quando comparado com a fotofermentação sozinha [Hallenbeck et al., (2009)].

b) *Dark fermentation* seguido do processo de digestão anaeróbia

Outro processo alternativo de metabolizar os ácidos gordos voláteis resultantes do produção de hidrogénio por *dark fermentation* é por digestão anaeróbia. Neste tipo de processo, os ácidos gordos produzidos durante a *dark fermentation* numa primeira fase são convertidos numa segunda fase, em metano ( $CH_4$ ) por bactérias acidogénicas durante a fase de metanização [Hallenbeck, (2009)]. Deste modo, produz-se dois tipos de combustíveis (hidrogénio e metano) e simultaneamente procede-se ao tratamento de subprodutos nefastos ao ambiente como é o caso dos ácidos gordos voláteis.

c) *Dark fermentation* seguido do processo de electrohidrogénese

Nos últimos anos, tem vindo a ser desenvolvido um processo denominado por electrohidrogénese, o qual permite a conversão de ácidos orgânicos em hidrogénio molecular, através de um aparelho denominado por célula electrolítica microbiológica (MEC). Lalaurette e colaboradores realizaram um estudo utilizando os processos de *dark fermentation* e de electrohidrogénese em sequência, onde numa primeira fase produziram hidrogénio a partir de matéria lenhocelulósica, e numa segunda fase produziram hidrogénio a partir dos ácidos gordos voláteis produzidos durante a primeira fase [Lalaurette et al., (2009)].

Numa MEC as bactérias exoelectrogénicas oxidam a matéria orgânica libertando assim, electrões no circuito em direcção ao ânodo e prótons para o meio líquido. Assim, juntamente à diferença de

potencial produzida através das bactérias (0,3V) é necessário fornecer energia externa (0,2V), de maneira a ultrapassar a barreira endotérmica de formação de hidrogénio (0,414V utilizando acetato) [Selembo et al., (2009)].

### 1.3.2.3 Tipos de substrato

Um elevado número de substratos têm sido utilizados para a produção de hidrogénio por via microbiológica, tais como amido, fructose, galactose, glucose, xilose, glicerol, sacarose e lactose, entre os quais, os mais utilizados têm sido a glucose, sacarose e o amido [Wang e Wan, (2008)]. Contudo, nos últimos anos tem vindo a realizar-se estudos a partir de resíduos orgânicos como substratos para a produção de hidrogénio, com vista a tornar a aplicação deste processo economicamente mais viável, entre os quais:

- Resíduos provenientes do sector alimentar e produtos à base de amido
- Materiais lenhocelulósicos
- Resíduos provenientes da indústria de lacticínios
- Resíduos provenientes do óleo de palma
- Resíduos provenientes da produção de biodiesel

Na Tabela 1.2 apresenta-se os rendimentos obtidos por *dark fermentation* a partir de diferentes organismos e substratos.

Tabela 1.2- Rendimentos da produção de H<sub>2</sub> obtidos por *dark fermentation* a partir de diferentes microrganismos e substratos [Kapdan e Kargi, (2006)]

Organismo	Fonte de carbono	Rendimento
<i>Klebsielloxytoca</i> HP1	Glucose	1 mol/mol
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT	Glucose	2,2 mol/mol
<i>Escherichia coli</i>	Glucose	4,73x10 <sup>-8</sup> mol/mol
<i>Hafnia alvei</i>	Glucose	5,87x10 <sup>-8</sup> mol/mol
Lodo	Glucose	2,1 mol/mol
Cultura mista	Glucose	0,9 mol/mol
Cultura mista	Sacarose	300 mL/g
<i>Klebsielle oxytoca</i> HP1	Sacarose	1,5 mol/mol
<i>Clostridia pasteurium</i>	Sacarose	4,8 mol/mol
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT	Sacarose	6 mol/mol
Cultura mista	Sacarose	1,8 mol/mol
<i>Thermoanaerobacterium</i>	Celulose	102 mL/g
<i>Clostridium sp</i>	Celulose microcristalina	2,18 mmol/g
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Amido (20g glucose/L)	1,09 mol/mol
<i>Thermoanaerobacterium</i>	Amido	92 mL/g
<i>Clostridia. pasteurium</i>	Amido	106 mL/g
Cultura mista	Amido (batata)	0,59 mol/mol
Cultura mista	Sumo de beterraba	1,7 mol/mol

Nakashimada e colaboradores (2002), realizaram estudos sobre produção de hidrogénio a partir de vários substratos utilizando a *Enterobacter aerogenes* HU-101. Os resultados experimentais mostraram que o valor máximo para o rendimento foi obtido para o glicerol (Tabela 1.3).

Tabela 1.3- Comparação entre a produção de H<sub>2</sub> e outros compostos utilizando diferentes fontes de carbono, por *E. aerogenes* HU-101 [Nakashimada et al. (2002)]

Substrato	Rendimento						
	(mmol/g substrato)						
	H <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	Etanol	Acetato	Butanodiol	Acetona	Lactato
Gluconato	1,44	4,85	0,86	2,69	1,59	0,11	1,35
Glucose	1,97	8,25	2,59	0,81	2,66	0,1	1,99
Frutose	2,17	8,02	2,73	1,32	2,46	0,15	1,53
Galactose	1,9	7,87	2,65	1,02	2,61	0,12	1,28
Sorbitol	4,96	8,29	5,8	0,74	1,27	0,03	1,08
Manitol	5,2	7,68	5,3	0,37	1,43	0,07	2,15
Glicerol	6,69	7,59	7,05	0,17	0,15	0	1,95

### 1.3.2.4 Produção de biohidrogénio a partir de resíduos contendo glicerol

O glicerol é produzido em grande quantidade durante a produção de biodiesel. Sendo que por cada 45 quilos de biodiesel produzidos por transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais, são produzidos 4,5 quilos de glicerol. Actualmente, este glicerol produzido tem como principal aplicação a indústria da cosmética, mas no entanto, este resíduo bruto possui um valor comercial muito baixo, essencialmente devido às impurezas que contém. Assim, este glicerol tem que ser purificado, o que constitui um processo economicamente pouco rentável, pelo que uma das alternativas para a utilização deste glicerol de baixa qualidade é a sua utilização como substrato para fermentação, como seja a produção de hidrogénio por via biológica. Além disso, a produção de 1,3-propanediol a partir dos resíduos contendo glicerol captou a atenção dos investigadores uma vez que pode ser aplicado enquanto ingrediente base de poliesters [Chong et al. (2009)].

Ito e colaboradores (2005), levaram a cabo um estudo sobre produção de hidrogénio e etanol, por *dark fermentation*, a partir de resíduos da produção de biodiesel utilizando a estirpe da bactéria *Enterobacter aerogenes* HU-101. Os resultados experimentais mostraram que a adição de extracto de levedura e triptona (fontes de vitaminas e aminoácidos) foi necessária para aumentar a produção de hidrogénio, tendo o rendimento máximo obtido foi 1.2 mol H<sub>2</sub>/ mol glicerol para uma concentração inicial de 1.7 g/l de glicerol sob as condições.

Também Seifert e colaboradores (2009), desenvolveram um estudo sobre produção de biohidrogénio por digestão anaeróbia a partir de glicerol puro, utilizando lamas activadas. Os resultados mostraram que o o rendimento foi 0.4 mol H<sub>2</sub>/mol glicerol para uma concentração de 10 g/L glicerol.

### 1.3.2.5 Produção de biohidrogénio a partir de resíduos contendo glucose e xilose

A biomassa contém uma grande quantidade de materiais celulósicos, tais como, celulose, hemicelulose e lignina. Sendo que a fermentação directa da matéria prima celulósica é ineficiente porque a celulose e a hemicelulose não são facilmente assimiláveis para a maioria das bactérias produtoras de hidrogénio. Neste contexto, a melhor via passa por realizar um processo de produção de duas fases, na qual, numa primeira fase, os materiais celulósicos são sujeitos a um processo de hidrólise físico-química ou biológica, seguida da produção de hidrogénio por fermentação anaeróbia. Os principais produtos da hidrólise da celulose e hemicelulose são principalmente, hexose (i.e. glucose) e pentose (i.e. xilose), respectivamente [Lo et al., (2008)].

Ren e colaboradores levaram a cabo estudos de produção de hidrogénio por uma estirpe *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16, isolada de uma lama activada, utilizando como substrato, glucose e xilose presentes em soluções sintéticas em separado e em mistura e presentes em hidrolisados provenientes da colheita de milho.

Os autores verificaram que para concentrações iguais de glucose e xilose presentes em soluções sintéticas e no hidrolisado, o rendimento por mol de substrato máximo obtido foi de 2,4 e 2,3 mol H<sub>2</sub>, respectivamente. Indicando que o desempenho da bactéria não sofreu inibição na presença do hidrolisado comparativamente a solução sintética [Ren et al., (2008)].

Também Kádár (2005), desenvolveu um estudo sobre a produção de hidrogénio por *dark fermentation*, por várias estirpes termófilicas, utilizando como substrato, glucose e xilose em soluções sintéticas e presentes em hidrolisados de resíduos da pasta do papel. Os resultados mostraram que utilizando o hidrolisado, o rendimento foi 54% do limite máximo teórico, e que este foi 84% do rendimento utilizando o meio sintético, sugerindo que o desempenho da bactéria foi alterado na presença do hidrolisado

#### 1.4 Purificação do hidrogénio produzido

A fase gasosa produzida por *dark fermentation*, geralmente não é adequada para o uso directo em outros processos, dado que a sua concentração em hidrogénio não é suficientemente elevada para as aplicações (por exemplo nas células de combustível), como também a presença de outros gases produzidos (CO<sub>2</sub>) podem interferir nas aplicações. Deste modo, a separação do hidrogénio não é apenas importante para o transporte, armazenamento e utilização, como também visa a produção sustentável de biohidrogénio [Bélafi-Bakó et al., (2006)].

Existem vários processos de purificação do gás produzido biologicamente: absorção de CO<sub>2</sub> através de *scrubbers* utilizando uma solução de KOH 50% (m/v); remoção de O<sub>2</sub> a partir de uma solução alcalina de *pyrogallol*; remoção de humidade por um secador ou uma unidade de condensação [Das e Veziroglu, (2008)].

#### 1.5 Biorefinaria

O conceito de biorefinaria é uma instalação onde se realiza a conversão de biomassa (produtos provenientes da agricultura e resíduos industriais/domésticos), através de processos físico-químicos e biológicos, produzindo biocombustíveis, energia, biomateriais, polímeros e compostos químicos. Este conceito pode ser comparado a uma refinaria de petróleo na qual este é processado dando origem a combustíveis, plásticos e petroquímicos. Os produtos recuperados numa biorefinaria abrangem uma vasta gama, desde ingredientes básicos alimentares, até compostos farmacêuticos, e de materiais de construção até polímeros. Os biocombustíveis tais como o etanol, hidrogénio e diesel, assim como compostos bioquímicos tais como o glicerol, ácido cítrico, ácido láctico, isopropanol ou vitaminas, podem ser produzidos para a indústria da energia, alimentar e farmacêutica. Além disso, fibras, adesivos e plásticos biodegradáveis podem ser recuperados para utilização industrial.

Um dos objectivos propostos para a biorefinaria, passa pela emissão nula de gases prejudiciais para o meio ambiente, através da utilização de resíduos, água e calor produzidos na própria biorefinaria como fontes de energia e de matéria prima noutros processos da biorefinaria. O etanol e o diesel, são bons exemplos na medida em que podem ser produzidos em biorefinarias, com aproveitamento dos subprodutos em outros processos. Assim, da produção de etanol por fermentação alcoólica, são produzidos cerca de 0,96 kg de CO<sub>2</sub> / kg de etanol formado, o qual pode ser alimentado a bioreactores para o crescimento de algas, das quais se podem extrair óleos, que podem ser utilizados na produção de biodiesel. Em média 3 kg de CO<sub>2</sub> é consumido por 1 kg de alga [Drapcho et al., (2008)]. Além disso, o hidrogénio produzido por via biológica, pode ser aplicado numa biorefinaria para hidrogenação de óleos para a produção de biodiesel de segunda geração.

Actualmente existem um certo número de centrais-piloto em funcionamento e também projectos de centrais a nível industrial para entrarem em funcionamento nas próximas décadas [Demirbas, (2009)].

## 2. Materiais e métodos

### 2.1 Materiais

#### 2.1.1 Microrganismo

Neste trabalho, utilizou-se, como bactéria fermentativa para a produção de hidrogénio, uma estirpe da *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048 *Sputum*). A sua manutenção em laboratório foi levada a cabo em tubos de ensaio contendo um meio de repicagem sólido inclinado, preparado pela dissolução, a quente, de 40 g/L da mistura caso-Agar (Merck) num litro de água bidestilada.

As culturas foram conservadas a 4°C e repicadas aquando o início de cada experiência.

#### 2.1.2 Meio de crescimento

Antes de cada ensaio as bactérias foram previamente crescidas num meio líquido cuja composição se apresenta na Tabela 2.1, nas condições de T=30°C e 150 rpm (pré-inóculo).

Tabela 2.1 - Composição do meio de crescimento da bactéria *E. aerogenes*.

Reagentes	Concentração (g/L)
Peptona	20
NaCl	5

#### 2.1.3 Meio de fermentação

A composição do meio utilizado em cada experiência, denominado por meio de fermentação ou meio base, encontra-se na Tabela 2.3.

Este meio foi também utilizado por outros autores, para a produção de biohidrogénio por uma estirpe diferente de *E. aerogenes* e tendo como substrato glicerol contido nos resíduos provenientes de uma fábrica de produção de biodiesel em Hiroshima. [Ito et al., (2005)].

#### 2.1.4 Reagentes

Os reagentes utilizados para a determinação do conteúdo em glicerol, nas amostras de resíduos provenientes de uma fábrica portuguesa de produção de biodiesel (Iberol), encontram-se na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Reagentes utilizados para a determinação de glicerol em resíduos da produção de biodiesel.

Reagente	Concentração (mol/L)
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,10
NaOH	0,13
NaOH	0,05
NaIO <sub>4</sub>	0,30
HOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	0,50

Tabela 2.3 - Composição do meio de fermentação.

Reagente	Concentração (g/L)
$K_2HPO_4$	7
$KH_2PO_4$	5,5
$(NH_4)_2SO_4$	1
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,021
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,12
Ácido Nicotínico	0,002
$Na_2SeO_3$	0,000172
$NiCl_2$	0,00002
Triptona	0,5-5
Extracto de levedura	0,5-5
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,5
$H_3BO_3$	0,1
$Na_2EDTA$	0,5
$AlK(SO_4)_2 \cdot H_2O$	0,01
$CuCl_2 \cdot H_2O$	0,001

### 2.1.5 Equipamento

- Incubadora Orbital modelo New Brunswick Scientific CO. Inc Edison, N.J. U.S.A.;
- Incubadora modelo Lab Line instruments, Inc.;
- Balança de bancada Mettler modelo PM4600;
- Centrífuga de bancada Eppendorf AG modelo 5415D;
- Hotte Captain modelo Cruma;
- Vortex modelo VELP Scientific;
- Espectrofotómetro de varrimento HITACHI U2000;
- Cromatógrafo Gasoso VARIAN modelo CP 3800;
- Integrador Shimadzu modelo C-R5A;
- Cromatógrafo Gasoso HP modelo 5890;
- Balança analítica de bancada Mettler Toledo modelo AB204-S;
- Estufa Memmert;
- Centrífuga Beckman modelo J-25I;
- Placa de agitação magnética Fisher Bioblock Scientific modelo 10517;
- Autoclave VITEQUIPA;
- Centrífuga de bancada Thermo Scientific modelo Heraeus multifuge 3SR<sup>+</sup>;
- Bomba Peristáltica Ecoline;

- Medidor de pH WTW, modelo pH 340-A

### 2.1.6 Montagem experimental

A montagem utilizada, para levar a cabo os estudos de produção de biohidrogénio por fermentação anaeróbia, foi definida anteriormente [Neves, (2009) e Marques et al., (2009)].

Os estudos foram realizados numa incubadora, com agitação orbital de 150 rpm e  $T=30^{\circ}\text{C}$ , em que o conjunto consistiu num *erlenmeyer* com ligação a uma cabeça de vidro de duas saídas. Uma destas saídas teve como funcionalidade recolher amostras da fase gasosa na *Headspace*, para avaliação da sua composição em termos de cada um dos gases presentes, por cromatografia gasosa. A outra saída foi ligada a um saco de recolha apropriado para a recolha de gases com moléculas de baixo peso molecular (SKC com a referência 245-05). Entre a saída do reactor e o saco, foi colocada uma bomba peristáltica, para remoção contínua da fase gasosa formada ao longo do processo (Fig. 2.1).



Fig. 2.1 – Montagem utilizada para a produção de hidrogénio por via biológica em regime descontínuo, numa incubadora a  $30^{\circ}\text{C}$  com agitação orbital de 150 rpm.  
1. Vaso de reacção; 2 Ponto de recolha de amostra da fase gasosa; 3. Tubo de gás; 4. Bomba peristáltica; 5. Saco de recolha da fase gasosa.

A Fig. 2.2 apresenta de forma esquemática a montagem experimental utilizada para a produção de hidrogénio.



Fig. 2.2 – Esquema da montagem experimental

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Obtenção de células de *E. aerogenes*, utilizadas para a produção de hidrogénio

Para a produção das células de *E. aerogenes*, em meio líquido, preparou-se o meio de crescimento com a composição indicada na Tabela 2.1. Esterilizou-se em autoclave nas condições de  $T=121^{\circ}\text{C}$  e  $P=1$  bar, durante 20 minutos, com o objectivo de evitar a presença e desenvolvimento de microrganismos contaminantes.

A produção de células de *E. aerogenes* foi realizada tendo em conta dois objectivos:

1. Determinação da curva de crescimento e recta de densidade óptica (D.O.) vs peso seco (p.s.), as quais foram obtidas por inoculação de uma ansada retirada de uma rampa de conservação em 2 *erlenmeyers* de 1000 mL, contendo cada um, 500 mL de meio de crescimento (Tabela 2.1), em condições de  $T=30^{\circ}\text{C}$  e agitação orbital de 150 rpm.  
Num dos *erlenmeyers*, foram recolhidas amostras ao longo do tempo para a leitura da D.O. da suspensão celular a um comprimento de onda (c.d.o.) de 640 nm e obtenção da curva de crescimento da biomassa.  
No outro *erlenmeyer*, após 24 horas de incubação (final da fase exponencial de crescimento), recolheu-se toda a biomassa para centrifugação e ressuspensão em igual volume de água bidestilada (solução *stock*), para determinação da recta D.O. vs peso seco, secção 3.1.2.
2. Obtenção do pré-inóculo para o processo de fermentação. Neste caso, após cerca de 15 horas, centrifugou-se a suspensão celular a 10.000 rpm durante 20 minutos a  $5^{\circ}\text{C}$  e ressuspendeu-se a biomassa em igual volume de água bidestilada esterilizada, para lavagem das células, e procedeu-se a nova centrifugação. O sobrenadante foi sempre desprezado, após cada centrifugação.  
Seguido da lavagem/centrifugação, a biomassa foi ressuspensa num determinado volume de água bidestilada esterilizada, a fim de obter uma suspensão celular com uma D.O. apropriada, correspondente ao peso seco pretendido, após inoculação do meio. Para esse efeito, calculou-se o

volume de água a ressuspender as células, o qual foi calculado com base na recta D.O. vs Peso seco, por forma a inocular um volume constante de 2 mL da suspensão celular, no meio de fermentação contendo o substrato e com borbulhamento de azoto gasoso durante cerca de 2 minutos, para obtenção de condições de anaerobiose. A inoculação do meio foi levada a cabo numa *hotte* com aspiração e em condições de assépsia, ou seja, à chama.

### 2.2.2 Produção de hidrogénio

Os ensaios para a produção de hidrogénio foram realizados numa incubadora com agitação orbital de 150 rpm, T=30°C, durante um período de 24h de maneira a atingir o equilíbrio [Neves, (2009) e Marques et al., (2009)]. Assim:

Numa primeira fase, utilizou-se como substrato, glicerol contido em resíduos da produção de biodiesel, sendo o objectivo, avaliar a resposta do sistema em termos de razão volumétrica H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (mL/mL) e de volume de hidrogénio produzido (mL) em função das concentrações de triptona e extracto de levedura. Estes ensaios foram planeados de acordo com a metodologia do Desenho Composto Central, para intervalos de concentração de triptona e extracto de levedura entre 0,5-5,0 g/L, sob as seguintes condições operacionais: agitação orbital de 150 rpm, T=30°C,  $V_{\text{total do reactor}}/V_{\text{fase líquida}} = 2,3$ , [biomassa]=0,38 g/L, [glicerol]=27 g/L

Por esta metodologia, construiu-se inicialmente um desenho factorial 2<sup>(2)</sup>, isto é, considerando cada uma das variáveis referidas, a dois níveis simétricos (-1/+1). Além disso, para tornar possível o estabelecimento da relação polinomial quadrática, o desenho factorial foi ainda expandido a dois níveis extremos (-1,414/+1,414) (Tabela 2.4). A expansão do desenho teve por objectivo permitir avaliar um maior número de combinações das duas variáveis, aumentando a hipótese de determinar a resposta quanto ao ponto óptimo para um dado factor. Este estudo implicou a realização de 11 ensaios, sendo 4 do desenho factorial, 4 da expansão e 3 réplicas do ponto médio, correspondente ao nível 0.

Tabela 2.4 - Parâmetros estudados, níveis e expansão considerados para a optimização do processo de produção de biohidrogénio, pela metodologia DCC

Factor	-1,414	-1	0	1	1,414
Triptona	0,5	1,2	2,8	4,3	5
Extracto de levedura	0,5	1,2	2,8	4,3	5

A segunda fase do trabalho teve como objectivo, avaliar a produção de hidrogénio, a partir da glucose e xilose presentes em soluções sintéticas e contidos nos hidrolisados de lenhocelulósicos obtidos por tratamento das lamas da reciclagem de papel, para comparação de resultados. As condições operacionais foram: agitação orbital de 150 rpm, 30°C,  $V_{\text{total do reactor}}/V_{\text{fase líquida}} = 2,3$  e [biomassa]=0,38 g/L, [glucose]<sub>sintético</sub>=5, 10 e 20 g/L, [xilose]<sub>sintético</sub>=1, 2 e 4 g/L, [glucose]<sub>hidrolisado</sub>=10 g/L e [xilose]<sub>hidrolisado</sub>=2 g/L.

Finalmente realizaram-se ensaios utilizando como substrato, glicerol contido nos resíduos da produção de biodiesel e glucose e xilose contidos em soluções sintéticas, variando de 2,3 para 6,4 a razão  $V_{\text{total do reactor}}/V_{\text{fase líquida}}$  e variando o volume da fase líquida e da *Headspace*, mantendo constante a razão  $V_{\text{total do reactor}}/V_{\text{fase líquida}}$ .

## 2.3 Métodos analíticos

### 2.3.1 Determinação do peso seco da biomassa

A determinação do peso seco da biomassa foi realizada fazendo passar suspensões celulares, com diferentes concentrações de biomassa, por membranas de nitrato de celulose (0,45 µm de poro e 0,47 mm de diâmetro, Whatman).

Assim, na fase inicial do procedimento, as membranas foram colocadas na estufa a 80°C, durante 16 horas, com o objectivo de retirar a humidade após o que foram pesadas.

Para a determinação do peso seco, em termos de  $\frac{g_{\text{biomassa seca}}}{L_{\text{suspensão celular}}}$ , prepararam-se 8 diluições (1/2, 1/10, 1/15, 1/20, 1/30, 1/35, 1/40, 1/50) a partir de uma solução *stock*, obtida por centrifugação da biomassa produzida em 24 horas (fase estacionária) seguida da sua ressuspensão num igual volume de água bidestilada. De cada suspensão celular, retiraram-se 10 mL, sob agitação forte, e procedeu-se à filtração por vácuo. Este procedimento foi realizado em triplicado.

A biomassa retida na membrana foi depois lavada com o igual volume de água bidestilada, colocando-se, de seguida, novamente na estufa a 80°C, durante 16 horas. Após este tempo, pesaram-se, as membranas com a biomassa seca de modo a obter os respectivos pesos secos.

Os valores calculados corresponderam à média dos resultados obtidos para cada ponto.

### 2.3.2 Determinação da densidade óptica

A densidade óptica (D.O.) de suspensões celulares, foi lida a um comprimento de onda (c.d.o.) de 640 nm, num espectrofotómetro de varrimento *HITACHI U2000*.

### 2.3.3 Caracterização dos resíduos utilizados como substrato

#### a) Resíduos da produção de biodiesel

A determinação do conteúdo inicial em cinzas, água, glicerol e MONG (material orgânico não glicerol), foi realizado de acordo com as normas europeias, NP 1688, NF EN ISO 12937, AOCS Ea 6-5,1 e NFT 60-368, respectivamente. De modo a poder considerar fiáveis os valores obtidos, utilizou-se para termo de comparação uma amostra de glicerol puro.

A determinação de glicerol na fase líquida do reactor, após o processo de fermentação, foi levada a cabo por cromatografia gasosa, dada a baixa gama de concentrações de glicerol esperada nesta fase.

O cromatógrafo gasoso utilizado para esta determinação foi um Varian (modelo CP 3800 GC) com uma coluna FFAP-CB capilar com 25m x 0,32mm, com um detector de ionização de chama e um injector *on-column*. O gás de arrasto foi o hélio.

#### b) Hidrolisado obtido a partir de resíduos da pasta do papel

Os açúcares (glucose e xilose) foram doseados com um sistema de HPLC Waters LC1 module 1 plus (Millford, LA), equipado com um detector diferencial em série índice de refração/ultravioleta. Foi utilizada uma coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), operando a 50°C, com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 M como fase móvel, a um caudal de 0,4 mL.

### 2.3.4 Leitura do volume de gás produzido

O volume da fase gasosa resultante do processo de fermentação anaeróbia foi determinado utilizando uma coluna de Mariotte. Para esse efeito, estabeleceu-se ligação entre o saco de recolha e a coluna, esvaziou-se o conteúdo do saco para a coluna. De acordo com a lei de Boyle-Mariotte ( $P_1V_1=P_2V_2$ ), foi possível determinar o volume de gás produzido, por deslocamento do líquido corado (NaCl, gotas de HCl e alaranjado de metilo) no interior da coluna.

### 2.3.5 Determinação do conteúdo em H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>

Após cada experiência, procedeu-se à determinação, quantitativa e qualitativa da fase gasosa produzida na *headspace* do reactor e no saco de recolha, num cromatógrafo de fase gasosa (VARIAN, modelo CP3800), com detector de condutividade térmica, a T=150°C. A coluna utilizada foi uma Porapak S, de 3 m x 1/8 " a T=60°C e o gás arrastador foi o azoto.

### 2.3.6 Determinação do conteúdo em etanol

A concentração de etanol presente na fase líquida (meio fermentado) foi determinada por cromatografia gasosa, num cromatógrafo gasoso Hewlett Packard (modelo 5890), com detector de ionização de chama a T=20°C e injector *on-column* a T=150°C

A coluna utilizada foi 4% CW (Carbowax) - 20 M, 1% *Trimesil Acid* 80-120 Carbopack BDA 2 m x 1/8 in SP 30000189, a T=110°C. O gás arrastador foi o hélio.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Obtenção laboratorial de células *E. aerogenes*

A produção de células *E. aerogenes* foi planeada de forma a que a quantidade de biomassa adicionada ao meio de fermentação estivesse em elevado estado de viabilidade, ou seja, que a recolha da biomassa fosse efectuada durante a fase exponencial de crescimento, na qual, corresponde a sua fase de maior viabilidade, isto é, quando os mecanismos de transporte das células estão funcionais, o que resulta numa melhor troca de nutrientes e da fonte de carbono e, conseqüentemente num melhor desempenho metabólico da biomassa.

##### 3.1.1 Crescimento da biomassa

Tal como descrito em 2.2.1, o crescimento da biomassa teve como objectivo quer a determinação da curva de crescimento e da recta de calibração D.O. vs peso seco, quer a obtenção de um pré-inóculo para a recolha da biomassa na fase exponencial de crescimento, e inoculação do meio de fermentação. Na Fig. 3.1, apresenta-se a curva de crescimento das células de *E. aerogenes*, obtida experimentalmente.

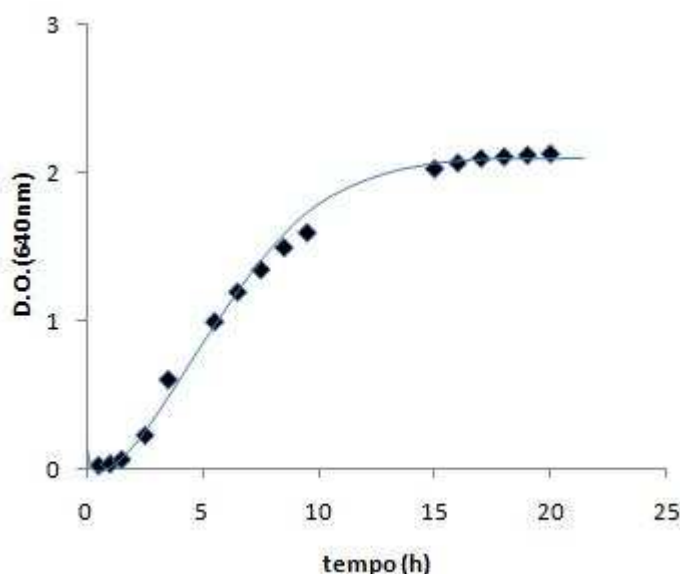


Fig. 3.1 – Curva de crescimento de células de *E. aerogenes*, em meio líquido de crescimento (20 g/L peptona e 5 g/L NaCl) a 30°C com agitação orbital de 150rpm.

Observando a figura 4, verifica-se claramente a existência de três fases: fase de latência (0-2h), fase exponencial (2-16h) e fase estacionária (17h). Foi com base neste perfil que, em todas as experiências, se recolheu a biomassa do pré-inóculo antes das 15h e se procedeu à preparação do inóculo conforme descrito em 2.2.1.

##### 3.1.2 Recta de calibração, densidade óptica (D.O.) vs peso seco (p.s.)

A determinação da recta de calibração D.O. vs p.s. foi fundamental para o cálculo do volume de suspensão de biomassa antes do início do processo.

Assim, com base nos valores obtidos do p.s. e da D.O., determinados de acordo com o procedimento descrito em 2.3.1 e 2.3.2, construiu-se a recta de calibração peso seco vs D.O. (Fig. 3.2). Verificou-se a existência de uma relação linear entre os dois parâmetros expressa pela equação  $Y = 2,526x + 0,0468$ , com um coeficiente de correlação ( $r^2$ ) de 0,9928. Esta recta de calibração permitiu efectuar os cálculos, de modo a iniciar cada ensaio de produção de biohidrogénio com a concentração inicial de biomassa pretendida, 0,38 g/L após adição.

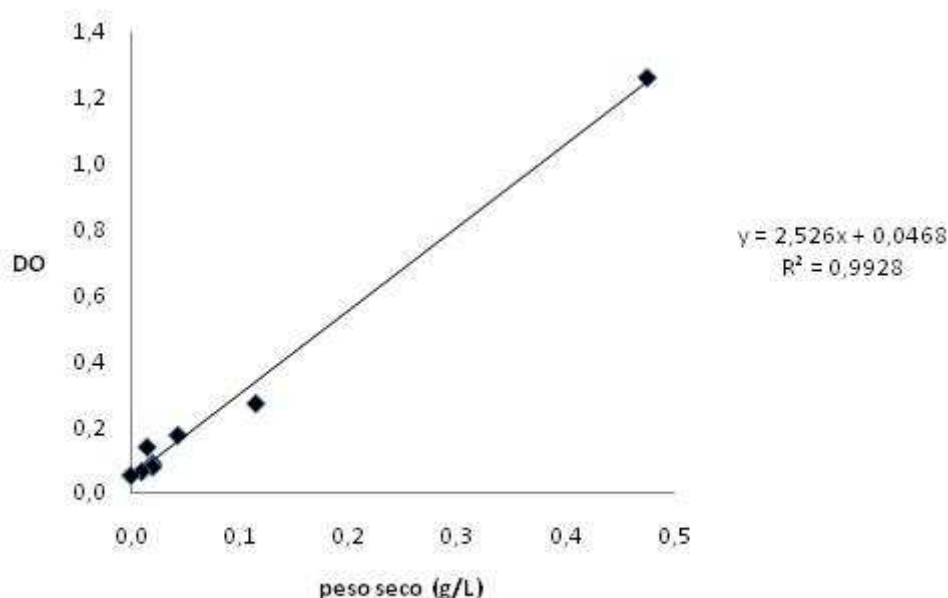


Fig. 3.2 – Recta de calibração, densidade óptica D.O. vs peso seco (p.s.) de suspensões de células de *E. aerogenes*

### 3.2 Produção de biohidrogénio

Todas as experiências foram realizadas com inoculação de 2 mL de uma suspensão de *E. aerogenes* no meio de fermentação, contendo os diferentes substratos a estudar: glicerol contido em resíduos industriais provenientes da produção de biodiesel e glucose e/ou xilose contidos em meio sintético ou presentes num hidrolisado, obtido por via enzimática, a partir de lamas da reciclagem de papel [Marques et al., (2007)].

A inoculação do meio foi realizada em simultâneo com o borbulhamento de azoto gasoso (remoção do  $O_2$ ) numa *hotte* com aspiração constante e em condições de assépsia (à chama).

De seguida, apresentam-se os resultados obtidos para o estudo do efeito de vários parâmetros físico-químicos sobre o rendimento do processo, de acordo com os diferentes substratos utilizados neste trabalho e com os objectivos pretendidos:

#### 3.2.1 Produção de biohidrogénio a partir de glicerol contido em resíduos da produção de biodiesel

Nesta fase do trabalho, e em seguimento da optimização das condições operacionais e físico-químicas realizadas anteriormente [Neves, (2009) e Marques et al., (2009)], pretendeu-se avaliar a influência da

diminuição da concentração dos compostos de maior valor económico do meio de fermentação (triptona e extracto de levedura) sobre a eficiência do processo em termos do volume de hidrogénio e da composição da fase gasosa (razão volumétrica  $H_2/CO_2$ ), utilizando como substrato, glicerol contido em resíduos da produção de biodiesel.

Este estudo foi levado a cabo com vista a aumentar a viabilidade económica da aplicação deste processo microbiológico à escala industrial.

### 3.2.1.1 Caraterização físico-química dos resíduos industriais provenientes de uma fábrica de produção de biodiesel

Antes da sua utilização como substrato, os resíduos industriais da produção de biodiesel foram caracterizados em termos do seu teor de cinzas, água, glicerol e MONG (material orgânico não glicerol), equação 10.

$$MONG = 100 - [\%_{(m)}Glicerol + \%_{(m)}Água + \%_{(m)}Cinzas] \quad (10)$$

Observando a Tabela 3.1, verifica-se um elevado conteúdo em glicerol e um baixo teor em água e cinzas, resultando num valor inexistente de MONG. Este resultado indica que os resíduos apresentam um elevado grau de purificação.

Tabela 3.1 - Caracterização do resíduo industrial contendo glicerol, proveniente da produção de biodiesel

Percentagem % (m/m)			
Glicerol	Água	Cinzas	Mong
86,1	9,8	4,6	0,0

Após caracterização dos resíduos industriais, procedeu-se à realização de ensaios, e todos os valores apresentados ao longo das secções que se seguem (3.2.1.2 – 3.2.1.4) correspondem à média de pelo menos cinco experiências independentes, com um desvio padrão sempre inferior a 10% dos valores registados.

### 3.2.1.2 Optimização das concentrações de extracto de levedura e triptona pela Metodologia do Desenho Composto Central (DCC)

A optimização de parâmetros foi levada a cabo aplicando a metodologia DCC. Para a aplicação desta metodologia construiu-se inicialmente um desenho factorial  $2^{(2)}$  considerando a utilização de cada um dos dois parâmetros: [triptona] e [extracto de levedura], com valores entre 0,5 e 5 g/L, a 2 níveis (-1 e +1), seguida da sua expansão para os pontos estrela, onde os novos limites foram definidos pela expressão  $\alpha = 2^{\frac{(k-p)}{4}}$  em que  $k$  é o número de variáveis e  $p$  o número de partições realizada

As respostas consideradas como estudo foram:

- A razão volumétrica  $H_2/CO_2$  (mL/mL) no saco de recolha, *Headspace* e tendo em conta o sistema global;
- Volume total de hidrogénio produzido.

De seguida apresentam-se a discussão dos resultados obtidos, considerando cada um dos objectivos mencionados.

**a) Análise dos resultados tendo em conta a razão volumétrica H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>**

Sendo a composição da fase gasosa produzida, um dos factores importantes a ter em conta para aplicação deste processo à escala industrial, dados os custos envolvidos na purificação do hidrogénio, antes da sua utilização posterior, a análise do valor da razão volumétrica H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> foi tida em conta neste trabalho (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Razão volumétrica H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> em função da triptona e extracto de levedura, obtida pela metodologia do Desenho Composto Central. Condições experimentais:[biomassa]=0,38 g/L; [glicerol]<sub>inicial</sub>=27 g/L; T=30°C; V<sub>total do reactor</sub>/V<sub>fase líquida</sub>=2,3; agitação orbital de 150 rpm; [triptona]=0,5-5 g/L; [extracto de levedura]=0,5-5 g/L

[Triptona] (g/L)	[Extracto de levedura] (g/L)	Razão volumétrica H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (mL/mL)		
		Saco	Headspace	Sistema global
1,2	1,2	5,4	1,3	3,5
4,3	1,2	3,3	1,3	2,3
1,2	4,3	2,6	1,0	2,1
4,3	4,3	2,2	1,2	1,9
2,8	2,8	3,4	1,3	2,5
0,5	2,8	2,8	1,3	2,3
5,0	2,8	3,3	1,3	2,6
2,8	0,5	2,6	1,1	1,9
2,8	5,0	3,1	1,0	2,5

Antes do tratamento de resultados obtidos, com base no planeamento de experiências realizado (metodologia DCC) e numa primeira abordagem feita à Tabela 3.2, verifica-se que no saco de recolha o qual pode ser encarado como o tanque de recolha da fase gasosa a nível industrial, a razão volumétrica H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> variou entre 2,2 e 5,4 o que mostra que o pior resultado correspondeu pelo menos ao dobro do volume de H<sub>2</sub> relativamente ao volume de CO<sub>2</sub>. Além disso, é de salientar que o valor mais elevado foi obtido para concentrações baixas e iguais de triptona e extracto de levedura (1,2 g/L), o que é favorável do ponto de vista económico.

Também com base na Tabela 3.2, verifica-se que os valores obtidos para a *Headspace* foram todos semelhantes e próximos de 1, o que sugere que o caudal imposto à bomba (i.e., a velocidade de remoção da fase gasosa) foi apropriado no sentido de reduzir/anular os efeitos de inibição por produto.

Em todas as experiências, o volume de fase gasosa produzido foi aproximadamente constante e próximo de 1200 mL.

De seguida, e de acordo com o tratamento de resultados pela metodologia do DCC apresenta-se, na Tabela 3.3, a relação entre os efeitos de cada um dos factores em estudo nas três fases da montagem.

Tabela 3.3 – Estimativa dos efeitos da concentração de triptona e da concentração de extracto de levedura e respectiva interacção, no saco de recolha, na *Headspace* e no sistema global, da fase gasosa sobre o valor da razão volumétrica H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>

	Parâmetros	Estimativas	Grau de confiança (%)
Saco de recolha	Triptona	-1,3	99,7
	Extracto de levedura	-2,0	99,9
	Triptona x extracto de levedura	0,8	99,5
<i>Headspace</i>	Triptona	0,1	52,2
	Extracto de levedura	-0,2	77,4
	Triptona x extracto de levedura	0,1	52,2
Sistema global	Triptona	-0,7	97,4
	Extracto de levedura	-0,9	98,5
	Triptona x extracto de levedura	0,5	95,6

Observando a Tabela 3.3, verifica-se que individualmente, os dois parâmetros apresentaram influência negativa sobre a razão volumétrica H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, nas três fases da montagem experimental o que justifica a diminuição da resposta com o aumento da concentração de triptona e extracto de levedura. Além disso, a interacção entre a triptona e o extracto de levedura foi ligeiramente positiva sobre a resposta do processo, sugerindo que a influência dos dois parâmetros se fez sentir de modo semelhante, em simultâneo sobre a resposta do processo.

No que diz respeito aos valores dos graus de confiança com que se pode considerar o significado dos efeitos estimados, verifica-se para o saco de recolha e considerando o sistema global, que os efeitos e interacções foram estatisticamente significativos, enquanto que para a *Headspace*, o grau de confiança foi baixo. Esta observação pode estar associada à baixa concentração de gases e razão volumétrica observada na *Headspace*, devido à remoção forçada da fase gasosa ao longo do processo.

Além da análise dos efeitos, a aplicação do método da regressão múltipla linear aos resultados experimentais, permitiu obter os coeficientes da equação polinomial quadrática para a razão volumétrica H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, os quais, permitiram realizar os cálculos para a construção de gráficos tridimensionais (ou superfícies de resposta teórica) para cada fase de montagem. Assim, os coeficientes polinomiais foram obtidos através das equações 11,12 e 13, para o saco de recolha, *Headspace* e sistema global, respectivamente.

$$y = 5,16 - 0,49 \times C_{\text{TRIPTONA}} - 0,41 \times C_{\text{EXTRACTO}} - 0,02 \times C_{\text{TRIPTONA}}^2 - 0,05 \times C_{\text{EXTRACTO}}^2 + 0,16 \times C_{\text{TRIPTONA} + \text{EXTRACTO}} \quad (11)$$

$$y = 1,31 - 0,12 \times C_{\text{TRIPTONA}} + 0,08 \times C_{\text{EXTRACTO}} + 0,01 \times C_{\text{TRIPTONA}}^2 - 0,03 \times C_{\text{EXTRACTO}}^2 + 0,01 \times C_{\text{TRIPTONA} + \text{EXTRACTO}} \quad (12)$$

$$y = 3,58 - 0,47 \times C_{\text{TRIPTONA}} - 0,19 \times C_{\text{EXTRACTO}} + 0,01 \times C_{\text{TRIPTONA}}^2 - 0,03 \times C_{\text{EXTRACTO}}^2 + 0,10 \times C_{\text{TRIPTONA} + \text{EXTRACTO}} \quad (13)$$

A análise estatística do modelo foi efectuada através do teste F da variância e da determinação do coeficiente de regressão múltipla,  $r^2$ , que permitem avaliar o ajuste do modelo relativamente aos dados experimentais (ver anexo). No que respeita à variável F, esta relaciona a variância associada ao modelo com a variância associada ao erro experimental. Assim, observando a Tabela 3.4, verifica-se que o valor de  $F_{\text{calculado}}$  foi inferior ao valor tabelado ( $F_{\text{crítico}}$ ), para igual número de graus de liberdade e para um intervalo de confiança de 95%, o que sugere uma elevada probabilidade do modelo encontrado ser adequado para o sistema em estudo, apesar do valor baixo dos coeficientes de correlação obtidos, os quais poderão estar associados ao facto de estar a aplicar esta metodologia a um processo microbiológico.

Tabela 3.4- Valores de teste F e coeficiente de correlação  $r^2$

	Teste F calculado	Teste F tabelado (para um intervalo de confiança de 95%)	Coefficiente de correlação ( $r^2$ )
Saco de recolha	0,26	19,16	0,37
<i>Headspace</i>	0,50		0,74
Sistema global	0,22		0,33

De seguida, apresentam-se as três superfícies de resposta obtidas com base no tratamento dos resultados experimentais pela aplicação da metodologia do Desenho Composto Central, para o saco de recolha, para a *Headspace* e para o sistema global (Fig. 3.3, 3.4 e 3.5).

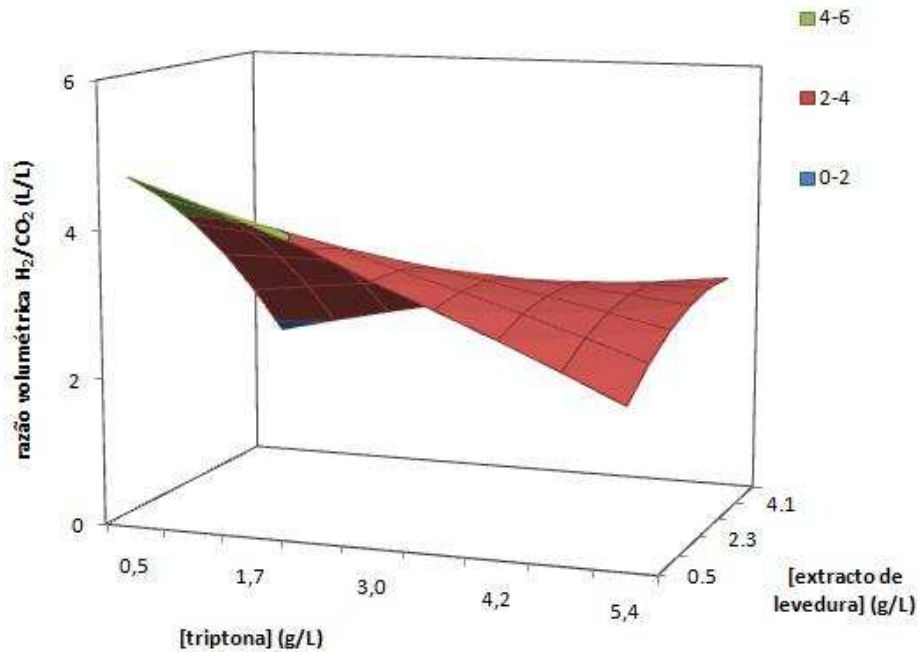


Fig. 3.3 – Superfície de resposta para a razão volumétrica  $H_2/CO_2$  obtida para o saco de recolha. Condições experimentais: [biomassa]=0,38 g/L; [glicerol]=27 g/L;  $T=30^\circ C$ ;  $V_{total\ do\ reactor}/V_{fase\ líquida}=2,3$ ; agitação orbital de 150 rpm; [triptona]=1,2-4,3; [extracto de levedura]=0,5-5 g/L.

Observando o perfil da superfície de resposta apresentado na Fig. 3.3, verifica-se que os valores mais elevados da razão volumétrica  $H_2/CO_2$  foram obtidos para uma gama de concentrações baixas de triptona e de extracto de levedura em simultâneo. Por outro lado, para concentrações baixas de extracto de levedura, observou-se que o aumento da concentração de triptona conduziu a um decréscimo dos valores de razão volumétrica  $H_2/CO_2$ . A mesma tendência ocorreu na situação inversa, (isto é, no aumento da concentração de extracto de levedura para concentrações baixas de triptona), sendo que neste caso a diminuição foi ligeiramente mais acentuada, sugerindo que a triptona exerceu maior influência positiva sobre a resposta do processo.

No que diz respeito ao perfil da superfície de resposta determinado para a *Headspace* (Fig. 3.4), não se verificou uma alteração significativa do valor da razão volumétrica  $H_2/CO_2$  com a variação das concentrações de triptona e de extracto de levedura, sugerindo que a velocidade de remoção da fase gasosa foi apropriada por forma a minimizar a inibição por produto.

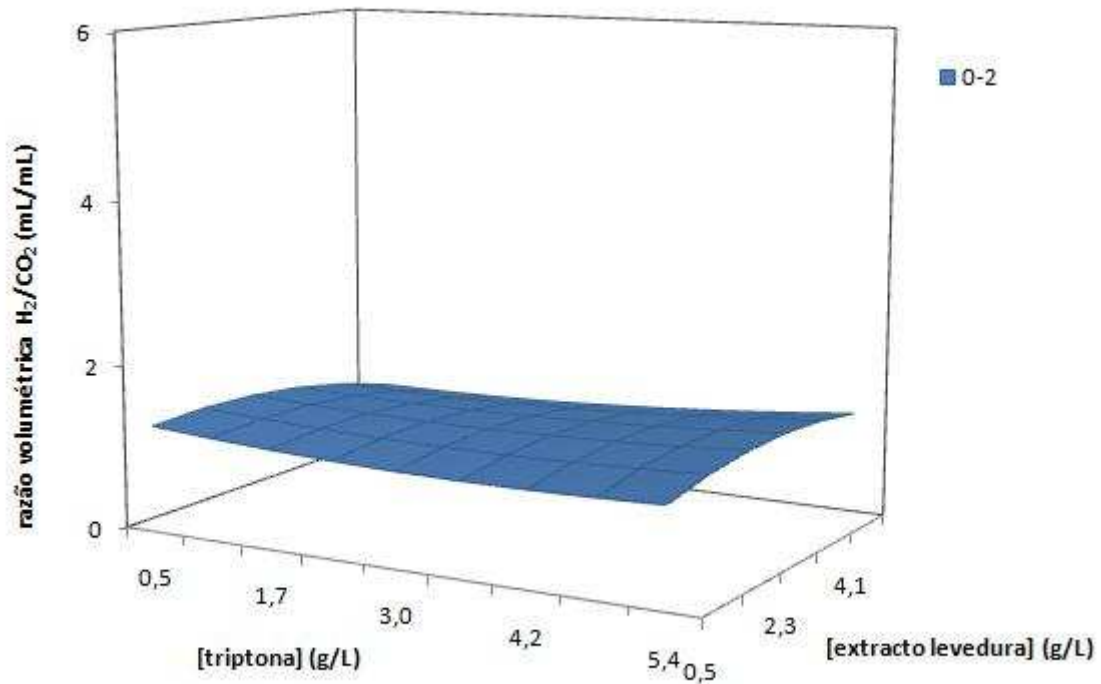


Fig. 3.4 – Superfície de resposta para a razão volumétrica H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> obtida na *Headspace*. Condições experimentais: [biomassa]=0,38 g/L; [glicerol]=27 g/L; T=30°C; V<sub>total do reactor</sub>/V<sub>fase líquida</sub> =2,3; agitação orbital de 150 rpm; [triptona]=1,2-4,3; [extracto de levedura]=1,2-4,3

Por último, considerando o sistema global (saco de recolha mais *Headspace*) (Fig. 3.5), verifica-se que o comportamento foi semelhante ao observado para o saco, o que seria de esperar, dado que para a *Headspace* não se verificou alteração significativa dos valores.

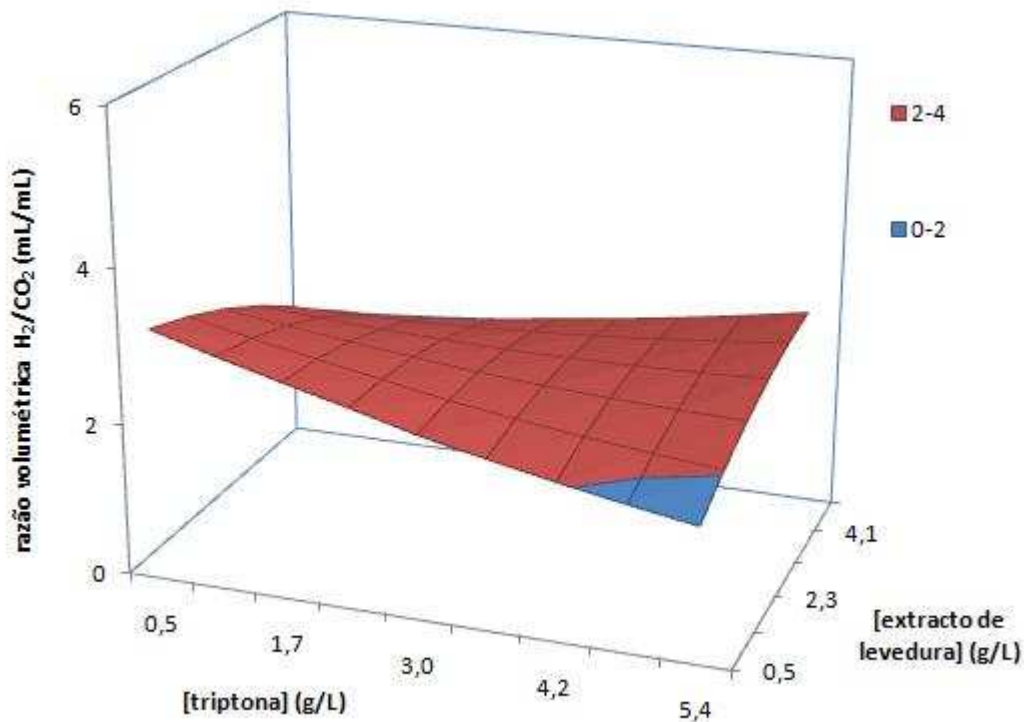


Fig. 3.5 – Superfície de resposta para a razão volumétrica H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> tendo em conta o sistema global. Condições experimentais: [biomassa]=0,38 g/L; [glicerol]=27 g/L; T=30°C;  $V_{\text{total do reator}}/V_{\text{fase líquida}}=2,3$ ; agitação orbital de 150 rpm; [triptona]=0,5-5; [extracto de levedura]=0,5-5

### b) Análise dos resultados tendo em conta o volume de hidrogénio produzido

Se por um lado, tendo em conta a purificação da fase gasosa, a composição da fase gasosa é importante para a posterior utilização do H<sub>2</sub>, por outro, a quantidade absoluta de hidrogénio apresenta uma enorme relevância devido a seu valor económico por unidade de volume produzido.

Assim, procedeu-se igualmente ao tratamento de resultados considerando o efeito da variação das concentrações de triptona e extracto de levedura sobre o volume de hidrogénio produzido. Neste caso, considerou-se apenas o sistema global dado que o volume total da fase gasosa obtido foi constante em todas as experiências, como referido anteriormente, (Tabela 3.5).

Tabela 3.5- Volume de hidrogénio em função das concentrações de triptona e extracto de levedura, para o sistema global, para as condições definidas pela metodologia do DCC. Condições experimentais: [biomassa]=0,38 g/L; [glicerol]<sub>inicial</sub>=27 g/L; T=30°C;  $V_{\text{total do reator}}/V_{\text{fase líquida}}=2,3$ ; agitação orbital de 150 rpm; [triptona]=0,5-5 g/L; [extracto de levedura]=0,5-5 g/L

[Triptona] (g/L)	[Extracto de levedura] (g/L)	Volume de hidrogénio (mL)
1,2	1,2	445
4,3	1,2	551
1,2	4,3	501
4,3	4,3	593
2,8	2,8	520
0,5	2,8	444
5,0	2,8	641
2,8	0,5	487
2,8	5,0	639

Observando a Tabela 3.5 e mais uma vez, numa primeira abordagem aos resultados obtidos, verifica-se que para o sistema global, o maior valor registado para o volume de H<sub>2</sub> foi de 641 mL quando se utilizaram as concentrações de 5 g/L e 2,8 g/L de triptona e extracto de levedura, respectivamente. Além disso, os valores mais elevados de volume de H<sub>2</sub> (639 e 641 mL) foram obtidos quando a razão entre os dois nutrientes foi de 1,8.

De seguida, e em sequência do tratamento de resultados de acordo com a metodologia do DCC, apresenta-se na Tabela 3.6, a relação entre os efeitos de cada um dos factores em estudo, para o sistema global.

Tabela 3.6 - Estimativas dos efeitos e das interações entre a triptona e extracto de levedura sobre o volume de H<sub>2</sub> para o sistema global, com base na construção das tabelas de contrastes.

	Parâmetro	Estimativa	Grau de confiança (%)
Sistema global	[Triptona]	104	74,5
	[Extracto de levedura]	43	42,5
	[Triptona x extracto de levedura]	-2	2,3

Com base na Tabela 3.6, verifica-se claramente que o parâmetro com mais influência na produção de volume de hidrogénio foi a variação da concentração da triptona comparativamente ao extracto de levedura e que a interação entre os factores foi negativa, o que sugere que o efeito da concentração de triptona pode ser acentuado para as concentrações mais baixas de extracto de levedura (ou, o efeito da concentração de extracto de levedura foi mais pronunciado às mais baixas concentrações de triptona). Contudo, com base no grau de confiança calculado verifica-se que as estimativas não são estatisticamente significativas, pelo que deverão ser consideradas apenas como indicativas.

Além da análise dos efeitos, tal como anteriormente, a aplicação do método da regressão múltipla linear aos resultados experimentais, permitiu obter os coeficientes da equação polinomial quadrática para com base neles construir a superfície de resposta e identificar a gama óptima teórica de valores das concentrações de triptona e extracto de levedura a utilizar para levar a cabo este processo (equação 14).

$$y = 110.5 \times C_{\text{TRIPTONA}} + 73.8 \times C_{\text{EXTRACTO}} - 12.9 \times C_{\text{TRIPTONA}}^2 - 8.9 \times C_{\text{EXTRACTO}}^2 - 0.42 \times C_{\text{TRIPTONA+EXTRACTO}}^2 \quad (14)$$

Tendo em conta a análise estatística do modelo (Tabela 3.7), verifica-se que o valor de  $F_{\text{calculado}}$ , foi inferior ao valor tabelado ( $F_{\text{crítico}}$ ) para igual número de graus de liberdade e para um um intervalo de confiança de 95%, o que indica uma elevada probabilidade do modelo ser adequado para o estabelecimento das condições ótimas em termos das concentrações de triptona e de extracto de levedura.

Tabela 3.7- valores de teste F e coeficiente de correlação  $r^2$

	Teste F calculado	Teste F tabelado (para um intervalo de confiança de 95%)	Coefficiente de correlação $r^2$
Sistema global	0,55	19,16	0,79

De seguida, apresenta-se a superfície de resposta obtida, com base no tratamento dos resultados experimentais por aplicação da metodologia do DCC (Fig. 3.6).

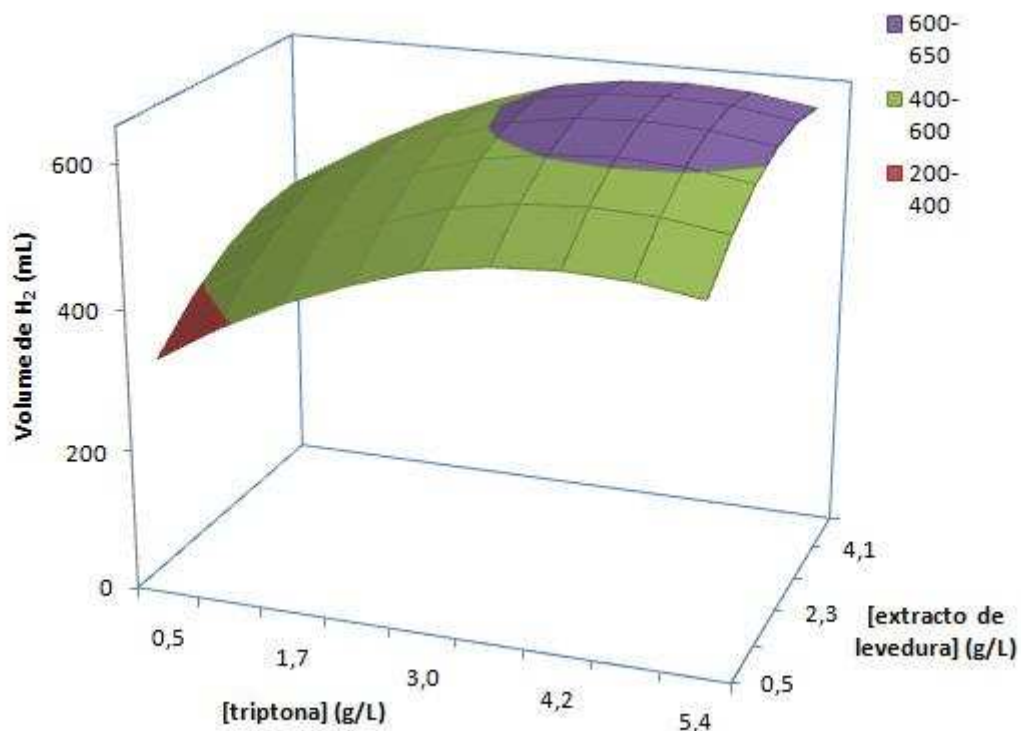


Fig. 3.6 – Superfície de resposta para o volume de hidrogénio produzido tendo em conta o sistema global (saco de recolha e *Headspace*) em função das concentrações de triptona e extracto de levedura. Condições experimentais: [biomassa]=0,38 g/L; [glicerol]=27 g/L; T=30°C;  $V_{\text{total do reactor}}/V_{\text{fase líquida}}=2,3$ ; agitação orbital de 150 rpm; [triptona]=1,2-4,3; [extracto de levedura]=1,2-4,3

Observando a Fig. 3.6, verifica-se que os valores mais elevados de volume de hidrogénio produzido, foram obtidos para a gama superior de concentrações de triptona e extracto de levedura, o que em comparação com o estudo desenvolvido por Ito e colaboradores foi concordante [Ito et al. (2005)].

Este comportamento em comparação com o observado para a razão volumétrica  $H_2/CO_2$ , sugere um compromisso resultante da análise de custos, tendo em conta um balanço entre o benefício do valor do hidrogénio produzido e dos custos associados à purificação da fase gasosa

A Fig. 3.7, apresenta um outro tipo de análise da resposta do sistema, desta vez em termos de razão volumétrica  $H_2/CO_2$  e do volume de biohidrogénio produzido, tendo em conta o sistema global, em situação de igualdade de concentrações de triptona e extracto de levedura.

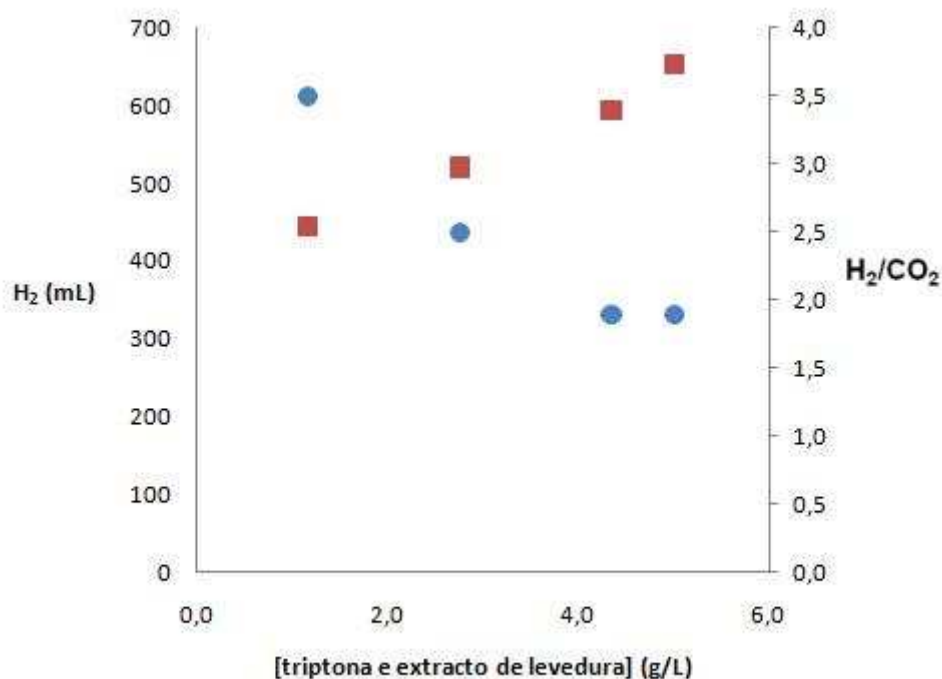


Fig. 3.7 – Razão volumétrica  $H_2/CO_2$  (●) e volume de hidrogénio produzido (■), para concentrações iguais de triptona e extracto de levedura. Condições experimentais: [biomassa]=0,38 g/L; [glicerol]=27 g/L;  $T=30^{\circ}C$ ;  $V_{total\ do\ reactor}/V_{fase\ líquida}=2,3$ ; agitação orbital de 150 rpm; [triptona]=0,5-5; [extracto de levedura]=0,5-5

Observando a Fig. 3.7, verifica-se que o aumento simultâneo das concentrações de triptona e de extracto de levedura, conduziu a um aumento do volume de hidrogénio produzido e a uma diminuição da razão volumétrica  $H_2/CO_2$  o que está de acordo com o observado anteriormente. Ito e colaboradores observaram um comportamento semelhante, quanto ao volume de biohidrogénio produzido para um intervalos de concentrações iguais entre 0,5-5 g/L de triptona e extracto de levedura, a partir de glicerol contido em resíduos provenientes da produção de biodiesel, utilizando uma estirpe *E. aerogenes* isolada a partir de lammas activadas.

Estes resultados sugerem que no sentido de tornar o processo viável economicamente a nível industrial, seja necessário encontrar um compromisso entre a pureza da fase gasosa obtida e o volume de biohidrogénio produzido.

O valor máximo para o rendimento foi 2,5 mL  $H_2$ / mL meio, para uma concentração de 5 g/L de triptona e 2,8 g/L de extracto de levedura.

### 3.2.1.3 Consumo de glicerol

A Tabela 3.8, apresenta o consumo de glicerol, e as respectivas razões volumétricas  $H_2/CO_2$  e volume de hidrogénio produzido, para todas as experiências realizadas.

Tabela 3.8 - Variação do consumo de glicerol para as diferentes concentrações de triptona e extracto de levedura. Condições experimentais: [biomassa]=0,38 g/L; [glicerol]<sub>inicial</sub>=27 g/L; T=30°C;  $V_{total\ do\ reator}/V_{fase\ líquida}=2,3$ ; agitação orbital de 150 rpm; [triptona]=0,5-5 g/L; [extracto de levedura]=0,5-5 g/L

[Tritptona] (g/L)	[Ext de levedura] (g/L)	[Glicerol] (g/L)		$H_2/CO_2$ (mL/mL)			$H_2$ (mL)
		Inicial	Consumido	Saco de recolha	Headspace	Sistema global	Sistema global
1,2	1,2	27	26,7	5,4	1,3	3,5	445
4,3	1,2		26,7	3,3	1,3	2,3	551
1,2	4,3		26,7	2,6	1,0	2,1	501
2,8	2,8		25,5	3,4	1,3	2,5	520
0,5	2,8		25,8	2,8	1,3	2,3	444
5,0	2,8		23,2	3,3	1,3	2,6	641
2,8	0,5		26,2	2,6	1,1	1,9	487
2,8	5,0		24,2	3,1	1,0	2,5	639

Com base na Tabela 3.8, verifica-se claramente que no geral, o consumo de glicerol foi quase completo, indicando que a diminuição das concentrações de nutrientes não conduziu ao efeito de inibição por substrato. Além disso, verifica-se que a variação da razão volumétrica  $H_2/CO_2$  não dependeu do glicerol consumido e que, por outro lado, os valores mais elevados de volume produzido de hidrogénio (641 e 639 mL) corresponderam aos valores mais baixos de glicerol consumido, 23,2 e 24,2, respectivamente.

### 3.2.2 Produção de biohidrogénio a partir de glucose e xilose

Nesta fase do trabalho, e nas mesmas condições operacionais, avaliou-se a produção de biohidrogénio utilizando como substratos, glucose e xilose presentes em meio sintético e presentes num hidrolisado, obtido por via enzimática, a partir de lamas da reciclagem de papel [lamas prensadas (resíduo final) obtidas na unidade de tratamento de efluentes da fábrica de reciclagem de papel da Renova (Torres Novas)] [Marques et al. (2007)]. Essa avaliação foi levada a cabo em termos de volume de fase gasosa e da sua composição em  $H_2$  (razão volumétrica  $H_2/CO_2$ ).

Este estudo foi levado a cabo tendo em vista a valorização energética, comercial e ambiental do resíduo industrial da produção de pasta de papel.

Por se tratar de estudos preliminares, optou-se por utilizar o meio de fermentação com a composição do meio definida inicialmente, isto é, contendo 5 g/L de triptona e 5 g/L de extracto de levedura, com vista a posterior optimização desses parâmetros.

Quanto aos substratos, utilizaram-se inicialmente, soluções sintéticas com diferentes concentrações de glucose e xilose em separado e em mistura e compararam-se os resultados com os obtidos utilizando um hidrolisado das lamas da reciclagem de papel (com concentrações de glucose e xilose de aproximadamente 10 g/L e 2 g/L, respectivamente).

De seguida, apresentam-se os resultados obtidos para cada uma das situações estudadas.

### 3.2.2.1 Produção de biohidrogénio a partir de soluções sintéticas de glucose e xilose

A Tabela 3.9, apresenta os valores de razão volumétrica  $H_2/CO_2$  nas três fases de montagem e de volume de biohidrogénio produzido tendo em conta o sistema global, a partir de glucose e xilose.

Tabela 3.9 – Produção de biohidrogénio a partir de glucose e xilose em soluções sintéticas. Condições experimentais: [biomassa]=0,38 g/L; T=30°C;  $V_{\text{reactor}}/V_{\text{liquido}}=2,3$ ; agitação orbital de 150 rpm; [triptona]= 5 g/L; [extracto de levedura]= 5 g/L

[Substrato]	Fase de montagem	$H_2/CO_2$ (mL/mL)	$H_2$ (mL)
Glucose (5g/L) + Xilose (1g/L)	Saco	1,6	160
	Headspace	0,2	
	S. global	1,4	
Glucose (10g/L) +Xilose(2g/L)	Saco	1,2	278
	Headspace	0,2	
	S. global	1,1	
Glucose (20g/L) +Xilose(4g/L)	Saco	0,9	384
	Headspace	0,0	
	S. global	0,8	
Glucose (10g/L)	Saco	1,0	239
	Headspace	0,0	
	S. global	0,9	
Xilose (2g/L)	Saco	5,5	90
	Headspace	0,04	
	S. global	2,8	

Observando a Tabela 3.9, verifica-se que relativamente às soluções contendo uma mistura de glucose e xilose, o aumento na sua concentração conduziu ao aumento do volume de biohidrogénio produzido e no decréscimo da razão volumétrica  $H_2/CO_2$ . Observando as soluções contendo glucose e xilose em separado verifica-se claramente que a glucose conduziu a um valor mais elevado de volume de biohidrogénio produzido, embora a xilose tenha conduzido a um valor mais elevado de razão volumétrica  $H_2/CO_2$ , sugerindo que a utilização de xilose, pode desviar o metabolismo da bactéria no sentido da produção de hidrogénio e simultâneamente, produzindo um baixo teor de  $CO_2$ , o que resulta no aumento da razão volumétrica  $H_2/CO_2$ .

Em termos de comparação entre o volume de hidrogénio produzido a partir das soluções em mistura e em separado, para concentrações iguais de glucose e xilose (10 e 2 g/L, respectivamente), verifica-se que o valor obtido na mistura (278 mL) foi inferior à soma das soluções em separado (328 mL=239 mL + 90 mL), sugerindo efeitos sinérgicos negativos sobre a produção de hidrogénio na presença dos dois substratos em mistura.

### 3.2.2.2 Produção de biohidrogénio a partir do hidrolisado proveniente de resíduos da produção da pasta do papel

Nesta fase, estudou-se a aplicabilidade do processo microbiológico apresentado neste trabalho para a produção de hidrogénio a partir de um hidrolisado proveniente de resíduos da produção de pasta do papel.

Assim, a Tabela 3.10 apresenta os resultados em termos de razão volumétrica  $H_2/CO_2$  e de volume de hidrogénio produzido, para comparação com os obtidos na secção precedente.

Tabela 3.10 – Comparação entre a produção de hidrogénio a partir do hidrolisado e de soluções sintéticas. Condições experimentais: [biomassa]=0,38 g/L; T=30°C;  $V_{total\ do\ reactor}/V_{fase\ líquida}$  =2,3; agitação orbital de 150 rpm; [triptona]= 5 g/L; [extracto de levedura]= 5 g/L

[Substrato] (Glucose 10g/L + xilose 2g/L)	Fase de montagem	$H_2/CO_2$ (mL/mL)	$H_2$ (mL)
Hidrolisado	Saco	0,9	249
	Headspace	0,1	
	S. global	0,8	
Solução sintética	Saco	1,2	278
	Headspace	0,2	
	S. global	1,1	

Observando a Tabela 3.10, verifica-se que os valores quer da razão volumétrica  $H_2/CO_2$  quer do volume de biohidrogénio produzido a partir do hidrolisado, foram ligeiramente inferiores quando comparados com os valores obtidos a partir da solução sintética, sugerindo que a presença de outros compostos diversos no hidrolisado além da glucose e xilose pode ter conduzido a uma ligeira alteração do desempenho da bactéria. Contudo, este decréscimo não foi significativo uma vez que a produção de 249 mL de biohidrogénio a partir do resíduo industrial foi bastante promissor, no sentido da valorização do resíduo proveniente da pasta do papel

### 3.2.2.3 Consumo de glucose e xilose

Na Tabela 3.11, apresenta-se o consumo de glucose e xilose durante a produção de biohidrogénio.

Tabela 3.11 – Consumo de glucose e xilose na solução sintética e no hidrolisado. Condições experimentais: [biomassa]=0,38 g/L; T=30°C;  $V_{total\ do\ reactor}/V_{fase\ líquida}$  =2,3; agitação orbital de 150 rpm; [triptona]= 5 g/L; [extracto de levedura]= 5 g/L

	[substrato]inicial (g/L)		[substrato]final (g/L)		$H_2/CO_2$ (mL/mL)			$H_2$ (mL)
	Glucose	Xilose	Glucose	Xilose	Saco de recolha	Headspace	Sistema global	Sistema global
Solução sintética	10	2	0	0	1,2	0,2	1,1	278
Hidrolisado	10	2	0	0	0,9	0,1	0,8	249

Observando a Tabela 3.11, verifica-se que para a solução sintética e no hidrolisado, o consumo de glucose e xilose foi total, indicando a ausência de inibição por substrato.

## 3.3 Produção de etanol a partir de glicerol, glucose e xilose

Além da bactéria *E. aerogenes* produzir hidrogénio, sob as condições utilizadas neste trabalho, produz simultaneamente, etanol na fase líquida, o que é uma vantagem associada ao processo. Dado que este composto apresenta valor comercial, uma vez que pode ser utilizado como combustível líquido e em várias aplicações na indústria, a determinação do conteúdo em etanol na fase líquida foi importante .

De seguida, nas Tabela 3.12 e Tabela 3.13, apresenta-se o teor de etanol produzido a partir do glicerol contido em resíduos e a partir da glucose e xilose presentes em soluções sintéticas e no hidrolisado.

Tabela 3.12 – Conteúdo em etanol na fase líquida em função das concentrações de triptona e extracto de levedura, a partir do glicerol. Condições experimentais: [biomassa]=0,38 g/L; T=30°C;  $V_{\text{total do reactor}}/V_{\text{fase líquida}}=2,3$ ; agitação orbital de 150 rpm; [triptona]= 0,5-5 g/L; [extracto de levedura]= 0,5-5 g/L

Glicerol		[Etanol] (g/L)
[Triptona] (g/L)	[Extracto de levedura] (g/L)	
1,2	1,2	3,1
4,3	1,2	3,8
1,2	4,3	2,3
4,3	4,3	4,3
2,8	2,8	4,6
0,5	2,8	3,1
5	2,8	3,8
2,8	0,5	2,3
2,8	5	4,7

Tabela 3.13 – Conteúdo em etanol na fase líquida a partir da glucose e xilose. Condições experimentais: [biomassa]=0,38 g/L; T=30°C;  $V_{\text{total do reactor}}/V_{\text{fase líquida}}=2,3$ ; agitação orbital de 150 rpm; [triptona]=5 g/L; [extracto de levedura]=5 g/L

[Glucose e Xilose]	[Etanol] (g/L)
Glucose (5 g/L) + xilose (1 g/L)	0,09
Glucose (10 g/L) + xilose (2 g/L)	1,5
Glucose (20 g/L) + xilose (4 g/L)	2,3
Glucose (10 g/L)	0,13
Xilose (2 g/L)	0,04
Hidrolisado	0,9

Observando as tabelas, verifica-se claramente que os valores de concentração de etanol (2,3-4,7 g/L) na fase líquida, a partir do glicerol, foram todos superiores aos obtidos utilizando como substrato, glucose e xilose (entre 0,09-2,3 g/L).

Verifica-se também, que as soluções contendo glucose e xilose em mistura, conduziram a valores mais elevados de etanol (1,5 g/L), do que as mesmas concentrações de glucose e xilose em separado (0,13 e 0,04 g/L, respectivamente). Além disso, em termos de comparação entre o etanol produzido a partir das soluções de glucose e xilose em mistura, para concentrações diferentes, verifica-se que o aumento das concentrações de glucose e xilose conduziu, não apenas a um aumento do etanol produzido como também ao aumento do CO<sub>2</sub> produzido na fase gasosa, resultando no decréscimo da razão volumétrica H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>.

### 3.3.1 Influência dos volumes da fase líquida e gasosa

Nesta fase, estudou-se o efeito da variação do volume da *Headspace* e da fase líquida sobre a razão volumétrica H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> e sobre o volume de hidrogénio produzido, utilizando como substrato, glicerol contido nos resíduos da produção de biodiesel e glucose e xilose contidos em soluções sintéticas, tendo em conta o sistema global.

Por se tratar de um estudo preliminar para estudar a tendência de resposta do sistema, mais uma vez, utilizou-se o meio com a composição inicial (i.e. 5 g/L de triptona e 5 g/L de extracto de levedura).

De seguida apresenta-se na Tabela 3.14, os resultados obtidos.

Tabela 3.14– Efeito da variação do volume da *Headspace* e da fase líquida. Condições experimentais: [biomassa]=0,38 g/L; [glucose]=10 g/L; [xilose]=2 g/L; T=30°C;  $V_{\text{total do reator}}/V_{\text{fase líquida}} = 2,3-6,4$ ; agitação orbital de 150 rpm; [triptona]= 5 g/L; [extracto de levedura]=5g/L

Razão $V_{\text{total do reator}}/V_{\text{fase líquida}}$	Volume <i>Headspace</i>	Volume fase líquida	Sistema global			
			Glicerol		Glucose e Xilose	
			H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (mL/mL)	H <sub>2</sub> (mL)	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (mL/mL)	H <sub>2</sub> (mL)
2,3	334	257	2	555	1,2	278
2,3	633	486	1,7	1045	-	-
6,4	500	91	2	416	1,1	91

Observando a Tabela 3.14, verifica-se que o aumento dos volumes da *Headspace* e da fase líquida para o dobro, mantendo constante a razão  $V_{\text{total do reator}}/V_{\text{fase líquida}}$ , conduziu a um aumento para o dobro do volume de biohidrogénio produzido e a um decréscimo não significativo na razão volumétrica H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>. Além disso, em termos de rendimento (mL H<sub>2</sub>/mL meio de fermentação), este manteve-se inalterado.

No que diz respeito ao aumento da razão  $V_{\text{total do reator}}/V_{\text{fase líquida}}$ , utilizando o glicerol, verificou-se que conduziu a um decréscimo no volume de hidrogénio produzido, mantendo constante a razão volumétrica H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> e ao aumento do rendimento de 2.1 para 4.5 mL H<sub>2</sub>/mL meio de fermentação. Relativamente a glucose e a xilose, o aumento da razão  $V_{\text{total do reator}}/V_{\text{fase líquida}}$ , conduziu a resultados semelhantes aos obtidos para o glicerol, à excepção do rendimento (mL H<sub>2</sub>/mL meio líquido) que se manteve inalterado.

## 4. Conclusões

Aplicando a metodologia do Desenho Composto Central, verificou-se que a diminuição da concentração de triptona e extracto de levedura (compostos de maior valor económico do meio de fermentação) embora tenha conduzido a um aumento da razão volumétrica entre os gases produzidos durante o processo ( $H_2/CO_2$ ) também conduziu à diminuição do volume de hidrogénio total o que do ponto de vista industrial e económico sugere encontrar um compromisso entre o rendimento volumétrico do processo e o custo associado à separação/purificação da fase gasosa.

Este trabalho permitiu verificar que a bactéria *E. aerogenes*, sob as condições utilizadas, produziu hidrogénio a partir da glucose e xilose presentes num hidrolisado proveniente do resíduo da produção da pasta do papel, cumprindo assim um dos objectivos deste trabalho no âmbito da valorização de resíduos industriais.

Comparando a produção de biohidrogénio a partir do glicerol, contido em resíduos da produção de biodiesel e de glucose e xilose, contidos em hidrolisados da produção da pasta de papel, verificou-se claramente que o glicerol conduziu a valores mais elevados de rendimento volumétrico do processo (2,5 mL  $H_2$ /mL meio de fermentação), do que a glucose e xilose, (1 mL  $H_2$ /mL meio de fermentação).

Por último, foi possível verificar que o aumento para o dobro dos volumes da *Headspace* e da fase líquida, mantendo constante a razão  $V_{total\ do\ reactor}/V_{fase\ líquida}$ , conduziu ao aumento para o dobro do volume de hidrogénio produzido de 555 mL para 1045 mL. Contudo, o aumento da razão  $V_{total\ do\ reactor}/V_{fase\ líquida}$  de 2,3 para 6,4 conduziu ao aumento do rendimento volumétrico de 2,5 para 4,5 mL  $H_2$ /mL de meio de fermentação, o que é mais vantajoso, tendo em conta o *scale-up* do processo para este processo.

Um ponto a salientar, é o facto de a estirpe bacteriana utilizada neste trabalho não ter alterado o seu desempenho metabólico na presença de outros compostos, além das fontes de carbono em estudo, o que é bastante promissor do ponto de vista de sustentabilidade, pois cria a possibilidade de aplicação deste processo ao tratamento de resíduos com produção simultânea de uma fonte de energia “limpa” – o hidrogénio.

Tendo em conta os resultados obtidos, propõe-se os seguintes estudos no futuro:

- Avaliação do efeito do caudal de remoção da fase gasosa, ao longo do processo;
- Estudo da produção de biohidrogénio por fermentação anaeróbia utilizando outras espécies bacterianas;
- Optimização das concentrações de glucose e xilose e de biomassa, pela metodologia DCC;
- Avaliação do efeito de outros gases de desarejamento;
- Realização de um estudo económico, tendo em conta parâmetros como ,volume de hidrogénio e composição da fase gasosa produzidos (razão volumétrica  $H_2/CO_2$ );
- Avaliação do efeito do volume da *Headspace* no rendimento deste processo microbiológico;
- Estudar a aplicação deste processo em regime contínuo

## 5. Referências

- Bélafi-Bakó K, D Búcsú, Z Pientka, B Bálint, Z Herbel, KL Kovács, M Wessling, 2006. Integration of biohydrogen fermentation and gas separation processes to recover and enrich hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, **31**, 1490-1495.
- Chong ML, V Sabaratnam, Y Shirai, MA Hassan, 2009. Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by *dark fermentation*. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**, 3277-3287.
- Das D, TN Veziroglu, 2001. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, **26**, 13-28.
- Das D, TN Veziroglu, 2008. Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**, 6046-6057.
- Drapcho CM, NP Nhuan, TH Walker, 2008. Biofuels Engineering Process Technology. *The McGraw-Hill Companies, Inc.*
- Hallenbeck PC, 2005. Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. *Water science & technology*, **52**, 21-29.
- Hallenbeck PC, 2009. Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**, 7379-7389
- Hallenbeck PC, MT Skonieczny, V Yargeau, 2009. Microbiological and engineering aspects of biohydrogen production. *Indian J microbial*, **49**, 48-59.
- Hordeski F Michael, 2008. Alternative fuels: the future of hydrogen-second edition. *The Fairmont Press, Inc.*
- Ito T, Y Nakashimada, K Senba, T Matsui, N Nishio, 2005. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **100**, 260-265.
- Kapdan IK, F Kargi, 2006. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*, **38**, 569-582.
- Lalurette E, S Thammannagowda, A Mohagheghi, PC Maness, BE Logan, 2009. Hydrogen production from cellulose in a two-stage process combining fermentation and electrohydrogenesis. *International Journal of Hydrogen Energy*. **34**, 6201-6210.
- Lo YC, WM Chen, CH Hung, SD Chen, JS Chang, 2008. Dark H<sub>2</sub> fermentation from sucrose and xylose using H<sub>2</sub>-producing indigenous bacteria: Feasibility and kinetic studies. *Water Research*, **42**, 827-842.
- Nakashimada Y, MA Rachman, T Kakizono, N Nishio, 2002. Hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox states. *International Journal of Hydrogen Energy*, **27**, 1399-1405.
- Nath K, D Das, 2004. Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. *Appl Microbial Biotechnol*, **65**, 520-529.
- Neves L, 2009. Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química e Bioquímica – Produção de Biohidrogénio por bactérias a partir de resíduos fermentescíveis, *FCT – Universidade Nova de Lisboa*.
- Marques PASS, ML Bartolomeu, MM Tomé, LM Neves. “Biohydrogen production from glycerol by a strain of *Enterobacter aerogenes*”. Artigo publicado no livro de proceedings do Congresso HYPOTHESIS VIII (comunicação oral). Lisboa 1-3 de Abril de 2009.

- Marques S, L Alves, JC Roseiro, FM Gírio, 2007. Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF and SSF using *Pichia stipitis*. *Biomass and Energy*, **32**, 400-406.
- Mota DIA, 2004. “Bio-remoção de metais pesados pela cortiça”. Relatório de estágio profissionalizante da Licenciatura em Química Tecnológica, FCL-UL.
- Passarinho PC, 2002. Destoxificação de águas ruças. *Tese para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia*, IST-UTL, Lisboa: 236-240.
- Ren N, G Cao, A Wang, DJ Lee, W Guo e Y Zhu, 2008. *Dark fermentation* of xilose and glucose mix using isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**, 6124-6132.
- Seifert K, M Waligorska, M Wojtowski, M Laniecki, 2009. Hydrogen generation from glycerol in batch fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**, 3671-3678.
- Selembo PA, JM Perez, WA Lloyd, BE Logan, 2009. High hydrogen production from glycerol or glucose by electrohydrogenesis using microbial electrolysis cells. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**, 5373-5381
- Kádár Z, 2005. Production of hydrogen and ethanol by fermentation of paper sludge, corn stover and wood. *Tese para obtenção do grau de Doutor*. Department of Agricultural Chemical Technology Budapest University of Technology and Economics.
- Wang J, W Wan, 2008. Factors influencing fermentative hydrogen production: a review. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**, 799-811.

## 6. Anexo – Metodologia do Desenho Composto Central

### 6.1 Considerações Gerais

Num planeamento pela metodologia do desenho factorial, o termo *factor* representa uma variável essencial na experiência, como por exemplo a concentração, o caudal, o pH, o tipo de tratamento, entre outros. A escolha dos factores a serem incluídos numa experiência é consequência dos objectivos experimentais e é pré-definida pelo experimentador. Além disso, consideram-se também os níveis, os quais são valores ou estados atribuídos a um determinado factor.

A escolha dos níveis depende fundamentalmente do conhecimento do sistema a otimizar e de condicionantes experimentais [Mota, D.I.A., (2004)].

Como em muitas situações, o experimentador pretende examinar simultaneamente os efeitos e interações de muitas variáveis sobre uma variável dependente, a metodologia do desenho factorial apresenta a vantagem de permitir a optimização de vários parâmetros de um sistema em estudo, reduzindo o número de ensaios a realizar [Mota, D.I.A., (2004)].

Contudo, é necessário ter algum conhecimento prévio do comportamento do sistema para se poder definir quais as variáveis a considerar e em que níveis [Passarinho, (2002)].

De seguida a apresentam-se as várias fases envolvidas na aplicação desta metodologia.

### 6.2 Planeamento do desenho factorial

No planeamento do desenho factorial, deve-se seguir o seguinte procedimento [Mota, D.I.A., (2004)]:

- a) Seleccionar as variáveis mais importantes;
- b) Definir se as variáveis devem (ou podem) ser todas incluídas no mesmo desenho ou se é necessário planear mais do que um desenho factorial;
- c) Definir os níveis -1, 0 e +1 para cada uma das variáveis, os quais devem ser simétricos;
- d) Definir os limites de expansão que serão diferentes dependendo do número de variáveis. Se esse for baixo implica uma menor extensão ( $\pm 1,414$  para 2(2),  $\pm 1,682$  para 2(3)), enquanto que se este for elevado conduz a intervalos mais alargados ( $\pm 3,363$  para 2<sup>(7)</sup>).
- e) As experiências definidas pelo desenho factorial, assim como as réplicas do ponto médio (no mínimo 3) devem ser efectuadas ao acaso, visto que permitem o estabelecimento de erros experimentais associados ao sistema em estudo [Mota, D.I.A., (2004)].

Um exemplo de planeamento do desenho factorial para 2 factores seguido neste trabalho é descrito nas Tabela 6.1 e Tabela 6.2.

Tabela 6.1– Planeamento do desenho factorial para dois parâmetros a dois níveis (-1/+1)

Sequencia	Triptona	Ext levedura
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	+	+
Ponto Medio	0	0

Tabela 6.2– Planeamento do desenho factorial expandido para dois parâmetros a dois níveis (1,414/+1,414)

Sequencia	Triptona	Ext levedura
1	-1.414	0
2	1.414	0
3	0	-1.414
4	0	1.414
Ponto Medio	0	0

## 6.3 Análise de Resultados

### 6.3.1 Estimativa dos efeitos e das interacções entre factores

De modo a determinar os efeitos e as interacções entre os factores, pode-se construir com base nas respostas experimentais obtidas, uma tabela de contrastes ou um algoritmo de Yates [Mota, D.I.A., (2004)].

De seguida, apresentam-se um exemplo de cada uma destas tabelas, tendo em conta o estudo desenvolvido neste trabalho, no qual se considerou o efeito de dois factores ( $2^{(2)}$ ), sobre a resposta do sistema em termos de razão volumétrica  $H_2/CO_2$  e volume de biohidrogénio produzido.

#### 6.3.1.1 Tabela de contraste

A tabela de contraste (Tabela 6.3) teve como base a Tabela 6.1 e Tabela 6.2 (para os níveis -1 e +1). A esta tabela foi associada a coluna que contém os valores da resposta ( $H_2/CO_2$ ) obtida para cada experiência e as colunas correspondentes às interacções entre os factores estudados. O sinal da coluna da interacção (AB) foi obtido por multiplicação dos sinais dos factores envolvidos.

Tabela 6.3 - Tabela de contraste para o desenho factorial  $2^{(2)}$ , para os factores: concentração de triptona (A) e concentração de extracto de levedura (B). A resposta considerada foi a razão volumétrica  $H_2/CO_2$

Média	A	B	AB	$H_2/CO_2$		
				Saco de Recolha	Headspace	Sistema Global
+	-	-	+	5.4	1.3	3.5
+	+	-	-	3.3	1.3	2.3
+	-	+	-	2.6	1	2.1
+	+	+	+	2.2	1.2	1.9
4	2	2	2			

O valor do efeito do factor ou da interacção entre factores foi obtido afectando os valores da última coluna ( $H_2/CO_2$ ) pelos sinais da coluna cujo factor ou interacção foi avaliado e dividindo pelos valores da última linha.

Assim, para a interacção concentração de triptona (A)/concentração de extracto de levedura (B), para o saco de recolha, *Headspace* e sistema global, tem-se, respectivamente:

$$AB = \frac{5,4 + 2,2 - 3,3 - 2,6}{2} = 0,8 \quad (15)$$

$$AB = \frac{1,3 + 1,2 - 1,3 - 1}{2} = 0,1 \quad (16)$$

$$AB = \frac{3,5 + 1,9 - 2,3 - 2,1}{2} = 0,5 \quad (17)$$

As estimativas dos efeitos de cada factor em estudo e das interacções entre estes encontram-se na Tabela 3.6.

### 6.3.1.2 Algoritmo de Yates

O algoritmo de Yates (Tabela 6.4, Tabela 6.5 e Tabela 6.6) teve como base as Tabela 6.1 e Tabela 6.2, para os níveis -1 e +1 do desenho factorial.

Tal como na tabela de contraste, também a esta tabela se associou a coluna respeitante à resposta obtida ( $H_2/CO_2$ ) para cada ensaio e mais k colunas (neste caso, k=2), cujos cálculos permitem a caracterização final dos efeitos principais e das interacções associando a cada valor o efeito definido pelo sinal positivo.

Tabela 6.4 - Aplicação do algoritmo de Yates, no desenho factorial  $2^{(2)}$ , na determinação do efeito e da interacção dos factores: concentração de triptona (A), concentração de extracto de levedura (B). A resposta considerada foi a razão volumétrica  $H_2/CO_2$  no saco de recolha

A	B	mL $H_2$ /mL $CO_2$	1	2	Divisor	Estimativa	Efeito
-	-	5.4	9	14	4	3.4	média
+	-	3.3	5	-3	2	-1.3	A
-	+	2.6	-2	-4	2	-2.0	B
+	+	2.2	0	2	2	0,8	AB

Tabela 6.5- Aplicação do algoritmo de Yates, no desenho factorial  $2^{(2)}$ , na determinação do efeito e da interacção dos factores: concentração de triptona (A), concentração de extracto de levedura (B). A resposta considerada foi a razão volumétrica  $H_2/CO_2$  na *Headspace*

A	B	mL $H_2$ /mL $CO_2$	1	2	Divisor	Estimativa	Efeito
-	-	1.3	2.6	4.8	4	1.2	média
+	-	1.3	2.2	0.2	2	0.1	A
-	+	1	0	-0.4	2	-0.2	B
+	+	1.2	0.2	0.2	2	0,1	AB

Tabela 6.6- Aplicação do algoritmo de Yates, no desenho factorial  $2^{(2)}$ , na determinação do efeito e da interacção dos factores: concentração de triptona (A), concentração de extracto de levedura (B). A resposta considerada foi a razão volumétrica  $H_2/CO_2$  no sistema global

A	B	mL $H_2$ /mL $CO_2$	1	2	divisor	estimativa	efeito
-	-	3.5	5.8	9.8	4	2.5	média
+	-	2.3	4.0	-1.4	2	-0.7	A
-	+	2.1	-1.2	-1.9	2	-0.9	B
+	+	1.9	-0.2	1.1	2	0,5	AB

Assim, os primeiros dois valores da coluna 1 obtêm-se a partir da adição de pares sucessivos da coluna resposta mL  $H_2$ /mL  $CO_2$  e os seguintes por subtracção (valor de baixo – valor de cima). A coluna 2 obtém-se utilizando os valores da coluna 1, de modo análogo ao anterior.

O valor correspondente a cada efeito ou interacção de factores obtém-se pela divisão do valor da coluna k pelo da coluna divisor (na qual a primeira célula contém o valor  $2^{(k)}$  e as restantes o valor  $2^{(k-1)}$ ) e a identificação do tipo de efeito, pela coluna em que aparece o sinal positivo da matriz inicial [Mota, D.I.A., (2004)].

### 6.3.1.3 Avaliação da significância dos efeitos

A avaliação da significância dos efeitos realiza-se através da determinação do grau de confiança, seguindo os seguintes passos:

- Cálculo da variância dos efeitos -  $V_{(efeito)}$
- Cálculo da variância dos erros -  $V_{(erros)}$
- Cálculo do factor de Fisher -  $F = \frac{V_{(efeito)}}{V_{(erros)}}$
- Determinação do nível de significância -  $\alpha = f(F, GL_1, GL_2)$
- Determinação do grau de confiança -  $P = 100(1 - \alpha)$

### 6.3.2 Determinação dos coeficientes da equação polinomial de 2ª ordem

Na equação I.4, apresenta-se o polinómio que representa um desenho factorial expandido de duas variáveis

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad (18)$$

Em que, Y é a resposta obtida para cada ensaio e x o factor estudado. Para a determinação dos coeficientes polinomiais desta equação, constrói-se uma nova matriz fazendo a correspondência entre a resposta obtida e os valores de cada factor para os vários ensaios.

Os coeficientes da equação são calculados por regressão múltipla linear. O conhecimento destes coeficientes permite determinar os valores teóricos para a resposta, razão volumétrica ( $H_2/CO_2$ ).

### 6.3.3 Análise estatística do modelo

A análise estatística do modelo é efectuada através do teste F da variância e da determinação do coeficiente de correlação,  $r^2$ , que permitem avaliar o ajuste do modelo relativamente aos dados experimentais.

A variável aleatória F é dada por:

$$F = \frac{SQ_{lof}/m}{SQ_{exp}/n} \quad (19)$$

Em que,  $SQ_{lof} = \sum(Y_{rep} - \hat{Y})^2$  e  $SQ_{exp} = \sum(Y - Y_{rep})^2$ ;  $Y_{rep}$  é a média dos valores experimentais das réplicas do ponto médio;  $\hat{Y}$  é o valor estimado para cada ensaio e Y é o valor experimental; m (diferença entre o número total de experiências diferentes e o número de coeficientes do modelo) e n (diferença entre o número total de experiências e o número total de experiências diferentes) são os graus de liberdade associados, respectivamente, a  $SQ_{lof}$  e  $SQ_{exp}$ .

Assim, relativamente ao valor de F, se for inferior ao valor tabelado  $F_{\text{crítico}}$  (Tabela 6.7), para igual número de graus de liberdade e para um determinado intervalo de confiança, indica uma elevada probabilidade do modelo encontrado ser adequado para o sistema em estudo.

Quanto ao valor do quadrado do coeficiente de correlação ( $r^2$ ), o qual é dado pela equação 20, quanto mais próximo de 1 este estiver, com maior confiança o modelo poderá ser aplicado à situação experimental em estudo.

$$r^2 = \frac{SQ_{fact}}{SQ_{Corr}} \quad (20)$$

Onde,  $SQ_{fact} = \sum(\hat{Y} - Y_{med})^2$  e  $SQ_{Corr} = \sum(Y - Y_{med})^2$ .

Tabela 6.7 - Valores de  $F_{\text{crítico}}$  para um intervalo de confiança de 95%.

$n_1$	$n_2$											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	20
1	161,4	199,5	215,7	224,6	230,2	234,0	236,8	238,9	240,5	241,9	245,9	248,0
2	18,51	19,00	<u>19,16</u>	19,25	19,30	19,33	19,35	19,37	19,38	19,40	19,43	19,446
3	10,128	9,552	9,277	9,117	9,013	8,941	8,887	8,845	8,812	8,786	8,703	8,660
4	7,709	6,944	6,591	6,388	6,256	6,163	6,094	6,041	5,999	5,964	5,858	5,803
5	6,608	5,786	5,409	5,192	5,050	4,950	4,876	4,818	4,772	4,735	4,619	4,558
6	5,987	5,143	4,757	4,534	4,387	4,284	4,207	4,147	4,099	4,060	3,938	3,874
7	5,591	4,737	4,347	4,120	3,972	3,866	3,787	3,726	3,677	3,637	3,511	3,445
8	5,318	4,459	4,066	3,838	3,687	3,581	3,500	3,438	3,388	3,347	3,218	3,150
9	5,117	4,256	3,863	3,633	3,482	3,374	3,293	3,230	3,179	3,137	3,006	2,936
10	4,965	4,103	3,708	3,478	3,326	3,217	3,135	3,072	3,020	2,978	2,845	2,774
15	4,543	3,682	3,287	3,056	2,901	2,790	2,707	2,641	2,588	2,544	2,403	2,328
20	4,351	3,493	3,098	2,866	2,711	2,599	2,514	2,447	2,393	2,348	2,203	2,124

$n_1 = m$ , corresponde ao número de graus de liberdade no denominador;  $n_2 = n$ , corresponde ao número de graus de liberdade no denominador.

Os valores de F podem ser encontrados em qualquer livro de estatística ou podem ser obtidos, usando no Excel, a fórmula: =INVF(0,05,  $n_1$ ,  $n_2$ ).

#### 6.4 Metodologia da superfície de resposta

A representação gráfica para o modelo de dependência polinomial encontrado é uma representação tridimensional de superfície de resposta, na qual se avalia a variação da resposta do sistema com a

variação de dois dos factores, mantendo as restantes num valor constante, como se encontra representado nas Fig. 3.3, Fig. 3.4 e Fig. 3.5.

## 6.5 Resultados experimentais do Desenho Composto Central

Nesta tese de mestrado, a aplicação da metodologia do desenho factorial na determinação dos efeitos e das interacções entre os vários factores estudados, foi realizada através da construção de uma tabela de contrastes, a qual teve por base os resultados obtidos nos ensaios experimentais.

De seguida apresentam-se os resultados que conduziram à construção das tabelas de contrastes para o desenho factorial  $2^{(2)}$ .

### 6.5.1 Desenho Factorial $2^{(2)}$

Parâmetros estudados na optimização da produção de hidrogénio por *E. aerogenes* com glicerol contido nos resíduos duma fábrica de produção de biodiesel:

- Concentração inicial de triptona (g/L)
- Concentração inicial de extracto de levedura (g/L)

Resposta: Razão volumétrica  $H_2/CO_2$ , no saco de recolha, na *Headspace* e no sistema global.

Tabela 6.8 - Valores da razão volumétrica  $H_2/CO_2$  obtidos sob as condições experimentais estabelecidas para o desenho (-1/+1).

Experiência	Triptona (g/L)	Ext Levedura (g/L)	$H_2/CO_2$		
			Saco de recolha	<i>Headspace</i>	Sistema Global
1	1,2	1,2	5,4	1,3	3,5
2	4,3	1,2	3,3	1,3	2,3
3	1,2	4,3	2,6	1,0	2,1
4	4,3	4,3	2,2	1,2	1,9

Tabela 6.9 - Valores da razão volumétrica  $H_2/CO_2$  obtidas sob as condições experimentais estabelecidas para a expansão (-1,414/+1,414).

Experiência	Triptona (g/L)	Ext Levedura (g/L)	$H_2/CO_2$		
			<i>Headspace</i>	Saco de recolha	Sistema Global
#1	0,5	2,8	2,8	1,3	2,3
#2	5	2,8	3,3	1,3	2,6
#3	2,8	0,5	2,6	1,1	1,9
#4	2,8	5	3,1	1,0	2,5

Tabela 6.10 - Valores da razão volumétrica  $H_2/CO_2$  obtidas sob as condições experimentais estabelecidas para o ponto médio

Experiência	Triptona (g/L)	Ext Levedura (g/L)	$H_2/CO_2$		
			Saco de recolha	<i>Headspace</i>	Sistema Global
1	2,8	2,8	3,4	1,3	2,5
2	2,8	2,8	3,3	1,2	2,3
3	2,8	2,8	3,4	1,3	2,5