

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO VIA FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA – ASPECTOS GERAIS E POSSIBILIDADE DE UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS BRASILEIROS**Lívian R. Vasconcelos de Sá^{a,b}, Magali C. Cammarota^c e Viridiana S. Ferreira-Leitão^{a,b,*}**^aDivisão de Catálise e Processos Químicos, Instituto Nacional de Tecnologia/MCTI, 20081-312 Rio de Janeiro – RJ, Brasil^bDepartamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-909 Rio de Janeiro – RJ, Brasil^cDepartamento de Engenharia Bioquímica, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-909 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Recebido em 26/06/2013; aceito em 17/12/2013; publicado na web em 03/04/2014

HYDROGEN PRODUCTION BY ANAEROBIC FERMENTATION – GENERAL ASPECTS AND POSSIBILITY OF USING BRAZILIAN AGRO-INDUSTRIAL WASTES. Biological production of hydrogen through anaerobic fermentation has received increasing attention and offers a great potential as an alternative process for clean fuel production in the future. Considering biological systems for H₂ production, anaerobic fermentation stands out, primarily due to its higher production of H₂ compared with other biological processes. In addition the possibility of using different agro-industrial wastes as substrates opens up infinite possibilities. The development and implementation of sustainable processes for converting renewable materials into different value-added products is essential for the full exploitation of Brazilian agro-industrial wastes.

Keywords: biological hydrogen; anaerobic fermentation; agro-industrial wastes.

INTRODUÇÃO

O aumento das necessidades energéticas mundiais, o esgotamento das reservas de combustíveis fósseis e os problemas ambientais relacionados ao uso contínuo destes combustíveis, definem um novo panorama para o século XXI e determinam que novas políticas referentes a fontes de energia sejam adotadas. O alarmante crescimento da procura por fontes de energia, associado à incerteza quanto à disponibilidade e preço do petróleo, conduzem à adoção de práticas para o desenvolvimento e exploração de novos recursos energéticos.¹

Assegurar a geração de energia, com as devidas precauções em relação ao meio ambiente, tem sido um dos mais relevantes desafios atuais. O debate sobre o aquecimento global vem se acentuando nas últimas décadas, resultando no estudo e na utilização de fontes alternativas de energia, menos poluentes que as atuais. É neste contexto que a produção de hidrogênio surge como uma alternativa bastante atraente.

O uso do hidrogênio como vetor energético tem sido considerado tanto para a geração de energia elétrica, a partir de sua utilização em células a combustível, quanto para o transporte, por meio de células a combustível ou motores de combustão interna.^{2,3} Uma das maiores motivações para tal é o nível muito reduzido de emissões associadas à sua utilização. No entanto, ao se analisar os ganhos ambientais efetivos, deve-se considerar a matéria prima utilizada no processo de geração do hidrogênio, uma vez que diferentes fontes, renováveis ou não, podem ser utilizadas.⁴

O desenvolvimento de tecnologias para produção biológica de hidrogênio a partir de biomassa constitui uma área bastante promissora. Dentre os sistemas biológicos para produção de H₂, a fermentação anaeróbia tem se destacado, devido principalmente à maior produção de H₂ quando comparada aos outros processos biológicos e a possibilidade de utilização de diferentes materiais residuais como substrato.

A utilização de materiais residuais e o seu processamento com tecnologias pouco poluidoras são uma tendência mundial. Questões ambientais têm alavancado o interesse por fontes renováveis e os resíduos

agroindustriais tornaram-se uma importante fonte para a produção de novos materiais, produtos químicos e energia.⁵ O desenvolvimento e implementação de processos sustentáveis, capazes de converter biomassa em vários produtos com alto valor agregado, é uma necessidade absoluta para o aproveitamento dos resíduos agroindustriais brasileiros e redução do impacto ambiental associado ao descarte inadequado dos mesmos.

Deste modo, este trabalho tem como objetivo mostrar os principais aspectos envolvidos na produção biológica de hidrogênio por processo de fermentação anaeróbia utilizando diferentes resíduos agroindustriais brasileiros.

HIDROGÊNIO – VETOR ENERGÉTICO

Atualmente, as intensas mudanças climáticas globais e o fornecimento futuro de energia têm estimulado o desenvolvimento de pesquisas baseadas em combustíveis alternativos. Dentro deste contexto, o hidrogênio (H₂) tem despertado grande interesse, visto que a sua combustão direta produz uma quantidade significativa de energia e libera apenas água ($H_2 + 1/2 O_2 \rightarrow H_2O$).^{3,6} Além disso, o hidrogênio apresenta uma elevada densidade energética (da ordem de 142 kJ g⁻¹), sendo aproximadamente três vezes superior quando comparada aos combustíveis à base de hidrocarbonetos pesados.⁷

O hidrogênio pode ser utilizado diretamente como combustível em motores de combustão ou em células a combustível.^{2,3} Além do mais, os processos de produção de hidrogênio a partir de matérias-primas renováveis ou não renováveis permitem certa flexibilidade em relação à tecnologia, tornando-o uma promissora alternativa energética.⁴

A maior utilização do hidrogênio hoje é como reagente em indústrias químicas e petroquímicas para a produção de fertilizantes (com uma quota de 50%), seguida pelo tratamento do petróleo bruto (aproximadamente 37%).^{2,3} Além destes processos, o hidrogênio é também utilizado como reagente nos processos de hidrogenação, como combustível para motores de foguete e como fluido de refrigeração em geradores elétricos.⁸

Atualmente, os métodos de produção de hidrogênio podem ser divididos em função das três principais matérias-primas utilizadas:

*e-mail: viridiana.leitao@int.gov.br

combustíveis fósseis, água e biomassa. Alguns dos processos mais significativos estão citados na Tabela 1.⁹

Tabela 1. Métodos de produção de hidrogênio a partir das três principais matérias-primas utilizadas: combustíveis fósseis, água e biomassa⁹

Matérias-primas	Métodos
Combustíveis fósseis	Reforma a vapor do gás natural
	Oxidação parcial de hidrocarbonetos pesados
	Gaseificação do carvão
Água	Eletrólise da água
	Processos foto-eletrouquímicos
	Processos termoquímicos
Biomassa	Processos biológicos (biofotólise da água, foto-fermentação e fermentação anaeróbia)
	Gaseificação da biomassa
	Reforma a vapor do etanol
	Reforma em fase líquida

Entre os métodos citados na Tabela 1, estima-se que a reforma do gás natural contribui com cerca de 40% do hidrogênio produzido, seguido pela oxidação de hidrocarbonetos pesados (30%), gaseificação do carvão (18%) e eletrólise da água (5%).² Atualmente, a produção biológica de hidrogênio contribui com apenas 1% da produção total de hidrogênio. No entanto, espera-se que esta porcentagem cresça exponencialmente com o desenvolvimento de novas técnicas e processos.¹⁰

O desenvolvimento de tecnologias para a produção biológica de hidrogênio é uma área bastante promissora. Os processos de obtenção de hidrogênio por via microbiana vêm ganhando grande destaque devido à possibilidade de utilização de fontes renováveis de energia, bem como o reaproveitamento de materiais residuais, diminuindo assim a quantidade de subprodutos armazenados nas indústrias. Além disso, estes processos são adequados para a produção descentralizada de energia, em instalações de pequena escala, em locais onde a biomassa ou os resíduos estão disponíveis, evitando custos adicionais com o transporte.³ Os processos biológicos são geralmente operados à temperatura e pressão ambientes, levando assim a um menor consumo de energia e a balanços energéticos favoráveis.^{7,8}

Tabela 2. Vantagens, desvantagens e principais micro-organismos estudados para produção de hidrogênio biológico

Processos biológicos	Vantagens	Desvantagens	Micro-organismos	Referências			
Biofotólise direta	Produção de H ₂ a partir da água;	Necessita de iluminação constante;	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	13			
	Não necessita de ATP.				Inibição das hidrogenases pelo O ₂ ;	<i>Platymonas subcordiformis</i>	14
Biofotólise indireta	Produção de H ₂ a partir da água;	Necessita de iluminação constante;	<i>Plectonema boryanum</i>	15			
	Habilidade de fixação de N ₂ e produção de H ₂ pelas nitrogenases;				Biorreatores modificados para maximizar a utilização da energia solar;	<i>Anabaena siamensis</i>	16
	Separação espacial do O ₂ e H ₂ nas células diferenciadas (heterocistos);				Necessidade de ATP pelas nitrogenases;	<i>Anabaena variabilis</i>	17
	Separação temporal (dia/noite) em células não-heterocísticas.				Síntese e manutenção dos heterocistos;	<i>Synechocystis</i> sp.	18
					CO ₂ presente no gás.	<i>Cyanothece</i> sp.	19
Foto-fermentação	Utilização de diferentes resíduos e efluentes como substrato;	Necessita de iluminação;	<i>Rhodospseudomonas palustris</i>	21			
	Utilização de amplo espectro de luz pelas bactérias fotossintéticas.				Biorreatores modificados para maximizar a utilização da energia solar;	<i>Rhodobacter</i> sp.	22
					CO ₂ presente no gás.	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	23
						<i>Rhodobacter capsulatus</i>	24
Fermentação anaeróbia	Ampla variedade de fontes de carbono como substrato;	Tratamento do efluente após fermentação;	<i>Clostridium</i> sp.	25			
	Não necessita de iluminação;				CO ₂ presente no gás.	<i>Clostridium butyricum</i>	26
	Produção de metabólitos intermediários de grande valor agregado;					<i>Clostridium beijerinckii</i>	27
	Não há limitações com relação ao O ₂ .					<i>Citrobacter freundii</i>	28
						<i>Enterobacter cloacae</i>	29
						<i>Enterobacter aerogenes</i>	30
						<i>Escherichia coli</i>	31
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	32				

PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO

A produção de hidrogênio via processo biológico pode ser realizada por meio de: biofotólise direta da água utilizando algas verdes, biofotólise indireta da água por cianobactérias, fotofermentação de compostos orgânicos por meio de bactérias fotossintéticas, fermentação anaeróbia de compostos orgânicos através de bactérias fermentativas e sistemas híbridos utilizando bactérias fotossintéticas e fermentativas.^{2,11}

A biofotólise direta da água, geralmente realizada por algas verdes em condições anaeróbias, está associada à ação da energia luminosa sobre um sistema biológico, resultando na decomposição da água e produção de hidrogênio. A biofotólise indireta envolve tipicamente cianobactérias que utilizam a energia armazenada nos carboidratos oriundos da fotossíntese para gerar hidrogênio a partir da água. A foto-fermentação é realizada por bactérias púrpuras não sulfurosas que utilizam a energia luminosa para transformar ácidos orgânicos em H₂ e CO₂. Finalmente, o processo de fermentação anaeróbia envolve bactérias anaeróbias que convertem carboidratos em hidrogênio. Todos os processos mencionados podem ser combinados de forma a expandir as possibilidades tecnológicas de produção do hidrogênio biológico.¹² A Tabela 2 apresenta as principais vantagens e desvantagens dos processos biológicos mencionados.^{2,11}

Dentre os sistemas apresentados na Tabela 2, a produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia tem despertado grande interesse, devido principalmente a uma maior produção de hidrogênio quando comparada aos outros processos biológicos.^{6,33,34} A produção de hidrogênio por meio de bactérias fermentativas permite uma geração contínua e em ritmo sustentado, uma vez que não há inibição pela ausência de iluminação. Além disso, os micro-organismos fermentativos são mais eficazes na produção de hidrogênio em um curto intervalo de tempo quando comparados aos micro-organismos responsáveis pelos processos fotobiológicos.²

Metabólitos intermediários de alto valor agregado são gerados pelo metabolismo das bactérias fermentativas.⁸ O processo fermentativo permite ainda a utilização de diferentes tipos de resíduos como substrato, tais como materiais lignocelulósicos, glicerina, resíduos alimentícios e lácteos, entre outros.³⁵ Neste contexto, a produção de

hidrogênio via fermentação anaeróbia apresenta-se como uma alternativa muito interessante de um ponto de vista técnico e ambiental.⁸

ASPECTOS GERAIS DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA

A fermentação anaeróbia consiste em um processo biológico no qual um consórcio de diferentes tipos de micro-organismos promove a transformação de compostos orgânicos complexos (carboidratos, proteínas e lipídios) em produtos mais simples, tais como ácidos orgânicos voláteis (ácidos acético, propiônico, isobutírico e butírico), álcoois (etanol, butanol), H_2 , CO_2 e CH_4 .³⁶ A degradação da matéria orgânica em ambientes anaeróbios envolve a cooperação entre diferentes micro-organismos responsáveis por uma fermentação estável e autorregulada.^{37,38}

O processo de fermentação anaeróbia é desenvolvido em quatro etapas principais: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Na primeira fase do processo fermentativo, bactérias hidrolíticas produzem enzimas extracelulares que promovem a degradação dos materiais particulados complexos em materiais dissolvidos mais simples, os quais são permeáveis às membranas celulares das bactérias fermentativas. Na fase acidogênica, os produtos solúveis oriundos da etapa anterior são metabolizados no interior das células das bactérias, sendo convertidos em compostos mais simples. Os compostos produzidos incluem ácidos orgânicos voláteis, álcoois, CO_2 , H_2 , além de novas células bacterianas. As bactérias acetogênicas são responsáveis pela oxidação dos produtos gerados na fase acidogênica em substrato apropriado (H_2 e ácido acético) para as arqueias metanogênicas. Nesta etapa do processo, o H_2 pode também ser convertido em ácido acético pelas bactérias homoacetogênicas. Na última etapa do processo, as arqueias metanogênicas convertem o H_2 e o ácido acético em CH_4 e CO_2 . Em função de sua afinidade pelo substrato, as arqueias metanogênicas podem ser divididas em metanogênicas acetoclásticas (arqueias que utilizam o ácido acético como substrato) e metanogênicas hidrogenotróficas (arqueias que utilizam o hidrogênio como substrato). Na presença de sulfato e nitrato no meio fermentativo, as bactérias nitrato-redutoras (BNR) e as bactérias sulfato-redutoras (BSR) são capazes de utilizar o H_2 para formação de amônia e sulfeto, respectivamente.^{39,40} Uma representação esquemática das principais etapas do processo fermentativo anaeróbio é apresentada na Figura 1.

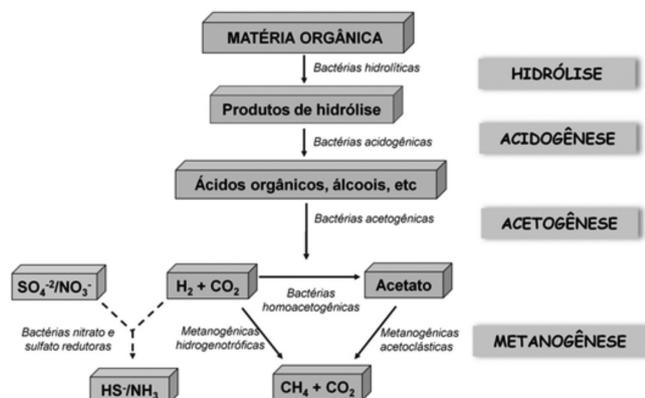


Figura 1. Representação esquemática das principais etapas do processo fermentativo anaeróbio

FATORES QUE INFLUENCIAM O PROCESSO FERMENTATIVO ANAERÓBIO

A produção de hidrogênio a partir do processo de fermentação anaeróbia pode ser influenciada por uma série de condições

operacionais e parâmetros físico-químicos, tais como o tipo de inóculo, temperatura, pH, modo de operação do reator e pressão parcial de hidrogênio.^{41,42}

Tipo de inóculo

A produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia pode ser realizada por meio de culturas microbianas mistas, derivadas de ambientes naturais, ou por culturas puras, selecionadas a partir de bactérias produtoras de H_2 .

Diferentes linhagens bacterianas têm sido utilizadas para produzir H_2 a partir dos mais diferenciados substratos. As vantagens da utilização de culturas puras estão relacionadas à seletividade do substrato, à melhor manipulação do metabolismo através de alterações das condições de crescimento, aos elevados rendimentos de H_2 e à redução de subprodutos. Por outro lado, culturas puras são sensíveis à contaminação, o que implica, na maioria dos casos, no emprego de condições assépticas e aumento do custo global do processo.⁴¹

Diversos tipos de micro-organismos têm sido utilizados para produção de H_2 via processo fermentativo. Dentre eles, se destacam as espécies pertencentes ao gênero *Clostridium*, devido ao seu rápido metabolismo e sua capacidade de formar esporos frente a condições adversas. Bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Enterobacter* e *Thermoanaerobacterium* também têm sido relatadas como potenciais produtoras de H_2 .⁴³

A utilização de culturas mistas para processos em grande escala é considerada favorável devido ao controle e operação do processo serem facilitados pela utilização de meios não estéreis, reduzindo o custo global.⁴¹ A redução do custo pode ser ainda enfatizada quando empregadas culturas mistas a partir de fontes naturais, tais como solo, lodo de esgoto, excreta de animais ou resíduos.⁴⁴⁻⁴⁸

A desvantagem na utilização de culturas mistas, em termos da viabilidade econômica do processo de produção de H_2 , está relacionada à presença, sempre provável, de micro-organismos consumidores de H_2 , tais como as arqueias metanogênicas, as bactérias homoacetogênicas e as bactérias sulfato e nitrato redutoras.^{41,49} A estratégia para minimizar este efeito consiste no pré-tratamento do inóculo, que possui a finalidade de inibir e/ou eliminar os micro-organismos consumidores de H_2 , bem como selecionar os micro-organismos produtores de H_2 .⁵⁰

As arqueias metanogênicas, principais micro-organismos consumidores de H_2 na maioria dos ambientes anaeróbios, não possuem capacidade de esporular, não sobrevivendo, portanto, sob temperaturas extremas.^{38,51} O pH também constitui um fator de influência na atividade das arqueias metanogênicas no meio fermentativo, visto que a maioria destes micro-organismos cresce somente na faixa de pH de 6 a 8.⁵²

O pré-tratamento térmico é capaz de prevenir a metanogênese, no entanto, não inibe o consumo de H_2 pelas bactérias homoacetogênicas. A presença de bactérias homoacetogênicas no meio fermentativo pré-tratado ocorre em virtude de algumas destas bactérias pertencerem ao gênero *Clostridium* (micro-organismos formadores de esporos resistentes a altas temperaturas), tais como *C. aceticum* e *C. thermoautotrophicum*.⁵³ Estudos mostram que a atividade deste tipo de bactéria no inóculo pode ser suprimida através da remoção de CO_2 do *headspace*, uma vez que estas bactérias necessitam concomitantemente de CO_2 e H_2 para conversão a ácido acético.⁵⁴

As bactérias que utilizam nitrato ou sulfato como aceptores de elétrons são mais eficientes em baixas concentrações de H_2 no meio. Além disso, estas bactérias só competem com as bactérias homoacetogênicas e com as arqueias metanogênicas na presença de nitrato e sulfato em excesso.⁵⁵ Valores de pH menores que 6 inibem consideravelmente a atividade das bactérias sulfato-redutoras.⁵⁶

Tabela 3. Comparação de diferentes métodos de pré-tratamento de inóculo para produção de H₂ por fermentação anaeróbia

Inóculo	Substrato	pH inicial	Temperatura (°C)	Pré-tratamentos testados	Pré-tratamento ótimo	Rendimento máximo de H ₂ (mol de H ₂ /mol de substrato)	Referências
Lodo anaeróbio de produção de etanol	Glicose	5,5	37	T, AC, ALC e adição de ácido linoleico	Adição de ácido linoleico	1,70	57
Lodo ativado de ETE	Glicose	7,0	35	T, AC, ALC, AER, adição de clorofórmio e BESA*	AC	1,51	58
Lodo de ETE	Glicose	-	35	T, AC, ALC, AER	AER	1,96	59
Lodo de digestor de ETE	Glicose	6,0	37	T, AC, ALC, choque de carga, adição de ácido linoleico e BESA*	Adição de ácido linoleico	1,69	60
Lodo anaeróbio digerido de ETE	Glicose	5,5	55	T, AC e choque de carga	T	1,77	61
Lodo de digestor de ETE	Glicose	7,0	35	T, AC, ALC, Q, AER, adição de clorofórmio	T	1,78	62
Lodo anaeróbio de reator de tratamento de efluente de processamento de soja	Sacarose	5,5	35	T, AC, ALC	T	4,00	63
Lodo anaeróbio de planta de óleo de palma	Sacarose	5,5	60	T, AC, ALC, adição de BESA*, choque de carga	Choque de carga	1,96	64
Lodo de ETE	Sacarose	5,5	35	T, AC, ALC	T	4,62	65

*BESA = ácido 2-bromoetanolsulfônico, ETE = estação de tratamento de esgoto, T = térmico, AC = ácido, ALC = alcalino, AER = aeração.

Vários tipos de pré-tratamento do inóculo têm sido utilizados, tais como pré-tratamentos químicos (ácido, alcalino, adição de compostos químicos) e físicos (térmico, congelamento/descongelamento, aeração). A Tabela 3 apresenta alguns exemplos de métodos de pré-tratamento de inóculo para produção de H₂ via fermentação anaeróbia.

Como pode ser observado na Tabela 3, existem muitas diferenças com relação ao pré-tratamento ótimo para enriquecimento das bactérias produtoras de H₂ a partir de culturas mistas. Esta discordância está relacionada a inúmeros fatores, tais como o tipo e origem do inóculo utilizado, condições do pré-tratamento e do processo fermentativo e tipo de substrato.^{41,64,66}

A capacidade dos micro-organismos atuarem na decomposição de um determinado substrato em H₂ está relacionada à presença de enzimas específicas, tais como as hidrogenases.⁶⁷ Estas enzimas são responsáveis pela catálise da reação reversível de oxidação do hidrogênio ($2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2$).^{33,68}

As hidrogenases podem ser agrupadas, de maneira geral, em duas classes distintas, baseadas no tipo de metal encontrado em seus respectivos centros catalíticos: aquelas que contêm somente ferro são chamadas de [FeFe]-hidrogenases e aquelas que contêm níquel e ferro são denominadas [NiFe]-hidrogenases. Algumas enzimas também podem apresentar o selênio, além do níquel e do ferro no centro catalítico, sendo denominadas [NiFeSe]-hidrogenases.^{33,69}

As [FeFe]-hidrogenases são geralmente encontradas em micro-organismos produtores de H₂, tais como os do gênero *Clostridium*. As [NiFe]-hidrogenases e as [NiFeSe]-hidrogenases são frequentemente encontradas em micro-organismos consumidores de H₂, tais como as arqueias metanogênicas e as bactérias redutoras de sulfato.^{68,69}

Recentemente, o nível de expressão do gene hidrogenase (*hyd*) tem sido utilizado como indicador da produção de H₂ em diferentes sistemas.⁷⁰⁻⁷² Estudos preliminares realizados por nosso grupo investigaram a possibilidade da razão entre os ácidos acético e butírico (HAc/HBu) e do nível de expressão do gene hidrogenase funcionarem

como ferramentas na avaliação do desempenho das comunidades bacterianas na produção de H₂ via fermentação anaeróbia.⁵⁰ Neste estudo, foram utilizados o inóculo *in natura* e o inóculo pré-tratado termicamente e sacarose como substrato. O meio contendo inóculo *in natura* apresentou uma razão dos ácidos acético e butírico de aproximadamente 4, sendo que o mesmo parâmetro foi de 7 quando utilizado o inóculo pré-tratado termicamente. Estudos de biologia molecular confirmaram a presença de micro-organismos do gênero *Clostridium* e de hidrogenases de *Clostridium* em todas as condições estudadas, inóculo *in natura* e pré-tratado, antes e após 24 h de fermentação. Através de dados obtidos por RT-PCR, em tempo real, foi possível observar que o inóculo pré-tratado termicamente apresentou um nível de expressão do gene hidrogenase três vezes maior quando comparado ao inóculo *in natura*, indicando elevada produção de H₂. Deste modo, a combinação destes dois parâmetros, razão HAc/HBu e nível de expressão das hidrogenases pode ser utilizada como ferramenta na avaliação do desempenho das comunidades bacterianas para produção de H₂.⁵⁰

Temperatura

A temperatura é considerada um dos principais fatores de influência na produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia. As reações de fermentação podem ser conduzidas em faixas de temperatura mesofílica (25-40 °C), termofílica (40-65 °C), termofílica extrema (65-80 °C) e hipertermofílica (> 80 °C).³⁴ A maioria dos estudos de produção de H₂ fermentativo tem utilizado a faixa de temperatura mesofílica. Li e colaboradores (2007) citam que 73 dos 121 estudos de caso foram realizados em temperatura mesofílica.⁷³ A Tabela 4 apresenta alguns estudos que investigaram o efeito da temperatura no processo de produção do H₂ fermentativo. A temperatura ótima para cada processo depende do tipo e origem do inóculo, da quantidade de compostos biodegradáveis e das condições operacionais do sistema.⁵²

Tabela 4. Estudos sobre o efeito da temperatura na produção de H₂ fermentativo

Inóculo	Substrato	Temperatura (°C)		Rendimento máximo de H ₂ (mol de H ₂ /mol de substrato)	Referências
		Faixa estudada	Temperatura ótima		
Lodo anaeróbio	Glicose	33-41	41	1,67	74
Lodo de esgoto municipal	Xilose	30-55	50	1,30	75
Lodo anaeróbio	Sacarose	25-45	35	3,73	76
Cultura mista anaeróbia	Glicose	37-65	45	1,71	77
Lodo de tratamento de águas residuárias	Sacarose	30-45	40	3,88	78
<i>Clostridium acetobutyricum</i> ATCC824	Glicose	30-40	37	2,00	79
<i>Ethanoligenens harbiense</i>	Glicose	20-50	35	1,92	80
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	Sacarose	45-70	60	2,53	53

pH

O pH constitui outro fator que influencia fortemente no processo de produção de H₂ fermentativo. Dois diferentes tipos de experimentos têm sido conduzidos para determinação do pH ótimo para produção de H₂. O primeiro envolve o ajuste de diferentes valores iniciais de pH, enquanto o outro envolve o controle e manutenção do mesmo pH durante todo o processo fermentativo. Rendimentos de H₂ utilizando o ajuste do pH inicial bem como a manutenção do pH controlado podem ser analisados na Tabela 5.

Estudos mostram que o pH ótimo em termos de produção de H₂ se encontra na faixa de 5 a 7, sendo o pH em torno de 5,5 relacionado aos melhores rendimentos de produção de H₂.^{86,87} O pH dentro da faixa supracitada favorece a atividade das enzimas envolvidas no processo de produção do H₂, bem como permite a inibição dos micro-organismos consumidores de H₂ presentes no meio fermentativo.^{37,73}

O pH afeta não somente o rendimento da produção de H₂ em culturas mistas, mas também modifica o espectro de subprodutos formados, bem como promove alterações nas comunidades bacterianas presentes no meio fermentativo.^{88,89} Temudo e colaboradores (2008) estudaram o impacto do pH na atividade metabólica e na diversidade microbiana no processo fermentativo com glicose, xilose e glicerol a 30 °C.⁹⁰ Os autores observaram que em pH baixo (< 6), os principais metabólitos formados consistiam dos ácidos butírico e acético, enquanto que em elevados valores de pH o espectro de produtos formados mudava para ácido acético e etanol. Além disso, os autores observaram que em ambas as condições, pH baixo ou elevado, havia a predominância de espécies do gênero *Clostridium*, enquanto

que em valores intermediários de pH havia uma maior diversidade microbiana no meio fermentativo.

Modo operacional do reator

A maioria dos estudos relacionados à produção de H₂ por via fermentativa anaeróbia tem sido conduzida em reatores operados em batelada. Reatores em batelada possuem a vantagem de serem simples, flexíveis e de fácil operação. No entanto, operações em grande escala requerem processos contínuos de produção por razões práticas e econômicas.^{42,52}

No processo contínuo em escala laboratorial, o reator de tanque agitado contínuo (*continuous stirred tank reactor – CSTR*) tem sido comumente utilizado.⁹¹ Outros tipos de reatores também têm sido utilizados, tais como o reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (*upflow anaerobic sludge blanket – UASB*), o biorreator de leito empacotado, o reator de leito fixo, o biorreator de leito fixo e fluxo ascendente, o reator batelada anaeróbio em série e o reator de leito fluidizado anaeróbio, entre outros.⁹²⁻⁹⁷

Em alguns estudos de produção de H₂, verificou-se que o processo em batelada apresenta maiores rendimentos de H₂ quando comparado ao modo contínuo. Isto pode ser atribuído ao microambiente substancialmente diferente no reator em batelada quando comparado aos reatores contínuos.^{41,56,98}

Pressão parcial de hidrogênio

A pressão parcial de hidrogênio no biorreator constitui um fator importante que influencia fortemente no processo de produção de

Tabela 5. Efeito do pH na produção de H₂ fermentativo

Inóculo	Substrato	pH inicial		Rendimento máximo de H ₂ (mol de H ₂ /mol de substrato)	Referências
		Faixa estudada	pH ótimo		
Ajuste do pH inicial					
Lodo anaeróbio	Amido	5,0-7,0	5,0	1,10	81
Lodo de esgoto municipal	Xilose	5,0-8,0	6,5	1,30	82
<i>Clostridium butyricum</i>	Sacarose	5,0-6,5	5,5	2,78	83
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	Sacarose	4,0-8,5	6,2	2,53	53
Controle do pH durante o processo					
<i>Ethanoligenens harbiense</i>	Glicose	3,0-8,0	5,0	1,92	80
Cultura mista	Sacarose	3,4-6,3	4,2	1,61	84
Lodo anaeróbio	Sacarose	4,7-6,3	5,5	3,73	76
Lodo anaeróbio	Glicose	4,0-7,0	5,5	2,10	85

H₂ por via fermentativa. Elevada pressão parcial de H₂ no meio fermentativo pode favorecer a ocorrência da solventogênese, fase na qual é observada a formação de ácido láctico e alguns solventes (etanol, butanol e acetona). Estudos mostram que as vias metabólicas para síntese de H₂ são sensíveis a elevadas concentrações de H₂ e estão sujeitas à inibição pelo produto. Deste modo, um aumento da pressão parcial de H₂ diminui a síntese deste e as vias metabólicas são direcionadas para produção de metabólitos mais reduzidos, tais como ácido láctico, etanol, butanol e acetona.³⁴

Diversos estudos têm sido conduzidos de modo a diminuir a pressão parcial de H₂ no biorreator, favorecendo, deste modo, a síntese de H₂. Dentre estes processos se destacam as purgas com gás inerte no sistema fermentativo ou a coleta periódica e regular dos gases produzidos.^{37,99,100} Apesar dos inúmeros estudos sobre este assunto, uma investigação mais detalhada sobre este tema se torna necessária de modo a viabilizar a produção de H₂ em grande escala.³⁷

POTENCIAIS SUBSTRATOS PARA PRODUÇÃO DE H₂

Uma grande variedade de materiais ricos em carboidratos, lipídios e/ou proteínas podem ser utilizados como substratos na produção de H₂ por via biológica. No entanto, conforme descrito em inúmeros estudos, os carboidratos constituem a fonte preferida de carbono orgânico no processo fermentativo.^{42,47,52}

Disponibilidade, custo e biodegradabilidade constituem os principais critérios para seleção de substratos adequados para a produção de H₂ fermentativo.¹⁰¹ Carboidratos simples, como sacarose e glicose, são facilmente biodegradáveis, sendo por esse motivo utilizados como substratos modelo para a produção de hidrogênio biológico. No entanto, fontes puras de carboidratos representam matérias-primas caras para produção de H₂ em grande escala, sendo viáveis apenas quando baseadas em fontes renováveis e de baixo custo.^{2,41} É neste contexto que se destaca a utilização de materiais residuais como potenciais substratos para a produção de H₂. A biotransformação de resíduos em H₂ pode ser considerada bastante atraente do ponto de vista ambiental (energia renovável) e econômica (recuperação de recursos e gestão de resíduos com baixo custo total).⁴¹

Inúmeros materiais residuais têm sido utilizados como substrato para as bactérias fermentativas na produção de H₂, tais como resíduos alimentícios industriais ou domésticos, resíduos da indústria de papel, resíduos lácteos, resíduos do processamento do óleo de palma, dentre outros.^{51,102-104}

Dois materiais residuais tipicamente brasileiros merecem destaque com relação ao grande potencial de produção de H₂. São eles os resíduos lignocelulósicos oriundos do processo de produção de etanol e a glicerina do processo de produção do biodiesel.

A biomassa lignocelulósica consiste em um material complexo e quimicamente rico, cuja estrutura é representada principalmente pela interação físico-química entre a celulose (polímero linear de glicose), a hemicelulose (heteropolímero altamente ramificado contendo prioritariamente pentoses) e a lignina (macromolécula aromática e de alta massa molecular).¹⁰⁵

No processo convencional de produção de açúcar e etanol a partir da cana-de-açúcar (Etanol de Primeira Geração – Etanol 1G) são gerados resíduos de biomassa lignocelulósica, tais como o bagaço e a palha da cana-de-açúcar. A utilização deste material lignocelulósico para produção de Etanol de Segunda Geração (Etanol 2G) tem sido intensamente estudada. O processo de produção do bioetanol a partir da biomassa lignocelulósica envolve as etapas de pré-tratamento do material lignocelulósico, hidrólise da celulose, fermentação de hexoses e destilação.¹⁰⁶

Considerando a associação dos processos de produção de Etanol 1G e 2G, a fração celulósica (com maior conteúdo de hexoses) seria a

opção mais imediata para a produção de bioetanol e outras utilizações para a fração hemicelulósica (pentoses) seriam necessárias. Neste contexto, abre-se espaço para a produção de hidrogênio biológico. A Figura 2 mostra uma representação esquemática dos possíveis materiais residuais dos processos de produção de etanol 1G e etanol 2G para a produção de hidrogênio por via biológica.

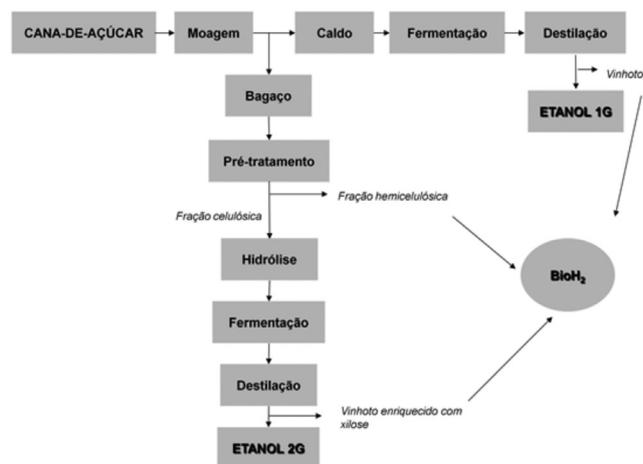


Figura 2. Possíveis materiais residuais dos processos de produção de etanol 1G e etanol 2G para a produção de hidrogênio biológico

A fração hemicelulósica obtida após o pré-tratamento do material lignocelulósico, também chamada de hidrolisado, é composta majoritariamente por xilose. Este carboidrato produzido durante as etapas de processamento do material lignocelulósico não é diretamente fermentável por *Saccharomyces cerevisiae*, levedura convencionalmente utilizada no processo fermentativo para produção de etanol.¹⁰⁷ Deste modo, a grande proporção de xilose obtida da fração hemicelulósica tem despertado grande interesse nas mais diversas áreas da bioconversão. Entre os processos de bioconversão, a produção de H₂ a partir de xilose tem se destacado como amplamente viável devido à possibilidade de degradação deste carboidrato por bactérias fermentativas produtoras de H₂.^{49,108,109} O vinhoto produzido durante o processo de Etanol 1G e o vinhoto enriquecido com xilose produzido durante o processo de Etanol 2G (quando não ocorrer a separação prévia das frações) também constituem potenciais substratos para as bactérias fermentativas na produção de hidrogênio biológico.^{110,111}

A glicerina tem atraído grande atenção nos últimos anos, devido ao fato de ser um subproduto gerado no processo de produção de biodiesel. A Figura 3 mostra uma representação esquemática do processo de produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais com álcoois (metanol ou etanol), utilizando catálise básica, com consequente obtenção da glicerina.¹¹²

A quantidade de glicerina gerada no processo de produção do biodiesel cresceu muito desde a instituição do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel em 2004, o qual prevê a adição gradual e crescente deste biocombustível ao diesel fóssil.¹¹⁴ Com o intuito de evitar futuros problemas derivados do acúmulo de glicerina e tornar a produção de biodiesel mais competitiva, torna-se necessária a busca de alternativas para o uso da glicerina gerada nesta produção.¹¹⁵ Atualmente, a glicerina pode ser utilizada em diferentes setores industriais, tais como na produção de cosméticos, fármacos, papéis, itens de higiene pessoal, alimentos, fumo, bebidas e outros.¹¹⁶ Uma alternativa, que tem se mostrado muito atraente do ponto de vista energético, é a utilização da glicerina como substrato para geração de hidrogênio biológico, visto que ela pode ser biodegradada por bactérias anaeróbias fermentativas.^{117,118}

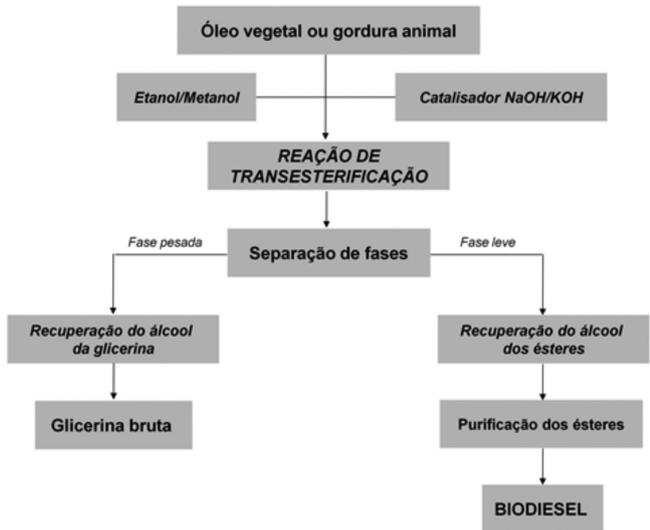


Figura 3. Produção de biodiesel e obtenção da glicerina a partir da transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais com álcoois (metanol ou etanol), utilizando catálise básica (Adaptado das referências 112 e 113)

A Figura 4 ilustra a rota metabólica dos micro-organismos do gênero *Clostridium* na conversão de hexoses, pentoses ou glicerina em H₂ e ácidos orgânicos durante o processo fermentativo anaeróbio.

Todos os substratos apresentados (sacarose, glicose, frutose, xilose e glicerina) são processados por meio da via glicolítica para produção de H₂. Em particular, o metabolismo da sacarose envolve uma etapa anterior à via glicolítica, que consiste na hidrólise da sacarose em glicose e frutose pela enzima invertase. A glicose é fosforilada pela molécula de ATP, originando glicose-6-fosfato, a qual é convertida em sua forma isomérica, frutose-6-fosfato. A frutose é diretamente fosforilada a frutose-6-fosfato. A segunda fosforilação leva à formação da frutose-1,6-bifosfato, que é convertida em gliceraldeído-3-fosfato pela ação da enzima aldolase. Xilose é metabolizada em xilulose, que é então fosforilada pela molécula de ATP produzindo xilulose-5-fosfato. Depois disso, moléculas de frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato são obtidas através da ação das enzimas transcetolase e transaldolase. Somente a glicerina é reduzida a dihidroxiacetona e fosforilada em dihidroxiacetona-fosfato antes de ser convertida a gliceraldeído-3-fosfato. Algumas reações de oxidação-redução ocorrem após a formação do gliceraldeído-3-fosfato. Além disso, a energia é convertida na forma de ATP e moléculas de piruvato são também formadas. O piruvato formado no processo é clivado pela piruvato-ferredoxina oxidoreductase na presença da coenzima A (CoA) para obtenção de acetil-CoA, ferredoxina reduzida (Fd_{red}) e dióxido de carbono. A acetil-CoA produzida consiste em um intermediário essencial na rota para produção de ácidos. A acetil-CoA pode ser fosforilada pelo sistema da fosfotranscetilase ou fosfotransbutilase para geração de ácido acético e butírico, respectivamente, e ATP. A formação dos ácidos acético e butírico não envolve nenhuma reação de

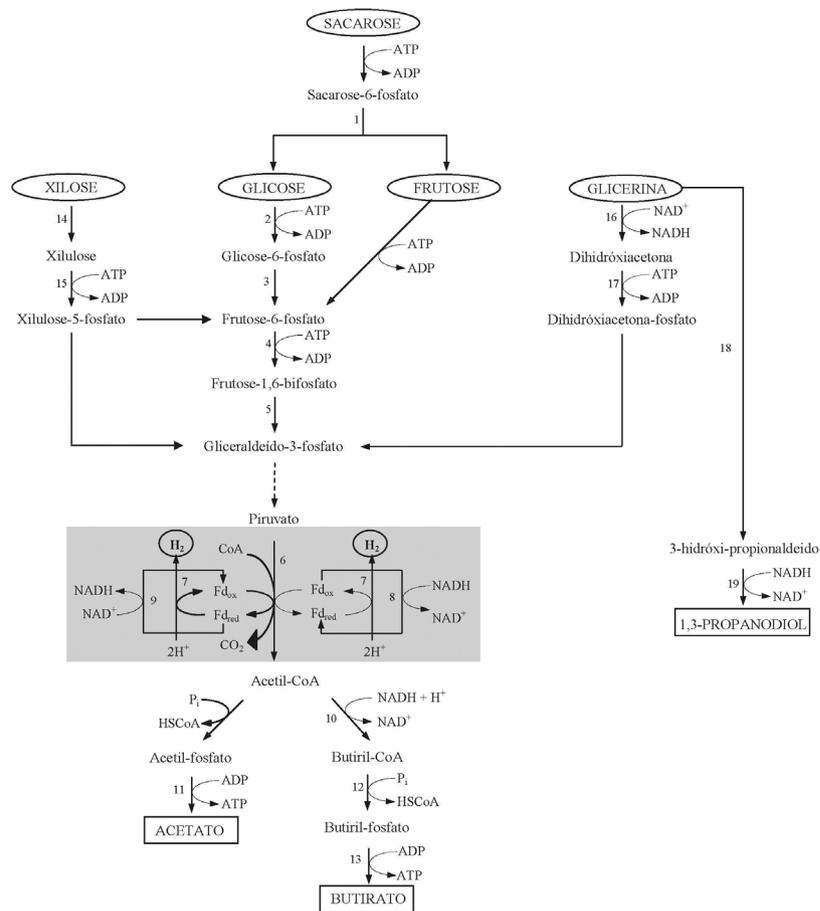


Figura 4. Rota metabólica de micro-organismos do gênero *Clostridium* sp durante fermentação anaeróbia de vários substratos (Adaptado da referência 65). 1- Sacarose 6-P hidrolase; 2- Hexoquinase; 3- Fosfoglicose isomerase; 4- Fosfofrutoquinase; 5- Aldolase; 6- Piruvato-ferredoxina oxidoreductase; 7- Hidrogenase; 8- NAD(P)H-ferredoxina reductase; 9- Ferredoxina-NAD(P)⁺ reductase; 10- Fosfotranscetilase quinase; 11- Acetato linase; 12- Fosfotransbutilase quinase; 13- Butirato quinase; 14- Xilose isomerase; 15- Xiluloquinase; 16- Glicerol desidrogenase; 17- DNA quinase; 18- Glicerol desidratase; 19- 1,3-propanodiol desidrogenase

redução e a ferredoxina reduzida (Fd_{red}) é capaz de transferir elétrons para as enzimas hidrogenases, as quais utilizam prótons H^+ comoceptor final de elétrons. Deste modo, a ferredoxina é reoxidada e a molécula H_2 é liberada. Quando a glicerina é utilizada como substrato, pode-se observar ainda a produção do 1,3-propanodiol por uma via oxidativa alternativa. Sob a ação da enzima glicerol-dehidratase, a glicerina é convertida a 3-hidróxi-propionaldeído e em seguida a 1,3-propanodiol.^{37,65,119-126}

Em estudos realizados pelo nosso grupo foram testados diferentes substratos para a produção de H_2 utilizando inóculo pré-tratado termicamente.⁶⁵ Os substratos sintéticos testados simulavam resíduos da produção de etanol de primeira geração (a partir da sacarose), da produção de etanol de segunda geração (a partir de materiais lignocelulósicos, os quais permitem a geração de açúcares C5 e C6) e finalmente a glicerina oriunda do processo de produção do biodiesel. Neste estudo, o meio fermentativo contendo sacarose como substrato apresentou o maior rendimento de H_2 (4,24 mol de H_2 /mol de sacarose). Os meios que utilizaram glicose, frutose e xilose apresentaram rendimentos de H_2 similares, 2,19, 2,09 e 1,88 mol de H_2 /mol de substrato, respectivamente. Os autores associaram este resultado à rota metabólica utilizada por micro-organismos do gênero *Clostridium*, a qual é capaz de realizar a conversão de hexoses e pentoses em H_2 e ácidos orgânicos (Figura 4). O menor rendimento de H_2 foi obtido quando se utilizou a glicerina como substrato (0,80 mol de H_2 /mol de glicerina). Este resultado foi relacionado ao fato de micro-organismos do gênero *Clostridium* serem capazes de degradar simultaneamente glicerina em 1,3-propanodiol e em outros subprodutos via piruvato (Figura 4). A produção biológica de 1,3-propanodiol tem recebido grande atenção devido ao promissor uso deste composto no setor químico.^{120,122} O 1,3-propanodiol é um valioso intermediário químico utilizado principalmente na manufatura de polímeros, cosméticos, lubrificantes, entre outros.¹²⁷ A Tabela 6 apresenta diferentes substratos

utilizados para produção de H_2 via fermentação anaeróbia a partir de culturas microbianas mistas.

PRODUÇÃO SEQUENCIAL DE H_2 E CH_4

Um aspecto bastante atrativo na produção biológica de H_2 via fermentação anaeróbia consiste na possibilidade de utilização de vários materiais residuais como substrato.^{51,102-104} No entanto, o elevado potencial poluidor destes resíduos não é completamente reduzido durante o processo de produção de H_2 .^{132,133} Estima-se que a redução da demanda química de oxigênio (DQO) neste estágio de produção de H_2 seja menor que 20%.¹³⁴ Neste caso, a maior parte da fração orgânica dos materiais residuais permanece solúvel ao final do processo fermentativo.¹³⁵ Deste modo, uma etapa subsequente à produção de H_2 se torna necessária para diminuição do teor de matéria orgânica e posterior descarte dentro dos padrões da legislação ambiental.

O processo em dois estágios para produção sequencial de H_2 e CH_4 tem sido considerado como uma alternativa para melhorar a viabilidade econômica do tratamento de resíduos.^{133,136} Segundo Peixoto e colaboradores (2012) o processo combinado de produção de H_2 e CH_4 permite uma maior redução da DQO de alguns resíduos quando comparado aos processos individuais.¹³⁷ Neste estudo, os autores observaram uma remoção de DQO de aproximadamente 74% para o vinhoto em um processo combinado e 43 e 51% para os processos individuais de produção de H_2 e CH_4 , respectivamente. Resultados similares, de maiores eficiências de remoção de DQO no processo combinado, foram também obtidos para outros resíduos, tais como glicerina, esgoto sanitário e águas residuárias de processamento de arroz.¹³⁷

O sistema de dois estágios contempla a separação dos processos acidogênicos e metanogênicos para produção de H_2 e CH_4 , respectivamente. No primeiro estágio (processo acidogênico) a matéria

Tabela 6. Diferentes substratos utilizados para produção de H_2 fermentativo a partir de culturas mistas (Adaptado da referência 65)

Fonte de lodo anaeróbio utilizado como inóculo	Substrato	Modo reator	Rendimento máximo de H_2 (mol de H_2 /mol de substrato)	Referências
Planta de tratamento de esgoto municipal	Sacarose	Batelada	4,24	65
Planta de tratamento de esgoto municipal	Sacarose	Contínuo	3,88	78
Reator anaeróbio de produção de citrato	Sacarose	Contínuo	1,61	84
Reator anaeróbio de produção de citrato	Sacarose	Batelada	3,73	76
Planta de tratamento de esgoto municipal	Glicose	Batelada	2,19	65
Planta de tratamento de esgoto municipal	Glicose	Contínuo	1,63	128
Reator UASB de tratamento de resíduos de fábrica de doces	Glicose	Batelada	1,46	104
Cultura anaeróbia mista enriquecida	Glicose	Contínuo	1,71	77
Lodo digerido de tratamento de esgoto	Glicose	Batelada	1,80	62
Planta de tratamento de esgoto municipal	Frutose	Batelada	2,09	65
Planta de tratamento de esgoto municipal	Frutose	Contínuo	1,68	78
Planta de tratamento de esgoto municipal	Xilose	Batelada	1,88	65
Planta de tratamento de esgoto municipal	Xilose	Batelada	2,00	56
Planta de tratamento de esgoto municipal	Xilose	Batelada	1,30	95
Reator UASB de tratamento de dejetos de suinocultura	Xilose	Batelada	0,8	129
Cultura anaeróbia mista enriquecida	Xilose	Batelada	0,71	130
Planta de tratamento de esgoto municipal	Glicerina	Batelada	0,80	65
Planta de tratamento de esgoto municipal	Glicerina	Batelada	0,41	117
Planta de tratamento de águas residuais	Glicerina	Batelada	0,96	118
Solo do cultivo de trigo	Glicerina	Batelada	0,28	131

Tabela 7. Análise teórica do potencial energético da produção de H₂ e CH₄ em dois estágios e da produção de CH₄ em um único estágio a partir de diferentes substratos

Substrato	Reações de produção de H ₂ e CH ₄	Potencial energético de H ₂ e CH ₄ (kJ/mol de substrato) ^a	Potencial energético total (kJ/mol de substrato)	Potencial energético total (kJ/g DQO)
Sacarose	$C_{12}H_{22}O_{11} + 5H_2O \rightarrow 4CH_3COO^- + 4H^+ + 4CO_2 + 8H_2$	2272	5830	15,2
	$4CH_3COO^- + 4H_2O \rightarrow 4CH_4 + 4HCO_3^-$	3558		
Glicose	$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \rightarrow 6CO_2 + 6CH_4$	5338	5338	13,9
	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + 2H^+ + 2CO_2 + 4H_2$	1136	2915	15,2
	$2CH_3COO^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_4 + 2HCO_3^-$	1779		
	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3CO_2 + 3CH_4$	2669	2669	13,9
Frutose	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + 2H^+ + 2CO_2 + 4H_2$	1136	2915	15,2
	$2CH_3COO^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_4 + 2HCO_3^-$	1779		
	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3CO_2 + 3CH_4$	2669	2669	13,9
Xilose	$C_5H_{10}O_5 + 3H_2O \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 3CO_2 + 6H_2$	1704	2594	16,2
	$CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$	890		
	$C_5H_{10}O_5 \rightarrow 2,5CO_2 + 2,5CH_4$	2224	2224	13,9
Glicerina	$C_3H_8O_3 + 2H_2O \rightarrow CH_3COO^- + 2H^+ + HCO_3^- + 3H_2$	852	1742	15,6
	$CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$	890		
	$C_3H_8O_3 \rightarrow 1,25CO_2 + 1,75CH_4 + 0,5H_2O$	1557	1557	13,9

^aValor calculado a partir do poder calorífico do H₂ de 142 kJ/g e do CH₄ de 55,6 kJ/g.¹³⁷

orgânica é degradada a ácidos orgânicos e H₂ e no segundo estágio (processo metanogênico) os ácidos orgânicos são metabolizados a CH₄ e CO₂.^{133,138}

Um dos objetivos de se utilizar um sistema de dois estágios para produção de H₂ e CH₄ consiste em otimizar cada um dos processos separadamente.¹³⁹⁻¹⁴¹ De uma maneira geral, os maiores rendimentos de H₂ são obtidos com um pH do meio fermentativo entre 5 e 6,5 e um tempo de retenção hidráulica entre 2 e 10 h, dependendo das características e concentrações dos substratos utilizados. Já a produção de CH₄ ocorre tipicamente em um pH entre 6,8 e 7,5 e um tempo de retenção hidráulica que pode variar de dias a semanas.¹³⁸ Devido aos diferentes tempos de retenção hidráulica observados para os processos acidogênicos e metanogênicos, reatores de diferentes dimensões podem ser empregados, levando assim a uma redução do custo do processo.¹⁴² Além disso, estudos têm demonstrado que a separação física dos consórcios acidogênico e metanogênico apresenta uma vantagem em termos de estabilização do processo quando comparada ao sistema de um único estágio para produção de CH₄, uma vez que o consórcio acidogênico apresenta uma maior capacidade de assimilação de choques de carga orgânica e variações de pH e temperatura.^{132,134,140}

Estudos na literatura mostram que o processo em dois estágios para produção de H₂ e CH₄ permite uma maior obtenção de energia quando comparado ao processo em um único estágio para produção de CH₄.^{139,140} Uma análise teórica do potencial energético da produção de H₂ e CH₄ em dois estágios e da produção de CH₄ em um único estágio a partir de diferentes substratos (sacarose, glicose, frutose, xilose e glicerina) é demonstrada na Tabela 7. Os valores teóricos do processo em dois estágios foram calculados a partir da reação de produção de acetato, visto que se trata do maior rendimento teórico em relação à produção de H₂.

Como pode ser observada, a produção sequenciada de H₂ e CH₄ apresenta um maior potencial energético quando comparado ao processo de produção de CH₄ em um único estágio para todos os substratos analisados. O processo em dois estágios utilizando sacarose, glicose ou frutose apresentou aproximadamente 9% de

energia a mais que o processo de produção de CH₄ em um único estágio. Valores em torno de 14 e 11% foram obtidos para a xilose e glicerina, respectivamente. Deste modo, estes resultados demonstram a viabilidade da produção integrada de H₂ e CH₄ via fermentação anaeróbia a partir de diferentes substratos.

CONCLUSÕES

O uso do hidrogênio como vetor energético tem tido grande destaque no contexto energético mundial, que inclui a diminuição das reservas de combustíveis fósseis, sua distribuição geográfica e os problemas ambientais relacionados ao uso contínuo destes combustíveis. Dentre os processos de produção de hidrogênio, a produção biológica a partir de biomassa via processo fermentativo anaeróbio se apresenta como uma opção bastante promissora, uma vez que permite a utilização de diferentes materiais residuais como substrato. A utilização destes materiais residuais e o seu processamento utilizando tecnologias pouco poluidoras é uma tendência mundial e garante a sustentabilidade de muitos processos. A produção sequenciada de H₂ e CH₄ tem sido apresentada como uma alternativa bastante viável para melhoria do tratamento dos resíduos e geração de energia. A oportunidade de geração sustentável de hidrogênio associada à vocação brasileira no setor agroindustrial e a sua liderança na produção de biocombustíveis permitem ao país dar significativas contribuições acerca da produção biológica de H₂ a partir de resíduos agroindustriais.

AGRADECIMENTOS

CNPq, FINEP e SETEC/MCTI pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- Hallenbeck, P.C.; Ghosh, D.; *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 287.
- Das, D.; Veziroglu, T.N.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2008**, *33*, 6046.
- Kotay, M.K.; Das, D.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2008**, *33*, 258.

4. Page, S.; Krumdieck, S.; *Energy Policy* **2009**, *37*, 3325.
5. Rosa, M.F.; Souza Filho, M.S.M.; Figueiredo, M.C.B.; Moraes, J.P.S.; Santaella, S.T.; Leitão, R.C.; Resumos do II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais – II SIGERA, Foz do Iguaçu, Brasil, 2011.
6. Mathews, J.; Wang, G.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2009**, *34*, 7404.
7. Balat, H.; Kirtay, E.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2010**, *35*, 7416.
8. Das, D.; Veziroglu, T.N.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2001**, *26*, 13.
9. Souza, M.M.V.M.; Tecnologia do hidrogênio. Rio de Janeiro: Synergia Editora, 2009.
10. Neves, L.M.V.; *Dissertação de mestrado*, Universidade Nova de Lisboa, Portugal, 2009.
11. Kirtay, E.; *Energy Convers. Manage.* **2011**, *52*, 1778.
12. Argun, H.; Kargi, F.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2010**, *35*, 1604.
13. Kim, J.P.; Kim, K.R.; Choi, S.P.; Han, S.J.; Kim, M.S.; Sim, S.J.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2010**, *35*, 13387.
14. Ran, C.Q.; Zhang, F.J.; Sun, H.J.; Zhao, B.D.; *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2009**, *14*, 835.
15. Huesemann, M.H.; Hausmann, T.S.; Carter, B.M.; Gerschler, J.J.; Benemann, J.R.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2010**, *162*, 208.
16. Khetkorn, W.; Lindblad, P.; Incharoensakdi, A.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2010**, *35*, 12767.
17. Berberoglu, H.; Jay, J.; Pilon, L.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2008**, *33*, 1172.
18. Navarro, E.; Montagud, A.; de Cordoba, P.F.; Urchueguia, J.F.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2009**, *34*, 8828.
19. Min, H.T.; Sherman, L.A.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 4293.
20. Yoshino, F.; Ikeda, H.; Masukawa, H.; Sakurai, H.; *Mar. Biotechnol.* **2007**, *9*, 101.
21. Suwansaard, M.; Choerit, W.; Zeilstra-Ryalls, J.H.; Prasertan, P.; *Biotechnol. Lett.* **2010**, *32*, 1667.
22. Kawagoshi, Y.; Oki, Y.; Nakano, I.; Fujimoto, A.; Takahashi, H.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2010**, *35*, 13365.
23. Zhu, Z.N.; Shi, J.P.; Zhou, Z.H.; Hu, F.X.; Bao, J.; *Process Biochem.* **2010**, *45*, 1894.
24. Obeid, J.; Flaus, J.M.; Adrot, O.; Magnin, J.P.; Willison, J.C.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2010**, *35*, 10719.
25. Kamalaskar, L.B.; Dhakephalkar, P.K.; Meher, K.K.; Ranade, D.R.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2010**, *35*, 10639.
26. Tai, J.; Adav, S.S.; Su, A.; Lee, D.J.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2010**, *35*, 13345.
27. Skonieczny, M.T.; Yargeu, V.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2009**, *34*, 3288.
28. Beckers, L.; Hiligsmann, S.; Hamilton, C.; Masset, J.; Thonart, P.; *Biotechnology Agronomie Societe et Environmental* **2010**, *14*, 541.
29. Mandal, B.; Nath, K.; Das, D.; *Biotechnol. Lett.* **2006**, *28*, 831.
30. Jayasinghearachchi, H.S.; Sarma, P.M.; Singh, S.; Agnihotri, A.; Mandal, A.K.; Lal, B.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2009**, *34*, 7197.
31. Ghosh, D.; Hallenbeck, P.C.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2009**, *34*, 7979.
32. Niu, K.; Zhang, X.; Tan, W.S.; Zhu, M.L.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2010**, *35*, 71.
33. Hallenbeck, P.C.; Benemann, J.R.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2002**, *27*, 1185.
34. Levin, D.B.; Pitt, L.; Love, M.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2004**, *29*, 173.
35. Chong, M-L.; Sabaratnam, V.; Shirai, Y.; Hassan, A.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2009**, *34*, 3277.
36. Campos, J.R. Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo. PROSAB/ABES, Rio de Janeiro, 1999.
37. Valdez-Vazquez, I.; Poggi-Varaldo, H.M.; *Renewable Sustainable Energy Rev.* **2009**, *13*, 1000.
38. Sterling, M.C.; Lacey, R.E.; Engler, C.R.; Ricke, S.C.; *Bioresour. Technol.* **2001**, *77*, 9.
39. Speece, R.E.; Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters. Archaea Press: Tennessee, 1996.
40. Chernicaró, C.A.L.; Princípios do tratamento biológico de águas residuárias – Reatores anaeróbios. UFMG: Belo Horizonte, 2007.
41. Ntaikou, I.; Antonopoulou, G.; Lyberatos, G.; *Waste Biomass Valorization* **2010**, *1*, 21.
42. Wang, J.; Wan, W.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2009**, *34*, 799.
43. Kramer, J.T.; Bagley, D.M.; *Biotechnol. Lett.* **2007**, *29*, 685.
44. Antonopoulou, G.; Stamatelatou, K.; Venetsaneas, N.; Kornaros, M.; Lyberatos, G.; *Ind. Eng. Chem. Res.* **2008**, *47*, 5227.
45. Logan, B.E.; Oh, S.E.; Kim, I.S.; Van Ginkel, S.; *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 2530.
46. Chen, C-C.; Lin, C-Y.; Lin, M-C.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *58*, 224.
47. Lay, J-J.; Fan, K-S.; Chang, I.J.; Ku, C-H.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2003**, *28*, 1361.
48. Morimoto, M.; Atsuko, M.; Atif, A.A.Y.; Ngan, M.A.; Fakhrulrazi, A.; Iyuke, S.E.; Bakir, A.M.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2004**, *29*, 709.
49. Fang, H.H.P.; Environmental Anaerobic Technology: applications and new developments, Imperial College Press: London, **2010**.
50. De Sá, L.R.V.; Oliveira, T.C.; Santos, T.F.; Matos, A.; Cammarota, M.C.; Oliveira, E.M.M.; Ferreira-Leitão, V.S.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2011**, *36*, 7543.
51. Vijayaraghavan, K.; Ahmad, D.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2006**, *31*, 1284.
52. Guo, X.M.; Trably, E.; Latrille, E.; Carrère, H.; Steyer, J-P.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2010**, *35*, 10660.
53. Oh, S-E.; Ginkel, S.V.; Logan, B.E.; *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 5186.
54. Park, W.; Hyun, S.H.; Oh, S-E.; Logan, B.E.; Kim, I.S.; *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 4416.
55. Wejima, J.; Gubbels, F.; Hulshoff, P.L.W.; Stams, A.J.M.; Lens, P.; Lettinga, G.; *Water Sci. Technol.* **2002**, *45*, 75.
56. Lin, C.Y.; Cheng, C.H.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2006**, *31*, 832.
57. Chaganti, S.R.; Kim, D-H.; Lalman, J.A.; *Renewable Energy* **2012**, *48*, 117.
58. Chang, S.; Li, J-Z.; Liu, F.; *Renewable Energy* **2011**, *36*, 1517.
59. Ren, N-Q.; Guo, W-Q.; Wang, X-J.; Xiang, W-S.; Liu, B-F.; Wang, X-Z.; Ding, J.; Chen, Z-B.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2008**, *33*, 4318.
60. Pendyala, B.; Chaganti, S.R.; Lalman, J.A.; Shanmugam, S.R.; Heath, D.D.; Lau P.C.K.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2012**, *37*, 12175.
61. Luo, G.; Karashev, D.; Xie, L.; Zhou, Q.; Angelidaki, I.; *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108*, 1816.
62. Wang, J.L.; Wan, W.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2008**, *33*, 2934.
63. Mu, Y.; Yu, H-Q.; Wang, G.; *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 947.
64. O-Thong, S.; Prasertan, P.; Birkeland, N-K.; *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 909.
65. De Sá, L.R.V.; Cammarota, M.C.; Oliveira, T.C.; Oliveira, E.M.M.; Matos, A.; Ferreira-Leitão, V.S.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2013**, *38*, 2986.
66. Zhu, H.G.; Béland, M.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2006**, *31*, 1980.
67. Mendes, A.A.; De Castro, H.F.; Pereira, E.B.; Júnior, A.F.; *Quim. Nova* **2005**, *28*, 296.
68. Das, D.; Dutta, T.; Nath, K.; Kotay, S.M.; Das, A.K.; Veziroglu, T.N.; *Curr. Sci.* **2006**, *90*, 1627.
69. Vignais, P.M.; Colbeau, A.; *Curr. Issues Mol. Biol.* **2004**, *6*, 159.
70. Chang, J-J.; Wu, J-H.; Wen, F-S.; Hung, K-Y.; Chen, Y-T.; Hsiao, C-L.; Lin, C-Y.; Huang, C-C.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2008**, *33*, 1579.
71. Wang, M-Y.; Tsai, Y-L.; Olson, B.H.; Chang, J-S.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2008**, *33*, 4730.
72. De Sá, L.R.V.; *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2011.
73. Li, C.; Fang, H.H.P.; Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **2007**, *37*, 1.

74. Mu, Y.; Zheng, X.J.; Yu, H.Q.; Zhu, R.F.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2006**, *31*, 780.
75. Lin, C.Y.; Wu, C.C.; Hung, C.H.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2008**, *33*, 43.
76. Wang, G.; Mu, Y.; Yu, H.Q.; *Biochem. Eng. J.* **2005**, *23*, 175.
77. Karadag, D.; Puhakka, J.A.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2010**, *35*, 10954.
78. Lee, K.S.; Lin, P.J.; Chang, J.S.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2006**, *31*, 465.
79. Chin, H-L.; Chen, Z-S.; Chou, P.; *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 383.
80. Xing, D.F.; Ren, N.Q.; Wang, A.J.; Li, Q.B.; Feng, Y.J.; Ma, F.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2008**, *33*, 1489.
81. Lin, C.Y.; Chang, C.C.; Hung, C.H.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2008**, *33*, 2445.
82. Lin, C.Y.; Hung, C.H.; Chen, C.H.; Chung, W.T.; Cheng, L.H.; *Process Biochem.* **2006**, *41*, 1383.
83. Chen, W.M.; Tseng, Z.J.; Lee, K.S.; Chang, J.S.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2005**, *30*, 1063.
84. Mu, Y.; Yu, H.Q.; Wang, Y.; *Chemosphere* **2006**, *64*, 350.
85. Fang, H.H.P.; Liu, H.; *Bioresour. Technol.* **2002**, *82*, 87.
86. Khanal, S.K.; Chen, W-H.; Li, L.; Sung, S.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2004**, *29*, 1123.
87. Ginkel, S.V.; Sung, S.; *Environ. Sci. Technol.* **2001**, *35*, 4726.
88. Ye, N.F.; Lu, F.; Shao, L.M.; Godon, J-J.; He, P.J.; *J. Appl. Microbiol.* **2007**, *103*, 1055.
89. Temudo, M.F.; Kleerebezem, R.; Loosdrecht, M.V.; *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *98*, 69.
90. Temudo, M.; Muyzer, G.; Kleerebezem, R.; Van Loosdrecht, M.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *80*, 1121.
91. Arooj, M.F.; Han, S.K.; Kim, S.H.; Shin, H.S.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2008**, *33*, 3289.
92. Zhang, Z-P.; Tay, J-H.; Show, K-Y.; Yan, R.; Liang, D.T.; Lee, D-J.; Jiang, W-J.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2007**, *32*, 185.
93. Chang, F.Y.; Lin, C.Y.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2004**, *29*, 33.
94. Leite, J.A.C.; Fernandes, B.S.; Pozzi, E.; Barboza, M.; Zaiat, M.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2008**, *33*, 579.
95. Li, C.; Zhang, T.; Fang, H.H.P.; *Water Sci. Technol.* **2006**, *54*, 95.
96. Peixoto, G.; *Dissertação de mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2008.
97. Cheong, D-Y.; Hansen, C.L.; Stevens, D.K.; *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *96*, 421.
98. Lin, C.Y.; Lay, C.H.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2004**, *29*, 275.
99. Hallenbeck, P.C.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2009**, *34*, 7379.
100. Ngo, T.A.; Kim, M-S.; Sim, S.J.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2011**, *36*, 5836.
101. Hawkes, F.R.; Dinsdale, R.; Hawkes, D.L.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2002**, *27*, 1339.
102. Shin, H-S.; Youn, J-H.; Kim, S-H.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2004**, *29*, 1355.
103. Valdez-Vazquez, I.; Sparling, R.; Risbey, D.; Rinderknecht-Seijas, N.; Poggi-Varaldo, H.M.; *Bioresour. Technol.* **2005**, *96*, 1907.
104. Davila-Vazquez, G.; Alariste-Mondragin, F.; de Leon-Rodriguez, A.; Razo-Flores, E.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2008**, *33*, 4989.
105. Ferreira-Leitão, V.; Gottschalk, L.M.F.; Ferrara, M.A.; Nepomuceno, A.L.; Molinari, H.B.C.; Bon, E.P.S.; *Waste Biomass Valor* **2010**, *1*, 65.
106. Soccol, C.R.; Vandenberghe, L.P.S.; Medeiros, A.B.P.; Karp, S.G.; Buckeridge, M.; Ramos, L.P.; Pitarelo, A.; Ferreira-Leitão, V.; Gottschalk, L.M.F.; Ferrara, M.A.; Bon, E.P.S.; Moraes, L.M.P.; Araújo, J.A.; Torres, F.A.G.; *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 4820.
107. Kparaju, P.; Serrano, M.; Thomsen, A.B.; Kongjan, P.; Angelidaki, I.; *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 2562.
108. Chaganti, S.R.; Pendyala, B.; Lalman, J.A.; Veeravalli, S.S.; Health, D.D.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2013**, *38*, 2012.
109. Khamtib, S.; Reungsang, A.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2012**, *37*, 12219.
110. Fernandes, B.S.; Peixoto, G.; Albrecht, F.R.; Del Aguila, N.K.S.; Zaiat, M.; *Energy Sustainable Dev.* **2010**, *14*, 143.
111. Peixoto, G.; Pantoja, J.L.R.; Agnelli, J.A.B.; Barboza, M.; Zaiat, M.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *168*, 651.
112. Rivaldi, J.D.; Sarroub, B.F.; Fiorilo, R.; Silva, S.S.; *Biocologia Ciência & Desenvolvimento* **2009**, *37*, 44.
113. <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/>, acessada em Março 2014.
114. <http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/>, acessada em Março 2014.
115. Moura, C.V.R.; Nunes, A.S.L.; Neto, J.M.M.; Neves, H.L.S.; Carvalho, L.M.G.; Moura, E.M.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 1226.
116. Mota, C.J.A.; Da Silva, C.X.A.; Gonçalves, V.L.C.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 639.
117. Seifert, K.; Waligorska, M.; Wojtowski, M.; Laniecki, M.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2009**, *34*, 3671.
118. Varrone, C.; Giussani, B.; Izzo, G.; Massini, G.; Marone, A.; Signorini, A.; Wang, A.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2012**, *37*, 16479.
119. Ren, N.; Li, J.; Li, B.; Wang, Y.; Liu, S.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2006**, *31*, 2147.
120. Akutsu, Y.; Lee, D-Y.; Li, Y-Y.; Noike, T.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2009**, *34*, 5365.
121. Zhao, C.; Karakashev, D.; Lu, W.; Wang, H.; Angelidaki, I.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2010**, *35*, 3415.
122. Temudo, M.F.; Mato, T.; Kleerebezem, R.; Van Loosdrecht, M.C.M.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *82*, 231.
123. Tanaka, K.; Komiyama, A.; Sonomoto, K.; Ishizaki, A.; Hall, S.J.; Stanbury, P.F.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *60*, 160.
124. Saint-Amans, S.; Girbal, L.; Andrade, J.; Ahrens, K.; Soucaille, P.; *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 1748.
125. Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J.; *Brock Biology of Microorganisms*, 9th ed., Prentice Hall: New Jersey, 2000;
126. Jones, D.T.; Woods, D.R.; *Microbiol. Rev.* **1986**, *50*, 484.
127. Drozdzyńska, A.; Leja, K.; Czaczyk, K.; *Comput. Biol. Chem.* **2011**, *92*, 92.
128. Wu, S.Y.; Hung, C.H.; Lin, C.Y.; Lin, P.J.; Lee, K.S.; Kin, C.N.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2008**, *33*, 1542.
129. Maintinguer, S.I.; *Tese de doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2009.
130. Makinen, A.E.; Nissila, M.E.; Puhakka, J.A.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2012**, *37*, 12234.
131. Selembo, P.A.; Perez, J.M.; Lloyd, W.A.; Logan, B.E.; *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *104*, 1098.
132. Peixoto, G.; *Tese de doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2011.
133. Wang, X.; Zhao, Y-C.; *Int. J. Hydrogen Energy* **2009**, *34*, 245.
134. Antonopoulou, G.; Stamatelatu, K.; Venetsaneas, N.; Kornaros, M.; Lyberatos, G.; *Ind. Eng. Chem. Res.* **2008**, *47*, 5227.
135. Venetsaneas, N.; Antonopoulou, G.; Stamatelatu, K.; Kornaros, M.; Lyberatos, G.; *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 3713.
136. Kim, D-H.; Kim, M-S.; *Bioresour. Technol.* **2013**, *127*, 267.
137. Peixoto, G.; Pantoja-Filho, J.L.R.; Agnelli, J.A.B.; Barboza, M.; Zaiat, M.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *168*, 651.
138. Zhu, H.; Stadnyk, A.; Béland, M.; Seto, P.; *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 5078.
139. Liu, D.; Liu, D.; Zeng, R.J.; Angelidaki, I.; *Water Res.* **2006**, *40*, 2230.
140. Luo, G.; Xie, L.; Zhou, Q.; Angelidaki, I.; *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 8700.
141. Xie, B.; Cheng, J.; Zhao, J.; Song, W.; Liu, J.; Cen, K.; *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 5942.
142. Ueno, Y.; Kukui, H.; Goto, M.; *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 1413.