



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JULIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas



Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

LETÍCIA CAROLINE MANZI FERNANDES

COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO SEQUENCIAL DE BIOHIDROGÊNIO E
BIOMETANO A PARTIR DE SORO DE QUEIJO RECONSTITUÍDO E
HIDROLISADO

Araraquara, SP

2022

LETÍCIA CAROLINE MANZI FERNANDES

COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO SEQUENCIAL DE BIOHIDROGÊNIO E
BIOMETANO A PARTIR DE SORO DE QUEIJO RECONSTITUÍDO E
HIDROLISADO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Graduação em
Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia
da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Araraquara, da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para
obtenção do grau de Engenheira de
Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Peixoto

Coorientador: Prof. Dr. Fernando L. Primo

Araraquara, SP

2022

-
- F363c** Fernandes, Letícia Caroline Manzi.
Comparação da produção sequencial de biohidrogênio e biometano a partir de soro de queijo reconstituído e hidrolisado / Letícia Caroline Manzi Fernandes. – Araraquara: [S.n.], 2022.
73 f. : il.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação - Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Área de Bioprocessos e Biotecnologia.
- Orientador: Guilherme Peixoto.
Coorientador: Fernando Lucas Primo.
1. Biocombustíveis. 2. Biogás. 3. Resíduos. 4. Soro de queijo. I. Peixoto, Guilherme, orient. II. Primo, Fernando Lucas, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais, Cássia e Sérgio, por todo o apoio, educação e suporte necessário para eu pudesse trilhar meus caminhos.

Ao meu companheiro, Helivelto, por acreditar no meu potencial em todos os momentos.

Aos meus amigos e colegas de turma, sem os quais não teria chegado até aqui. Agradeço pelos bons momentos que me permitiram ter uma jornada agradável.

Ao Profº Dr. Guilherme Peixoto por toda orientação e apoio científico para que este trabalho fosse realizado.

Ao Profº Dr. Fernando Primo pelo suporte e apoio disponibilizado nessa jornada.

Aos técnicos de laboratório e todos os demais funcionários envolvidos por toda disposição e auxílio prático fornecidos durante o desenvolvimento desse trabalho.

E por fim agradeço a UNESP e a todo o corpo docente pela estrutura fornecida e suporte acadêmico e científico durante o período de graduação, tornando esse sonho possível.

RESUMO

O aumento do consumo energético no mundo e a natureza finita dos combustíveis fósseis, levaram ao desencadeamento de pesquisas focadas na utilização de recursos renováveis para a geração de energia limpa. O emprego de resíduos agroindustriais tornou-se uma abordagem promissora e atrativa para a produção de biogás. Dentre estes resíduos, o soro de queijo possui diversos benefícios para a geração de metano (CH_4) e hidrogênio (H_2), especialmente por apresentar elevado conteúdo orgânico. Tanto o metano, quanto o hidrogênio são biocombustíveis seguros, que apresentam elevada eficiência na geração de energia. Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de BioH_2 e CH_4 por meio do emprego do soro de queijo reconstituído bruto e hidrolisado. Ambos os substratos foram caracterizados por meio da determinação de lactose, proteínas totais e Demanda Química de Oxigênio (DQO). A avaliação de ácidos graxos (AGV's) foi desconsiderada devido à falta dos padrões necessários para análise. Na produção de biogás, empregou-se biorreatores com capacidade máxima de 38mL, selados e incubados a 37°C e 150rpm. O monitoramento da produção de biogás ocorreu através da técnica de cromatografia gasosa em GC-2010. Entre os resultados obtidos, as concentrações de lactose presente no soro reconstituído e hidrolisado foram de $0,089 \mu\text{mol/mL}$ e $0,064 \mu\text{mol/mL}$, respectivamente, enquanto os teores de proteínas totais foram de $3,42 \text{ mg/mL}$ e $1,03 \text{ mg/mL}$ para ambos os substratos. As médias das DQOs foram de $0,351 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,236 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. Na produção de biogás usando soro de queijo reconstituído como substrato, constatou-se rendimentos máximos de $74,29 \text{ mL.g}^{-1}$ para o H_2 e de $303,12 \text{ mL.g}^{-1}$ para o CH_4 , enquanto os rendimentos máximos empregando o soro hidrolisado foram de $58,90 \text{ mL.g}^{-1}$ para o BioH_2 e de $231,81 \text{ mL.g}^{-1}$ para o gás metano. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que o soro de queijo é um resíduo com grande potencial na geração de biogás e que a etapa de pré-tratamento de hidrólise do soro, não maximizou os rendimentos de biogás, podendo assim, ser desconsiderada. No entanto, ressalta-se que muitos parâmetros, como substrato, pH e reatores, devem ser explorados e otimizados para o alcance de melhorias na produtividade do biogás.

Palavras-chave: biocombustíveis; biogás; resíduos; soro de queijo.

ABSTRACT

The worldwide increase of energy consumption and the finite nature of fossil fuels have led to the emergence research aimed at the use of renewable resources in clean energy generation. The use of agro-industrial wastes emerge as a promising approach to biogas production. Among these wastes, cheese whey exhibits many properties for the production of biogas (methane and hydrogen), especially it has high organic matter. They both are considered to be safe biofuels and highly efficient to energy generation. Thus, this study aimed to evaluate the production potential of H_2 and CH_4 , using pure reconstituted and hydrolyzed cheese whey. Both substrates were characterized by lactose's determination, total proteins and Biochemical Oxygen Demand (BOD). The evaluation of fatty acids was not considered due to the lack of standards for analysis. In biogas production, was used a glass bioreactor with maximum capacity of 38 mL, sealed with rubber septum and kept with agitation of 150 rpm at 37°C. The monitoring was performed by gas chromatography in GC-2010. The results showed lactose concentrations of 0.089 $\mu\text{mol/mL}$ and 0.064 $\mu\text{mol/mL}$ for reconstituted and hydrolyzed cheese whey, respectively, while total proteins were of 3.42 mg/mL and 1.03 mg/mL for both substrates. The averages of DQOs were of 0.351 g. L^{-1} and 0.236 g. L^{-1} , respectively. In biogas production using reconstituted cheese whey, the maximum yields were of 74.29 mL. g^{-1} for $BioH_2$ and 303.12 mL. g^{-1} for CH_4 , while the maximum yields with use of hydrolyzed cheese whey were 58.90 mL. g^{-1} for $BioH_2$ and 231.81 mL. g^{-1} for methane gas. Based on results obtained, cheese whey is a waste with great potential for biogas generation and that the enzymatic pre-treatment step of cheese whey not revealed improvements of biogas yield obtained. It can be eliminated during the optimization of the bioprocess. However, many parameters, as substrate, pH and reactors, should be explored and optimized to achieve improvements in biogas productivity.

Keywords: biofuels; biogas; agro-industrial wastes; cheese whey.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais fontes energéticas utilizadas pelo Brasil ao longo dos anos de 2000-2019.	16
Figura 2. Fluxograma das quatro etapas da fermentação anaeróbica na metabolização da matéria orgânica para a geração de biogás.	20
Figura 3. Diferentes rotas metabólicas que levam a produção de BioH ₂ através da fermentação escura. As hidrogenases podem atuar por meio de diferentes processos fermentativos, incluindo a glicólise e a degradação do piruvato. Alguns mecanismos ainda são especulativos.	23
Figura 4. Comportamento das células (microrganismos), substrato e produtos ao longo do tempo de um processo empregando um biorreator operado em processo descontínuo.	26
Figura 5. Foto dos biorreatores preparados para o início da produção de CH ₄	38
Figura 6. Curva analítica padrão da lactose em $\mu\text{mol/mL}$	39
Figura 7. Curva analítica padrão de BSA em mg/mL	40
Figura 8. Concentração da DQO (g/L) nos biorreatores contendo soro de queijo hidrolisado e reconstituído, respectivamente. Os dados foram computados através das médias das triplicatas de cada amostra nos diferentes reatores. .	41
Figura 9. SDS-PAGE 12% do soro de queijo bovino: (A) padrão de massa molecular ($5\mu\text{L}$); (B) soro de queijo bovino 1% reconstituído não hidrolisado ($15\mu\text{L}$); (C) soro de queijo bovino 1% reconstituído não hidrolisado ($25\mu\text{L}$); (D) soro de queijo bovino 1% reconstituído hidrolisado com os derivados SM-glioxil-tripsina+ SM-glioxil-alcalse ($25\mu\text{L}$); (F) soro de queijo bovino fluído não hidrolisado ($15\mu\text{L}$); (G) soro de queijo bovino fluído não hidrolisado ($25\mu\text{L}$). .	43
Figura 10. Curva analítica de hidrogênio (em μmol). Foram utilizados volumes baixos do biogás para confeccionar a curva de baixa concentração (em vermelho) e mais elevados para obter a curva de alta concentração (em azul).	44
Figura 11. Curva analítica de CH ₄ (em μmol). Foram utilizados volumes baixos do biogás para confeccionar a curva de baixa concentração (em vermelho) e mais elevados para obter a curva de alta concentração (em azul).	45

Figura 12. Desempenho da produção de BioH ₂ (em µmol) ao longo do tempo (horas), utilizando o soro de queijo hidrolisado como substrato.....	49
Figura 13. Desempenho da produção de BioH ₂ (em µmol) ao longo do tempo (horas), utilizando o soro de queijo reconstituído como substrato.....	51
Figura 14. Comparativa temporal da produção de hidrogênio. em µmol/h, utilizando os diferentes substratos, soro hidrolisado (“HD” em azul) e soro reconstituído (“NH” em vermelho).	53
Figura 15. Desempenho da produção de CH ₄ (em µmol) durante o tempo de monitoramento (em horas), utilizando metabólitos oriundos do soro de queijo hidrolisado como substratos, reatores 1, 2 e 3.....	59
Figura 16. Desempenho da produção de CH ₄ em µmol durante o tempo de monitoramento (em horas), utilizando metabólitos oriundos do soro de queijo reconstituído como substratos, reatores 4, 5 e 6.....	62
Figura 17. Perfil temporal da produção de CH ₄ . em µmol/h, nos reatores operando com metabólitos oriundos do soro hidrolisado (em azul) daqueles que operaram utilizando metabólitos oriundos do soro reconstituído (em vermelho).	63
Figura 18. Avaliação do rendimento máximo de BioH ₂ e CH ₄ (em mL.g ⁻¹ DQO). Os valores foram obtidos através das medidas de produção por grama de DQO de todos os biorreatores empregados na produção do biogás com seus respectivos substratos. Os indicadores em azul ilustram a produção de hidrogênio/DQO e os em vermelho a produção de metano/DQO.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferentes concentrações de lactose dispersa em água e DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), para a construção da curva padrão analítica.	29
Tabela 2. Determinação da concentração de lactose no soro de queijo hidrolisado e não hidrolisado. Diferentes diluições do soro hidrolisado/não hidrolisado foram preparadas.....	29
Tabela 3. Preparo de diferentes concentrações de BSA, empregando água e solução A como solventes para a construção da curva analítica.	31
Tabela 4. Diferentes concentrações da solução padrão de KHP para o preparo da curva analítica de DQO.	32
Tabela 5. Volumes empregados de cada componente dentro dos reatores para a produção do biogás.....	34
Tabela 6. Diferentes volumes de H ₂ injetados em cromatógrafo GC-2010 para a construção das curvas analíticas padrões.....	35
Tabela 7. Diferentes volumes de CH ₄ injetados em cromatógrafo GC-2010 para a construção das curvas analíticas padrões.....	35
Tabela 8. Substratos empregados em reatores destinados a produção de hidrogênio.....	37
Tabela 9. Substratos empregados em reatores destinados a produção de CH ₄	38
Tabela 10. Médias e desvios padrão da quantificação da DQO obtidas de cada biorreator empregando o soro de queijo hidrolisado e reconstituído.....	42
Tabela 11. Dados obtidos do equipamento em cromatógrafo GC-2010 (Shimadzu) durante a injeção de diferentes concentrações de H ₂	44
Tabela 12. Dados obtidos do equipamento em cromatógrafo GC-2010 (Shimadzu) durante a injeção de diferentes concentrações de CH ₄	46
Tabela 13. Produção de BioH ₂ empregando soro de queijo hidrolisado. Os dados foram obtidos utilizando o cromatógrafo GC-2010. O tempo (T) foi medido em horas a partir da injeção do primeiro ponto (ponto 0) representado pela amostra 1-HD. A pressão (P) foi representada em milibar e a área (A) foi aquela obtida a partir da análise dos cromatogramas.....	47
Tabela 14. Produção de BioH ₂ empregando soro de queijo não hidrolisado. Os dados foram obtidos utilizando o cromatógrafo GC-2010. O tempo (T) foi	

medido em horas a partir da injeção do primeiro ponto (ponto 0) representado pela amostra 1-HD. A pressão (P) foi representada em milibar e a área (A) foi aquela obtida a partir da análise dos cromatogramas.....	48
Tabela 15. Discretização do tempo em horas e produção de BioH ₂ em μmol para 18000 μL de <i>headspace</i> dos reatores, utilizando soro de queijo hidrolisado como substrato.....	50
Tabela 16. Discretização do tempo em horas e produção de BioH ₂ em μmol para 18000 μL de <i>headspace</i> dos reatores, utilizando soro de queijo reconstituído como substrato.	52
Tabela 17. Valores obtidos da produção de BioH ₂ empregando os dois substratos propostos. Para obter tais valores, foi calculada a média dos dados obtidos dos reatores 1 e 3 (substrato soro hidrolisado) e 5 e 6 (substrato do soro reconstituído). Foram desconsiderados os dados das amostras 2 e 4. ...	55
Tabela 18. Produção de CH ₄ empregando metabólitos do soro de queijo hidrolisado. Os dados foram obtidos utilizando o cromatógrafo GC-2010. O tempo (T) foi medido em horas a partir da injeção do primeiro ponto (ponto 0). A pressão (P) foi representada em milibar e a área (A) foi aquela obtida a partir da análise dos cromatogramas.	57
Tabela 19. Discretização do tempo (em horas) e produção de CH ₄ (em μmol) para os reatores onde foi utilizado metabólitos do soro de queijo hidrolisado como substratos.	58
Tabela 20. Produção de CH ₄ empregando metabólitos do soro de queijo não hidrolisado. Os dados foram obtidos utilizando o cromatógrafo GC-2010. O tempo (T) foi medido em horas a partir da injeção do primeiro ponto (ponto 0). A pressão (P) foi representada em milibar e a área (A) foi aquela obtida a partir da análise dos cromatogramas.	60
Tabela 21. Discretização do tempo e produção de CH ₄ (em μmols) para os reatores onde foi utilizado metabólitos do soro de queijo reconstituído como substrato.....	61
Tabela 22. Média da produção de CH ₄ empregando as médias finais das amostras oriundas dos reatores que continham metabólitos derivados do soro hidrolisado e dos reatores que continham metabólitos derivados do soro não hidrolisado.	64

LISTA DE ABREVIATURAS

ABIQ - Associação Brasileira das Indústrias de Queijo;
Abs – Absorância;
APHA – *American Public Health Association*;
BioH₂ – Bio-hidrogênio;
BSA – *Bovine Serum Albumin*;
DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio;
DNS – ácido 3,5-dinitrosalicílico;
DQO - Demanda Química de Oxigênio;
EPE – Empresa de Pesquisa Energética;
FAO - *Food and Agriculture Organization*;
HD - Hidrolisado;
HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*;
LETES – Lodo de Estação de Tratamento de Esgoto;
MEC - *Microbial Electrolysis Cell*;
MFC - *Microbial Fuel Cell*;
NH – Não Hidrolisado;
PIB – Produto Interno Bruto;
SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis*;
SF – Sólidos Fixos;
ST – Sólidos Totais;
SV – Sólidos Voláteis;
Tep – Toneladas equivalentes a petróleo;
UASB - Reator anaeróbio de manta de lodo;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Demanda energética mundial	15
2.2 Soro de queijo	17
2.3 Hidrogênio.....	18
2.4 Produção de H ₂ por processo fermentativo.....	19
2.4.1 Rotas metabólicas para a produção de H ₂	21
2.4.2 Parâmetros que influenciam no rendimento da produção.....	23
2.5 Biorreatores	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Soro de queijo	27
3.2 Enzimas	27
3.3 Reação enzimática.....	27
3.3.1 Hidrólise da proteína do soro de queijo	27
3.4 Caracterização do soro de queijo.....	28
3.4.1 Determinação da lactose	28
3.4.2 Determinação das proteínas totais	30
3.4.3 Determinação da DQO	31
3.4.4 Análise dos hidrolisados proteicos por <i>SDS-PAGE</i>	33
3.5 Reação microbiológica.....	33
3.5.1 Obtenção de consórcio produtor de BioH ₂ e CH ₄	33
3.5.2 Substratos para a produção de BioH ₂ e CH ₄	34
3.6 Determinação da produção de biogás	34
3.7 Produção do biogás	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 Concentração de lactose presente no soro de queijo	39
4.2 Concentração de proteínas totais presente no soro de queijo	40
4.3 Determinação da DQO no soro de queijo	41
4.4 Verificação dos hidrolisados proteicos pela técnica de <i>SDS-PAGE</i>	42
4.5 Produção de biogás	44
4.5.1 Monitoramento da produção de BioH ₂ e CH ₄	46
5. CONCLUSÕES	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	688

1. INTRODUÇÃO

A demanda energética mundial tem crescido exponencialmente desde o século dezoito com o advento da Revolução Industrial, gerando uma corrida por fontes energéticas. Tolmasquim e colaboradores (2007) expõem que em um período de 30 anos a demanda por energia quase triplicou no Brasil, gerando um descompasso quando comparado ao crescimento da sua oferta. Como consequência, o país passou por duas grandes crises de eletricidade nas últimas décadas, ocasionando danos econômicos e sociais que podem se estender por anos, como o desemprego e privação energética. (BORGES, 2021; IEMA, 2021).

No Brasil, o uso de derivados do petróleo ainda prevalece como maior fonte energética, porém o uso de fontes renováveis e naturais vem crescendo com ritmo acelerado (EPE, 2021).

Uma alternativa a utilização de combustíveis fósseis para a geração de energia se apresenta em larga escala em um país agrícola como o Brasil. Todos os anos, milhares de toneladas de resíduos são gerados pela indústria de commodities e alimentos, estes quando descartados de maneira incorreta possuem grande potencial poluidor. Alguns exemplos de resíduos são bagaços, cascas, soro de queijo, entre outros. (FAO, 2013).

O soro de queijo é um resíduo gerado, em grandes quantidades, pela indústria de processamento de derivados de leite. Composto por um alto conteúdo orgânico, como Demanda Química de Oxigênio (DQO) entre 50-80 g/L; a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) entre 40-60 g/L, e proteínas e carboidratos de difícil biodegradação, como a lactose. Quando esse resíduo é descartado incorretamente, pode causar um grande impacto ambiental por reduzir a quantidade de oxigênio disponível em corpos d'água. (TANBOLY.; KHORSHID, 2017).

O aproveitamento deste resíduo pode ser feito através de digestão anaeróbica, processo que reduz a carga orgânica e produz biogases de interesse econômico incluindo o metano (CH₄), hidrogênio (H₂) e gás carbônico (CO₂) (FERNÁNDEZ *et al.*, 2015). O Biohidrogênio (BioH₂), é o hidrogênio

produzido de maneira sustentável, também considerado o combustível do futuro e uma fonte promissora devido ao seu alto rendimento energético, liberando aproximadamente 122 kJ de energia por grama, gerando somente água como principal subproduto e apresentando poder calorífico cinco vezes maior que o do etanol. (LAMAISONA, 2009).

A produção do biohidrogênio e do biometano, gás metano também produzido de maneira sustentável, pode ser feita via fermentação escura/anaeróbica, que consiste em quatro principais etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Esse processo converte proteínas, carboidratos e lipídios em produtos de menor complexidade, como ácidos orgânicos voláteis, álcoois, H_2 , CO_2 e CH_4 . O hidrogênio é produzido durante o segundo estágio da fermentação, no qual os compostos disponíveis no substrato utilizado, neste caso o soro de queijo, são metabolizados no interior das bactérias e convertidos em compostos menores. Em relação ao metano, este é produzido por bactérias metanogênicas na fase de metanogênese e os produtos convertidos nas etapas anteriores são usados como substratos, inclusive o biohidrogênio. (SÁ.; CAMMAROTA.; FERREIRA-LEITÃO, 2014).

O processo de produção de biogás permite a utilização de uma ampla variedade de fontes de carbono, incluindo os resíduos industriais, devido ao a utilização de culturas mistas para metabolizam essa fonte. A vantagem de usar culturas mistas é que essas possuem uma ampla gama de atividade hidrolítica mediado por diversas enzimas que garantem a metabolização de uma variedade ainda maior de substratos/resíduos (HALLENBECK, 2013).

Contudo, diversos parâmetros podem afetar o rendimento final da produção e devem ser avaliados e estudados, como o pré-tratamento do substrato, pH, temperatura, pressão parcial, concentrações e rotas metabólicas. Existem diversas rotas que são plausíveis para a produção de biogás por microrganismos, e é possível direcionar essas rotas conforme os parâmetros a serem empregados na produção. (YASIN *et al.*, 2013).

A otimização de parâmetros é essencial para atingir maiores ganhos de produtividade. A escolha da cultura, do biorreator, do modo de operação, e do substrato são fatores que podem impactar em uma menor limitação de

nutrientes durante o processo fermentativo e consequentemente, em um maior rendimento do produto final. (PEIXOTO, 2011; HALLENBECK *et al.*, 2013).

O conceito de biorreator foi desenvolvido no século XIX e desde então houve um grande desenvolvimento e utilização desse equipamento. Os biorreatores são aparatos desenvolvidos pra garantir um ambiente propício para a realização de um bioprocessos. Não existe forma específica para a construção de biorreatores, podendo estes serem simples ou complexos, e operarem em diversos modos. Os biorreatores desenvolvidos para processos anaeróbicos são sistemas fechados para degradação da matéria por digestão anaeróbia, não permitindo a entrada de oxigênio e garantindo as condições de cultivo. Volumes elevados de biogás podem ser alcançados a partir da otimização dos biorreatores e de seus modos de operação. Visando a manutenção do ambiente anaeróbico, o modo de operação descontínuo é empregado na maior parte dos casos, garantindo uma maior estabilidade do sistema e menor risco de contaminação e perda das condições de anaerobiose. (TONSO.; JUNIOR.; SCHMIDELL, 2001).

Neste contexto, os biorreatores são adequados para o estudo de novas fontes de energia. Fontes como o hidrogênio e o metano que possam auxiliar o abastecimento da população e o desenvolvimento econômico do país, diminuindo a dependência de energia hidrelétrica. Ademais, o tratamento dos resíduos gerados ocorre concomitantemente a produção de biogás, o que contribui para a diminuição da contaminação de corpos de água doce. Portanto, o presente trabalho visa avaliar o potencial de geração de BioH_2 e BioCH_4 a partir dos resíduos de soro de queijo, com a finalidade de reaproveitar e tratar esse tipo de resíduo, empregando biorreatores sequenciais em sistema descontínuo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Demanda energética mundial

O aumento do consumo de energia tem sido crescente desde a Revolução Industrial, período de intenso desenvolvimento tecnológico iniciado na Inglaterra no século XVIII, que influenciou a competitividade econômica dos países em uma busca incessante por fontes de energia. No entanto, a natureza finita dos combustíveis fósseis e o impacto ambiental provocado pela emissão de CO₂ na atmosfera, fez emergir uma nova concepção de uso dos derivados de petróleo e a necessidade de substituição por fontes de energia renováveis e de menor impacto ambiental (ALVARADO-CUEVAS *et al.*, 2013; TOLMASQUIM.; GUERREIRO.; GORINI, 2007).

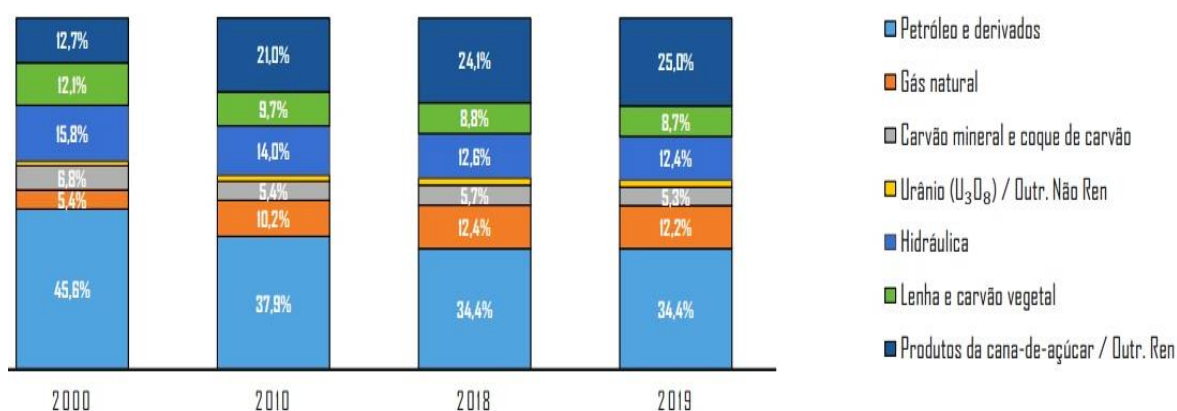
Tratando-se do Brasil, o país atravessou ao longo do século XX, um período de grande desenvolvimento econômico, refletindo a sua necessidade por uma maior demanda de energia. Consoante ao apresentado por Tolmasquim e colaboradores (2007), entre os anos 1970 e 2000, a demanda de energia quase triplicou nos períodos de vigorosa expansão econômica e populacional. Essa demanda passou de aproximadamente 70 milhões de tep (toneladas equivalentes de petróleo) na década de 70, quando país apresentava uma população de 93 milhões de habitantes, e atingiu o marco de 190 milhões de tep nos anos 2000, ao passo que a população alcançava 170 milhões de habitantes. Isto representou um significativo descompasso entre o crescimento da demanda energética e o crescimento de sua oferta no país (EPE, 2021).

No ano de 2001, o Brasil passou por uma grave crise de eletricidade que culminou em um racionamento da energia elétrica e danos econômicos e sociais ao país, como a redução do crescimento do PIB (Produto Interno Bruto), o aumento do desemprego, além da privação de energia em todos os estados. O ano de 2021 demonstrou muitos aspectos similares com a crise vivida 20 anos antes, visto que, assim como 2001, esse ano foi marcado pela escassez de chuvas. A grave problemática destes cenários está na falta de planejamento público no desenvolvimento de uma matriz energética oriunda de fontes alternativas, tendo em vista que dois terços de toda a energia gerada no país continuam sendo de origem hidrelétrica. O fator limitante do uso desse tipo

de energia está em sua dependência hídrica, que vem demonstrando longos períodos de escassez, decorrente das mudanças climáticas (BORGES, 2021; IEMA, 2021).

O Atlas de Eficiência Energética do ano de 2020 relatou que os derivados de petróleo ainda são as maiores fontes de energia no país, conforme demonstrado na Figura 1. Entretanto, o uso de gás natural vem se expandindo, bem como fontes renováveis, incluindo as fontes eólica e biodiesel, que cresceram em ritmo acelerado assim como o expressivo crescimento do setor sucroalcooleiro. Os estudos da EPE (Empresa de Pesquisa Energética) evidenciam o contínuo crescimento destas demandas energéticas nos próximos anos (EPE, 2021).

Figura 1. Principais fontes energéticas utilizadas pelo Brasil ao longo dos anos de 2000-2019.



Fonte: retirado de (EPE, 2021)

Além dessas fontes renováveis, o uso de resíduos como matéria prima para a geração de energia elétrica vem sendo considerado no Brasil. A produção de hidrogênio (H₂) oriunda dos resíduos derivados do processamento de alimentos surgiu como uma abordagem promissora, onde simultaneamente com a produção de energia verde, ocorre a redução do potencial poluidor do resíduo orgânico (YASIN *et al.*, 2013; POGGI-VARALDO & MUÑOZ-PÁEZ, 2015).

Devido a larga produção de alimentos e commodities pelo nosso país, estima-se que todos os anos sejam geradas milhares de toneladas de resíduos alimentícios [como bagaços, cascas, soro de queijo, lodos de estação de tratamento de esgoto (LETES), dentre outros], que quando descartados de

maneira incorreta, possuem grande potencial poluidor. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e a Agricultura, do inglês, *Food and Agriculture Organization* (FAO), aproximadamente um terço da produção destinada a alimentação humana acaba sendo desperdiçada, seja como resíduos ou por perdas durante o processamento dos alimentos (FAO, 2013). Nesse sentido, entende-se a necessidade do reaproveitamento destes resíduos alimentícios e o potencial uso dos mesmos no desenvolvimento de práticas mais sustentáveis, incluindo a geração de energia limpa e renovável.

2.2 Soro de queijo

O queijo é um alimento produzido a partir do leite de bovinos e outras espécies de mamíferos. Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ), a produção global de queijos obteve um recorde em 2019, com um aumento de 2,3%. Estima-se que até o final de 2030, a produção de queijo alcance 27 milhões de toneladas (ABIQ, 2021).

O soro de queijo é um dos refugos gerados pela indústria de processamento de alimentos, especificamente dos derivados de leite e queijo (YADAV, 2015). Cerca de 90% do leite utilizado na fabricação de queijo é eliminado como soro, especificamente durante a fase de aglomeração das micelas de caseína. O soro é composto basicamente por água, lactose (66-77% m/m), proteínas globulares (8-15% m/m) e sais minerais (7-15% m/m) (LAPPA *et al.*, 2019).

Em 2016, a produção global de soro de queijo foi de 200 milhões de toneladas, com um aumento linear de 3% nos últimos 20 anos (LAPPA *et al.*, 2019). Uma parcela representativa de soro é destinada a suplementação animal e na área de fertilizantes agrícolas, entretanto, a parcela que é despejada em rios ou oceanos possui relevante impacto ambiental, afetando tanto a vida aquática como a saúde humana. Isso ocorre porque o soro exibe elevado conteúdo orgânico e a presença de proteínas de difícil biodegradação, principalmente devido ao teor de lactose, que é um carboidrato presente em sua constituição (TANBOLY.; KHORSHID, 2017).

A demanda química de oxigênio (DQO) do soro varia entre 50-80 g/L, enquanto a demanda bioquímica de oxigênio (DBO) pode variar entre 40-60

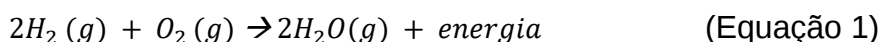
g/L. Esses parâmetros referem-se à quantidade de matéria orgânica presente no resíduo e a quantidade de oxigênio necessária para a oxidação da matéria orgânica, respectivamente. Portanto quando descartado em corpos de água, o soro de queijo reduz consideravelmente a disponibilidade de oxigênio, causando riscos a vida aquática (FERNÁNDEZ *et al.*, 2015; LAPPA *et al.*, 2019).

O aproveitamento de resíduos e o tratamento de efluentes que contém uma alta carga orgânica é, no geral, feito através da digestão anaeróbica, processo este que reduz a DQO e produz simultaneamente o biogás, constituído por uma mistura de gases, incluindo o metano (CH₄), hidrogênio (H₂) e gás carbônico (CO₂). O tratamento baseado na digestão anaeróbica emprega uma tecnologia de decomposição da biomassa em um ambiente controlado, sem oxigenação. Sua aplicação é considerada economicamente e ecologicamente atrativa para a geração de energia renovável, visto que o H₂ obtido através desse processo é um biocombustível promissor do ponto de vista econômico, social e ecológico (FERNÁNDEZ *et al.*, 2015).

2.3 Hidrogênio

O H₂ é uma fonte promissora de combustível e geração de eletricidade, que apresenta elevado rendimento energético (122 kJ/g). Devido as diversas possibilidades de produção natural, esse gás que também é chamado de Biohidrogênio, é tido como o combustível do futuro, que ajudará a formar a base de uma sociedade sustentável (DA SILVA, 2016).

O hidrogênio se destaca como biocombustível por ser uma fonte limpa de energia, cuja queima produz apenas água como subproduto, conforme esquematizado na Equação 1, além de possuir um poder calorífico cerca de cinco vezes maior que o etanol (LAMAISONA, 2009).



A eficiência de um biocombustível é dada pela quantidade de energia liberada em relação a sua massa empregada (Equação 2). A energia liberada é aquela que será transformada em energia mecânica, necessária para a locomoção de veículos, por exemplo. Segundo Santos & Santos (2005), o H₂

quando empregado como biocombustível é capaz de liberar 141,9 kJ.g⁻¹, uma quantidade quase três vezes maior do que o metano (55,5 kJ.g⁻¹) e muito acima dos combustíveis fósseis atualmente utilizados, como a gasolina, que liberam 40,5 kJ.g⁻¹, o diesel (44,8 kJ.g⁻¹) e o metanol (20,0 kJ.g⁻¹).

$$Eficiência = \frac{energia\ liberada}{massa\ de\ combustivel} \quad (Equação\ 2)$$

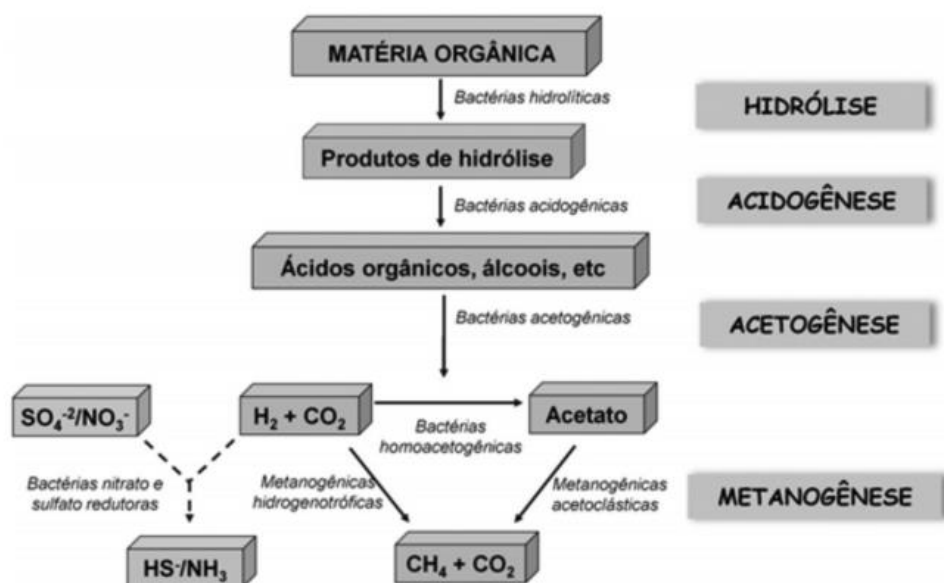
Por ser um gás formado de átomos simples, o H₂ é muito mais leve quando comparado a outros combustíveis, sendo adequado e vantajoso como combustível para aviões e no transporte aéreo espacial. Com todos os recursos disponíveis no Brasil, as possibilidades de produção desse gás são infinitas, tornando esse combustível altamente estratégico para a economia (DA SILVA, 2016).

2.4 Produção de H₂ por processo fermentativo

A produção de H₂ através de conversão microbiológica pode ser realizada por diferentes rotas, dentre elas, a fermentação escura, a foto fermentação direta e indireta e a eletro-biohidrogenação, empregando células a combustível microbiana, do inglês *Microbial Fuel Cell* (MFC) ou células de eletrólise microbiana, do inglês, *Microbial Electrolysis Cell* (MEC) (HALLENBECK, 2013). Cada uma destas rotas possui suas vantagens e desvantagens, tendo em vista a praticidade e eficiência na geração de energia. A fermentação escura merece um papel de destaque diante da simplicidade do processo e a eficiência na conversão de compostos orgânicos complexos em hidrogênio estável (YASIN *et al.*, 2013; SARATALE *et al.*, 2019).

O processo de fermentação escura/anaeróbica é coordenado por diferentes espécies de bactérias anaeróbicas que convertem proteínas, carboidratos e lipídios em produtos de menor complexidade, como ácidos orgânicos voláteis, álcoois, H₂, CO₂ e CH₄ (SÁ.; CAMMAROTA.; FERREIRA-LEITÃO, 2014). O processo da fermentação anaeróbica consiste em quatro principais etapas, ilustradas em forma de fluxograma apresentado na Figura 2, a saber: (i) hidrólise, (ii) acidogênese, (iii) acetogênese e (iv) metanogênese.

Figura 2. Fluxograma das quatro etapas da fermentação anaeróbica na metabolização da matéria orgânica para a geração de biogás.



Fonte: retirado de (SÁ.; CAMMAROTA.; FERREIRA-LEITÃO, 2014)

Durante a etapa de hidrólise, bactérias hidrolíticas produzem enzimas capazes de degradar os compostos complexos disponíveis nos resíduos em compostos mais simples que permeiam as membranas celulares das bactérias responsáveis pela fermentação. A acidogênese é o segundo estágio da fermentação, no qual os produtos da etapa anterior são metabolizados no interior das bactérias e posteriormente convertidos em compostos extremamente simples, como álcoois, H_2 e CO_2 (SÁ.; CAMMAROTA.; FERREIRA-LEITÃO, 2014). Na etapa da acetogênese, as bactérias acetogênicas convertem os produtos provenientes da acidogênese em substratos para as bactérias metanogênicas. As bactérias que participam desta última etapa, denominada de metanogênese são divididas em dois grupos, as metanogênicas acetoclásticas, que usam o ácido acético como substrato, e as metanogênicas hidrogenotróficas, onde o substrato é o hidrogênio. As bactérias metanogênicas convertem o H_2 e ácido acético (CH_3COOH) em CH_4 e CO_2 , respectivamente (SÁ.; CAMMAROTA.; FERREIRA-LEITÃO, 2014; HALLENBECK, 2013).

Uma ampla variedade de fontes de carbono pode ser metabolizada por estes microrganismos. Os metabólitos secundários, incluindo o CH_4 e CO_2

também podem ser de grande aproveitamento para a geração de energia. No entanto, como principal desvantagem dessa rota de produção de biogás está a necessidade de tratamento do efluente pós-fermentação (SÁ.; CAMMAROTA.; FERREIRA-LEITÃO, 2014).

Em relação aos resíduos/biomassa que podem ser utilizados para a produção de BioH₂, podemos destacar resíduos de madeira, lenha, resíduos de gado, algas marinhas, resíduos industriais da produção de biodiesel (glicerol), resíduos de laticínios, dentre outros. Os resíduos do processamento de alimentos como resíduo de tofu, soro de queijo e pasta de arroz, vem sendo testados como fontes produtoras de H₂. (SARATALE *et al.*, 2019).

No geral, a produção de H₂ a partir dos resíduos alimentares é resultado da degradação de carboidratos por meio dos processos de acidogênese e acetogênese. Diversos parâmetros podem afetar o seu rendimento final, sendo os principais o pH, a presença de ácidos graxos voláteis, temperatura, pressão parcial de hidrogênio, fontes de inóculo e concentrações de resíduos alimentares, além do pré-tratamento dos mesmos. As características físico-químicas dos resíduos alimentares são muito importantes no delineamento da operação de um sistema de digestão anaeróbica que tem como finalidade a produção do BioH₂ (YASIN *et al.*, 2013).

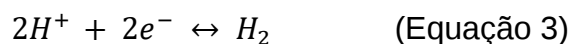
2.4.1 Rotas metabólicas para a produção de H₂

A produção de H₂ via fermentação pode ser realizada usando culturas puras ou culturas mistas enriquecidas por tratamento. A vantagem de usar culturas mistas é que essas possuem uma ampla gama de atividade hidrolítica mediado por enzimas específicas que garantem a metabolização de uma variedade ainda maior de substratos/resíduos (HALLENBECK, 2013).

As enzimas hidrogenases podem ser classificadas pelo tipo de metal encontrado em seus centros ativos. As [FeFe]-hidrogenases são aquelas que contém somente ferro (Fe) em seu sítio catalítico, e geralmente são encontradas em microrganismos produtores de BioH₂, tais como bactérias do gênero *Clostridium*. As [NiFe]-hidrogenases são aquelas que contém Fe e níquel (Ni) em seus centros ativos, enquanto as [NiFeSe]-hidrogenases, possuem Fe, Ni e selênio (Se), sendo classificadas como consumidoras de H₂,

tais como as arqueobactérias metanogênicas (SÁ.; CAMMAROTA.; FERREIRA-LEITÃO, 2014).

As hidrogenases presentes em bactérias anaeróbicas garantem a desintegração da biomassa em BioH₂, sob condições anaeróbicas. A Equação 3 apresentada por Peixoto (2011), demonstra a reação oxidativa que ocorre na presença de elétrons, que conduz com a geração de BioH₂:

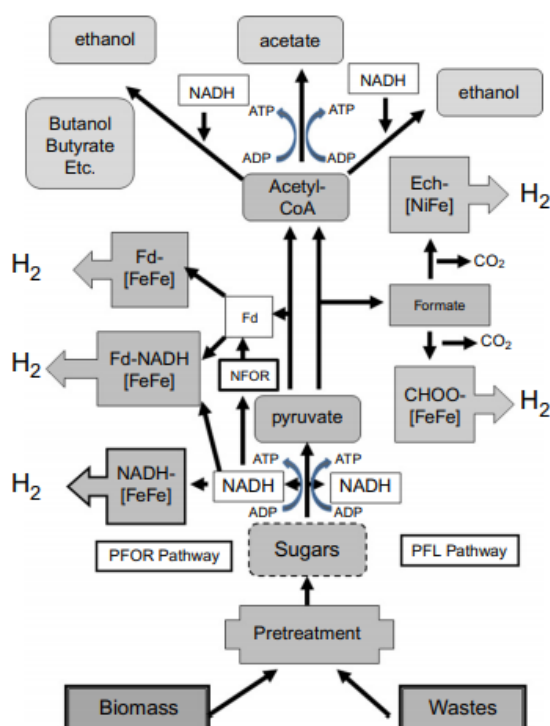


O mesmo autor exemplifica uma segunda reação (Equação 4) que pode ocorrer na presença de NADH, por meio do processo de glicólise que leva a geração de H₂ através de sua oxidação.



Além das duas rotas metabólicas mencionadas anteriormente, existem diversas rotas que são plausíveis para a produção de BioH₂ por microrganismos. A Figura 3 demonstra um compilado das diferentes rotas metabólicas possíveis para atingir o produto final de interesse:

Figura 3. Diferentes rotas metabólicas que levam a produção de BioH₂ através da fermentação escura. As hidrogenases podem atuar por meio de diferentes processos fermentativos, incluindo a glicólise e a degradação do piruvato. Alguns mecanismos ainda são especulativos.



Fonte: (HALLENBECK, 2013)

No que diz respeito a degradação do piruvato para a produção de BioH₂, é sabido que a bactéria *Escherichia coli* pode utilizar desta rota metabólica por meio da síntese das enzimas [NiFe]-hidrogenase e Ech hidrogenase, enquanto outros microrganismos, incluindo as bactérias do gênero *Firmicutes*, podem produzir o biogás através da síntese de hidrogenase trimérica que ancorada ao citoplasma, ativa o processo de oxidação por meio da redução de prótons. Esta mesma classe de bactérias pode ainda utilizar de outras rotas metabólicas para a produção do BioH₂ (SÁ.; CAMMAROTA.; FERREIRA-LEITÃO, 2014).

2.4.2 Parâmetros que influenciam no rendimento da produção

Muitos estudos apontam que quando há otimização dos parâmetros é possível atingir maiores ganhos produtivos. O uso de pH controlado, adequações no modo de operação dos reatores biológicos (biorreatores) e a escolha dos substratos são fatores que podem impactar em uma menor

limitação de nutrientes durante o processo fermentativo e consequentemente, em um maior rendimento do produto final (PEIXOTO, 2011; HALLENBECK *et al.*, 2013).

Volumes elevados de biogás podem ser alcançados a partir da otimização dos biorreatores. Na prática, um grande número de variáveis deve ser considerado no uso dos biorreatores, incluindo o *design* e o modo operacional destes equipamentos. Na maior parte dos casos, os biorreatores são operados em modo batelada, sendo este um método simples e de fácil operação, que apresenta rendimentos consideráveis quando comparado ao modo contínuo de operação. Aliado a esse fator, a pressão parcial de H₂ também constitui-se como um importante componente do processo que deve ser controlado, a fim de evitar o excesso de produtos gerados que podem prejudicar o rendimento final (HALLENBECK, 2013; SÁ.; CAMMAROTA.; FERREIRA-LEITÃO, 2014).

A escolha de culturas puras ou mistas, imobilizadas ou pela formação de auto agregados, também são alternativas que devem ser consideradas para atingir uma maior produtividade do biogás, embora o uso de culturas mistas demonstre maiores vantagens devido a ampla gama de substratos que podem ser empregados durante o processo. Dentre os diversos compostos orgânicos que podem ser usados como substratos, a fermentação com carboidratos é a que traz o maior rendimento (PEIXOTO, 2011).

2.5 Biorreatores

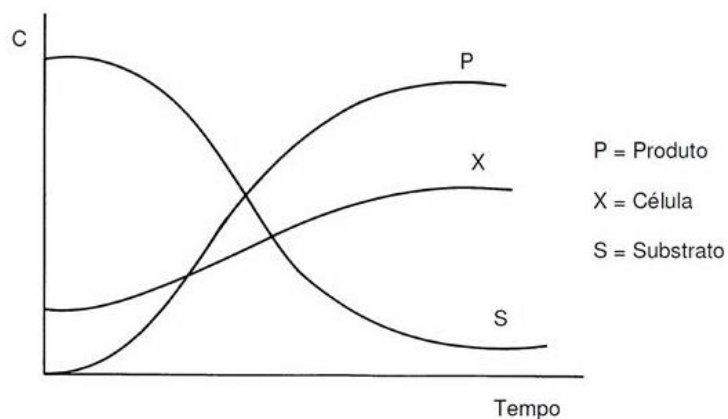
Os biorreatores são aparatos desenvolvidos para garantir que um bioprocessos ocorra de maneira efetiva, apresentando um ambiente propício para o crescimento celular e para a síntese do produto de interesse. Não existe forma específica para a construção de um biorreator, podendo este ser apresentado em um formato mais simples, bem como por uma estrutura mais complexa, contendo agitadores e sensores de pH, temperatura, oxigênio dissolvido e outros (TONSO.; JUNIOR.; SCHMIDELL, 2001).

Os primeiros biorreatores desenvolvidos para a produção de ácido cítrico e penicilina datam do século XIX, e desde então houve um exponencial crescimento do desenvolvimento e utilização destes equipamentos. As

classificações dos diferentes biorreatores variam de acordo com alguns critérios, a saber: o tipo de células utilizadas (livres ou imobilizadas), o modo de agitação, o tipo de cultivo (submerso ou em estado sólido), e a sua aplicação, incluindo o tipo de microrganismo empregado (aeróbicos ou anaeróbicos) (TONSO.; JUNIOR.; SCHMIDELL, 2001). Os biorreatores anaeróbicos são sistemas fechados, onde a degradação da matéria orgânica é realizada pela digestão anaeróbica. As bactérias anaeróbicas são os principais microrganismos empregados para a degradação de matéria orgânica no sistema anaeróbico, pois a ausência de oxigênio e as condições tolerantes do biorreator, como temperatura, pH, umidade e relação de fontes de carbono/nitrogênio são ideais para a sobrevivência e atividade destes microrganismos (DUARTE, 2014).

O modo de operação do biorreator é de suma importância quando se trata especificamente do bioprocesso, pois a condução deste é a forma como serão disponibilizados os nutrientes e os parâmetros necessários para que ocorra a produção. O processo descontínuo, ou batelada, é o modo mais simples de operação e manutenção do biorreator, onde todos os nutrientes são adicionados no início do processo, juntamente com os microrganismos. Durante este bioprocessos não são adicionados novos nutrientes ou retirados os metabólitos gerados até o término do ciclo. A Figura 4 ilustra o comportamento deste tipo de operação, onde a concentração de substratos começa a diminuir à medida que os microrganismos se multiplicam e a concentração do produto aumenta gradativamente. Como principal vantagem do uso do biorreator em sistema de batelada, destaca-se o impedimento de contaminações e mutações durante o bioprocessos, e como principal desvantagem está a obtenção de taxas reduzidas de produtividade (TONSO.; JUNIOR.; SCHMIDELL, 2001).

Figura 4. Comportamento das células (microrganismos), substrato e produtos ao longo do tempo de um processo empregando um biorreator operado em processo descontínuo.



Fonte: própria autoria.

Por outro lado, o processo descontínuo alimentado, também designado como batelada alimentada, caracteriza-se pela adição de nutrientes ao longo do cultivo, sem a retirada do produto. Esse modo de operação permite que a alimentação do sistema seja realizada de diversas maneiras. Sua escolha geralmente é pautada em situações onde pode ocorrer a inibição da geração de produtos diante dos substratos adicionados ou devido a repressão. Como desvantagem, o sistema em batelada alimentada predispõe um aumento gradativo do volume de nutrientes dentro do biorreator, prejudicando a produção do produto de interesse (TONSO.; JUNIOR.; SCHMIDELL, 2001).

Já o processo contínuo tem como princípio a entrada e saída constante de meio de cultura (nutrientes) e dos produtos a partir da mesma vazão, de modo que o volume presente dentro do biorreator se mantenha constante. O processo é iniciado como descontínuo até atingir a fase estacionária, onde inicia-se a retirada dos produtos e o bombeamento de nutrientes (TONSO.; JUNIOR.; SCHMIDELL, 2001; DUARTE, 2014). A fase estacionária do sistema contínuo é caracterizada pelo momento onde as grandezas permanecem inalteradas até certo tempo pré-determinado, incluindo a concentração de microrganismos, os substratos e os produtos gerados. A quantidade de microrganismos previamente inoculados passa a ser igual a quantidade retirada do sistema, embora a velocidade de crescimento passe a ser menor que a fase exponencial de um cultivo descontínuo. Em relação as principais vantagens desse modo de operação, podemos destacar a elevada

produtividade e o maior tempo de operação. Em situações onde a vazão torna-se muito alta, ocorre um processo chamado de lavagem do biorreator (momento onde a saída microrganismos e dos produtos originados por estes é maior do que o crescimento e a sua produção, respectivamente), interrompendo assim, o estado estacionário. O principal inconveniente deste tipo de processo é a manutenção de um ambiente estéril e a extração do produto final (TONSO.; JUNIOR.; SCHMIDELL, 2001).

À vista do exposto, o presente trabalho visa avaliar o potencial bioativo de geração de BioH_2 e CH_4 a partir dos resíduos de soro de queijo, com a finalidade de reaproveitar e tratar esse tipo de resíduo. Para a produção do biogás foram empregados biorreatores sequenciais em sistema descontínuo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Soro de queijo

O soro de queijo liofilizado foi adquirido da indústria de laticínios Salute, localizada no município de São Carlos-SP.

3.2 Enzimas

As enzimas tripsina e alcalase empregadas na hidrólise do soro de queijo foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Enzimologia Industrial da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP coordenado pelo Prof. Dr. Rubens Monti. As enzimas estavam previamente imobilizadas em pó de sabugo de milho, realizado pelo método proposto por Cruz (2017).

3.3 Reação enzimática

3.3.1 Hidrólise da proteína do soro de queijo

A hidrólise das proteínas do soro de queijo foi conduzida utilizando 20 mL de soro reconstituído (diluição de 100x). A tripsina e a alcalase foram utilizadas na proporção de 1 g e 0,5 g para cada 20 mL de soro, respectivamente. Para a hidrólise propriamente dita, inicialmente a tripsina foi adicionada em frascos erlenmeyer de 100mL juntamente com o soro e mantida em temperatura de 50°C sob agitação constante de 100 rpm (*shaker Innova*

40) por 24h. O pH foi ajustado para 9.0 através da adição de hidróxido de sódio (NaOH) 1N. Decorrido esse período, a solução foi filtrada para a retirada da enzima, e o processo foi repetido com a alcalase imobilizada.

3.4 Caracterização do soro de queijo

Os soros de queijo não hidrolisado e hidrolisado foram caracterizados por meio da quantificação dos seguintes componentes: lactose de acordo com o método proposto por MILLER (1959), proteínas totais e residuais segundo HARTREE (1972), DQO de acordo com APHA (1998) e a mensuração do pH. O soro hidrolisado também foi submetido às análises de grau de hidrólise (SPELLMAN *et al.*, 2003) e também pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil- sulfato de sódio (SDS), do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)* (LAEMMLI, 1970).

3.4.1 Determinação da lactose

O método de Miller (1959) foi aplicado para a determinação da lactose presente no soro de queijo e em seu hidrolisado. Para a aplicação do método, realizou-se a construção de uma curva analítica, empregando a lactose comercial como padrão. Para tal, 25 mg de lactose foi adicionado em balão volumétrico de 25 mL, com posterior solubilização utilizando água Mili-Q para se obter uma solução com concentração inicial de 1 mg/mL, que foi empregada para construção da curva analítica e a determinação da Absorbância (Abs) em comprimento de 540 nm (Tabela 1). O experimento foi realizado em triplicata.

Tabela 1. Diferentes concentrações de lactose dispersa em água e DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), para a construção da curva padrão analítica.

Tubo de ensaio	Lactose (mg)	Água Milli-Q (mL)	DNS (mL)
1	0,0	0,250	0,250
2	0,010	0,240	0,250
3	0,025	0,225	0,250
4	0,050	0,200	0,250
5	0,100	0,150	0,250
6	0,150	0,100	0,250
7	0,200	0,050	0,250

Fonte: própria autoria

Após a construção da curva analítica, seguiu-se com a determinação da lactose presente no soro hidrolisado e não hidrolisado. Diferentes proporções do soro foram diluídas em diferentes volumes de água/DNS para a quantificação da lactose (Tabela 2). O ensaio foi conduzido em triplicata. Com as médias das leituras de Abs, a curva analítica de Abs (%) x lactose (mg/L) foi construída.

Tabela 2. Determinação da concentração de lactose no soro de queijo hidrolisado e não hidrolisado. Diferentes diluições do soro hidrolisado/não hidrolisado foram preparadas.

Tubos	Soro (µL)	Água (µL)	DNS (µL)
1	0	250	250
2	100 (diluído ×10)	150	250
3	100 (diluído ×50)	150	250
4	100 (diluído ×100)	150	250
5	100 (diluído ×200)	150	250

Fonte: própria autoria

Na determinação da concentração da lactose no soro de queijo e no soro hidrolisado, os cálculos foram feitos a partir da equação da reta obtida após a construção da curva analítica, seguindo a Equação 5:

$$C = \frac{Ab}{\varepsilon} \times MM \times diluição \text{ (Equação 5)}$$

Onde:

C= concentração

A= Abs média

ε = coeficiente angular da curva

MM= massa molar da lactose (360,31 g/mL)

3.4.2 Determinação das proteínas totais

A determinação das proteínas totais no soro hidrolisado e não hidrolisado foi realizada pelo método de Lowry. A albumina de soro bovino, do inglês, *Bovine Serum Albumin* (BSA) foi utilizada como padrão para a construção da curva analítica. Previamente foi preparado uma solução padrão de BSA contendo 15 mg de proteína em 50 mL de água Milli-Q. Uma solução designada como solução A foi preparada no momento do uso, contendo os seguintes constituintes: 70 mL de solução de carbonato dissódico (Na_2CO_3) a 2%, NaOH (0,1M), 0,7 mL de sulfato de cobre (CuSO_4) a 1% e 0,7 mL de tartarato de sódio/potássio, ambos a 1%. Esta solução leva a reação de Biureto, constituída por uma mistura de cobre, hidróxido de sódio e tártaro de sódio para estabilizar o cobre em solução. Este reagente interage com proteínas formando um complexo com a ligação peptídica (ZAIA *et. al.*, 1998). A Tabela 3 traz as diferentes concentrações que foram preparadas para a construção da curva analítica de BSA. Anteriormente a leitura, 25 mL de reagente *Folin-Ciocalteu* foram adicionados nos tubos de ensaio, com posterior incubação por 30 minutos. O reagente *Folin-Ciocalteu* é necessário para ocorrer a segunda reação pelo complexo cobre-ligação peptídica, ocasionando uma mudança na coloração da solução (ZAIA *et. al.*, 1998). Finalizado essa etapa, as Abs foram mensuradas em comprimento de onda de 660 nm. Com as médias das leituras de Abs, a curva analítica de Abs (%) x BSA (mg/mL) foi construída.

Tabela 3. Preparo de diferentes concentrações de BSA, empregando água e solução A como solventes para a construção da curva analítica.

Tubos	Solução BSA (μL)	BSA (mg)	Água (μL)	Solução A (mL)
0	-	-	500	2,5
1	50	0,015	450	2,5
2	100	0,030	400	2,5
3	150	0,045	350	2,5
4	200	0,060	300	2,5
5	250	0,075	250	2,5
6	300	0,090	200	2,5
7	350	0,105	150	2,5
8	400	0,12	100	2,5

Fonte: própria autoria

Diferentes volumes de 50 μL , 100 μL e 200 μL de soro de queijo não hidrolisado e após a sua hidrólise foram empregadas para a determinação da concentração. O experimento foi realizado em triplicata. As Abs obtidas foram colocadas na equação da reta e a concentração de proteínas totais foram obtidas.

3.4.3 Determinação da DQO

A determinação da DQO do soro foi realizada seguindo o preparo das seguintes soluções, cujos reagentes foram disponibilizados pelo Laboratório de Enzimologia: (a) solução de sulfato de prata em ácido sulfúrico concentrado 1M (AgSO_4 em H_2SO_4). Com o auxílio de um bastão de vidro, 10,12 g de AgSO_4 foi moído e misturado com 1,0 L de ácido sulfúrico em frasco âmbar. O frasco foi completamente fechado e deixado no escuro por dois dias para a dissolução total do sal de prata; (b) solução de digestão: em um becker de 2 L, adicionou-se 1,5 L de água destilada e 334 mL de H_2SO_4 concentrado. A mistura foi inserida em banho de gelo. Logo após, retirou-se do banho de gelo para a homogeneização da solução com 66,6 g de sulfato de mercúrio (Hg_2SO_4) e

20,432 g de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) sob agitação magnética. A solução foi resfriada e armazenada em frasco âmbar.

Posteriormente, realizou-se o preparo da solução padrão, dispondo 425 mg de hidrogênioftalato de potássio, do inglês *K hydrogen phthalate* (KHP) (previamente seco em estufa por 3 horas a $110^\circ C$) em um balão volumétrico de 50 mL. Na Tabela 4 está indicado o volume necessário de KHP para a determinação das concentrações que foram utilizadas na construção da curva analítica padrão.

Tabela 4. Diferentes concentrações da solução padrão de KHP para o preparo da curva analítica de DQO.

Concentração (mg/L)	Solução padrão (μL)
0	0,0
50	50
100	100
200	200
400	400
600	600
800	800

Fonte: própria autoria

Transferiu-se uma alíquota de 2,5 mL de água destilada (branco) e de concentração da solução padrão em tubos próprios de DQO, e em seguida, adicionou-se 1,5 mL da solução de digestão e 3,5 mL da solução de sulfato de prata. Com o digestor previamente aquecido a $150^\circ C$, os tubos foram deixados incubados por 2h. Transcorrido o tempo, as soluções foram deixadas para esfriar na ausência de luz e as leituras das Abs foram realizadas em comprimento de 620 nm. Com as médias das leituras, a curva analítica de Abs (%) x DQO (mg/L) foi construída.

As concentrações de DQO no soro de queijo reconstituído e em seu hidrolisado foram obtidas empregando duas diluições diferentes das amostras (200x e 500x). Com o auxílio de uma pipeta volumétrica, transferiu-se 2,5 mL de cada amostra para os tubos de DQO. Em seguida, 1,5 mL da solução de digestão e 3,5 mL da solução de $AgSO_4$ em H_2SO_4 foram adicionadas. Após a homogeneização, o processo repetiu-se conforme descrito anteriormente.

3.4.4 Análise dos hidrolisados proteicos por SDS-PAGE

As proteínas presentes no soro de queijo hidrolisado e não hidrolisado foram caracterizadas pela técnica *SDS-PAGE*. O padrão de peso molecular possuía como principais proteínas, a BSA (30 KDa), a β -lactoglobulina (20,1 KDa) e a α -lactoalbumina (14,4 KDa). Para a corrida foi aplicada uma tensão de 200V a 20 mA. Após o término da mesma, o gel foi corado utilizando *Comassie blue, overnight*. A composição do corante possui os seguintes reagentes: sulfato de amônio [8% (m/v)], ácido fosfórico [1,6% (m/v)], metanol:água (1:4) e *comassie brilliant blue G250* [0,08% (m/v)]. No dia seguinte, o corante foi removido com banhos de solução descorante a base de ácido acético 10% e metanol 25%, em água destilada, trocados sucessivamente até a descoloração do gel.

3.5 Reação microbiológica

3.5.1 Obtenção de consórcio produtor de BioH₂ e CH₄

Para obtenção de um consórcio microbiano produtor dos gases BioH₂ e CH₄, foi utilizado um reator de acrílico com diâmetro interno e externo de 82 mm e 115 mm, respectivamente, e altura de 290 mm, com um volume de leito de 2 L. Esse reator destinado a produção do consórcio microbiano produtor de H₂ foi preenchido com polietileno de baixa densidade (LUCAS *et al.*, 2015) e a alimentação foi realizada de forma ascendente com bombas de diafragma, operando em uma vazão de recirculação de 20 mL/h por 7 dias.

Já o reator contendo o consórcio microbiano destinado a produção do gás metano (lodo de estação de tratamento) era do tipo manta de lodo (UASB). O reator foi preenchido com lodo de tratamento derivado de resíduos de abatedouro (LUCAS *et al.*, 2015) e a alimentação foi feita de forma ascendente com bomba de diafragma operando na mesma vazão que a anterior.

Ao final da operação desses reatores produtores dos consórcios microbiológicos a biomassa gerada (fase sólida) foi separada por filtração e acondicionada à 5°C até o seu uso. Ou seja, até a inoculação dos reatores em batelada para a produção de hidrogênio e metano a partir de soro de queijo hidrolisado e não-hidrolisado.

3.5.2 Substratos para a produção de BioH₂ e CH₄

Como os substratos para a produção do biogás, foram empregados o soro de queijo reconstituído não hidrolisado e o soro de queijo hidrolisado. A Tabela 5 descreve a composição e o volume do meio nutriente suplementar adicionado em cada um dos reatores contendo os microrganismos e os substratos para a produção de BioH₂. Os reatores contendo o soro de queijo reconstituído foram como denominados como reatores “NH”, enquanto aqueles contendo o soro de queijo hidrolisado foram denominados como reatores “HD”.

Tabela 5. Volumes empregados de cada componente dentro dos reatores para a produção do biogás.

Reatores	Componentes	Concentração no meio (mg/mL)	Volume adicionado aos reatores (µL)
1	Oxido de selênio	0,036	3,5
2	Fosfato de potássio monobásico	5,36	3,5
	Fosfato de potássio dibásico	1,3	3,5
	Fosfato de sódio dibásico	2,76	4,39
3	Cloreto de cálcio	2,06	0,515
4	Sulfato de níquel	0,5	3,5
	Sulfato ferroso	2,5	3,5
	Cloreto férrico	0,25	3,5
5	Uréia	6	0,084 mg
	Bicarbonato de sódio	pH 5,5	

Fonte: própria autoria

Já para a produção de CH₄, foram utilizados os metabólitos da produção de H₂ como substratos.

3.6 Determinação da produção de biogás

Para avaliar o potencial de produção do biogás, foram construídas duas diferentes curvas analíticas tanto para o hidrogênio quanto para o gás metano. Em ambos os casos, empregou-se um método utilizando a cromatografia gasosa em cromatógrafo GC-2010 (Shimadzu). Na Tabela 6 são demonstrados

os diferentes volumes do hidrogênio injetado no cromatógrafo e na Tabela 7, os diferentes volumes empregados para o gás metano.

Tabela 6. Diferentes volumes de H₂ injetados em cromatógrafo GC-2010 para a construção das curvas analíticas padrões.

Volume de H₂ em litros (L) - alta concentração	Volume de H₂ em litros (L) - baixa concentração
0,001	0,0003
0,0008	0,0002
0,0007	0,0001
0,0006	0,00006
0,0005	0,00004
0,0004	0,00002
0,0003	0,00001

Fonte: própria autoria

Tabela 7. Diferentes volumes de CH₄ injetados em cromatógrafo GC-2010 para a construção das curvas analíticas padrões.

Volume de CH₄ em litros (L) - alta concentração	Volume de CH₄ em litros (L) - baixa concentração
0,001	0,0003
0,0008	0,0002
0,0007	0,0001
0,0006	0,00006
0,0005	0,00004
0,0004	0,00002
0,0003	0,00001

Fonte: própria autoria

Para determinar a concentração inicial de microrganismos produtores de biogás foi aplicada a metodologia de determinação do teor de sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV) e fixos (SF). A identificação do teor de sólidos voláteis nos consórcios (lodos produtores de H₂ e CH₄) permite avaliar a eficiência energética oriunda da biodigestão. Quanto maior a concentração de SV na biomassa, maior a possibilidade de melhores produções de biogás

(OLIVEIRA, 2004). A determinação de SV tem como objetivo identificar a quantidade de matéria biodegradável disponível nos substratos.

Dessa maneira, as amostras foram inseridas em cápsulas de porcelana previamente calcinadas em forno mufla a 550°C durante 15 minutos, mantidas no forno até atingirem 150°C e transferidas para estufa a 105°C. Em seguida, ao atingir estabilização térmica, as cápsulas foram dispostas dentro do dessecador para resfriamento em atmosfera seca e posteriormente pesadas (massa da cápsula vazia – M_0).

Logo após, 10mL das amostras foram adicionadas nas cápsulas, cuja massa era conhecida e na sequência, o material foi seco em estufa a 105°C, por aproximadamente 30h. Novamente as cápsulas contendo as amostras foram resfriadas em dessecador para ser possível a aferição da massa do material seco, nomeado como M_1 . Os cálculos empregados para a determinação dos ST em mg/L, obedeceu a Equação 6:

$$\text{Concentração } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{(M_1 - M_0) \cdot 1000}{\text{Volume amostra (L)}} \text{ Equação (6)}$$

Seguiu-se com a calcinação das cápsulas contendo a amostra seca em forno mufla a 550°C, por 2h. Após finalizado a calcinação, esperou-se atingir 150 °C para serem transferidas para a estufa a 105°C. Depois, foram dispostas no dessecador até atingirem temperatura ambiente, com posterior medição da massa (massa de cápsula mais amostra pós-mufla – M_2). Dessa forma, pode-se calcular a concentração, em mg/L, dos SV e SF através das Equações 7 e 8, respectivamente:

$$\text{Concentração sólidos totais voláteis } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{(M_1 - M_2) \cdot 1000}{\text{Volume amostra (L)}} \text{ Equação (7)}$$

$$\text{Concentração sólidos totais fixos } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{(M_2 - M_0) \cdot 1000}{\text{Volume amostra (L)}} \text{ Equação (8)}$$

3.7 Produção do biogás

Na produção de H_2 , utilizou-se seis reatores com capacidade volumétrica máxima de 38 mL selados com septos de borracha. Nestes foram inseridos 6 mL de consórcio produtor de biogás somado a 14 mL do substrato. O volume restante de 18 mL foi utilizado como *headspace* (espaço livre para a acumulo de gases). A Tabela 8 fornece os dados dos reatores com os devidos meios utilizados. Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

Tabela 8. Substratos empregados em reatores destinados a produção de hidrogênio.

Reatores	Substratos
1, 2 e 3	Soro de queijo hidrolisado com meio nutriente.
4, 5 e 6	Soro de queijo reconstituído com meio nutriente

Fonte: própria autoria.

Os reatores foram incubados a 37°C e submetidos a uma agitação de 150 rpm em *shaker* termostático. O monitoramento da produção de biogás foi realizado a cada uma hora por meio do cromatógrafo GC-2010. Além disso, foi realizada a medida da pressão dentro dos reatores com o auxílio de um manômetro portátil, antes da retirada das amostras horarias. Alíquotas de 100 μ L retiradas do *headspace* foram injetadas no cromatógrafo.

Para a produção do gás metano, utilizou-se os mesmos reatores de 38 mL selados com septos de borracha e reforçados com parafilm. Na Figura 5 é mostrado um dos reatores empregados para a produção. Os substratos empregados foram descritos na Tabela 9 e foram divididos em: metabólitos derivados da produção de $BioH_2$ utilizando soro hidrolisado, metabólitos derivados da produção de $BioH_2$ utilizando soro não hidrolisado. Os ensaios foram realizados em triplicata. No total, 6 reatores foram monitorados.

Figura 5. Foto dos biorreatores preparados para o início da produção de CH_4 .



Fonte: própria autoria

Tabela 9. Substratos empregados em reatores destinados a produção de CH_4 .

Reatores	Substratos
1, 2 e 3	Metabólitos da produção de hidrogênio utilizando soro hidrolisado
4, 5 e 6	Metabólitos da produção de hidrogênio utilizando soro reconstituído

Fonte: própria autoria

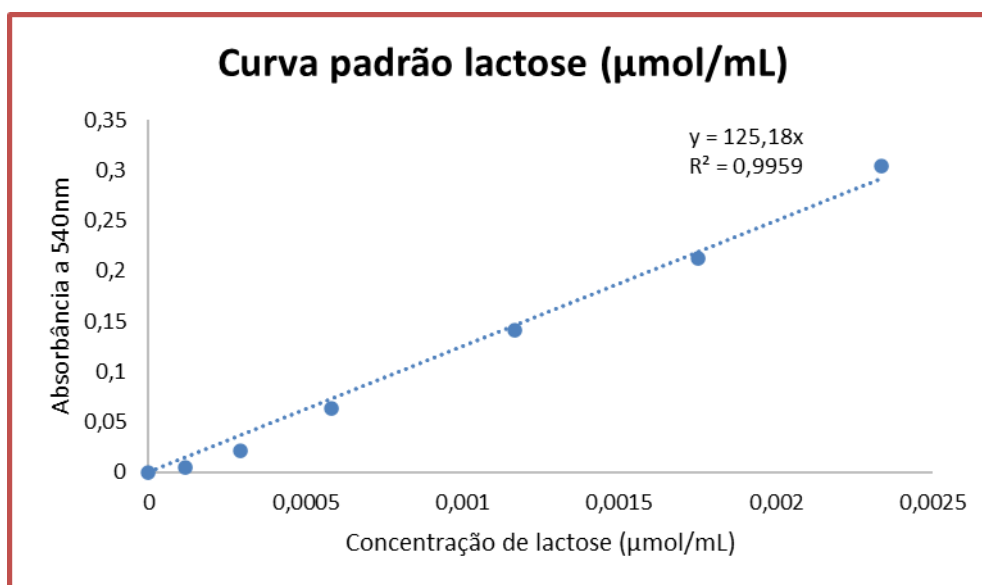
Os reatores metanogênicos tiveram seu pH inicial ajustado para 7 e foram incubados a 25°C a uma agitação de 150 rpm em *shaker* termostático. O monitoramento seguiu o mesmo procedimento da produção de BioH_2 com a aferição da composição do biogás a partir do cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2010 e da pressão interna através do manômetro portátil.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Concentração de lactose presente no soro de queijo

Na Figura 6 foi mostrada a curva padrão analítica construída para a determinação da concentração de lactose. Essa curva possibilitou a quantificação de lactose antes e após a reação de hidrólise do soro de queijo.

Figura 6. Curva analítica padrão da lactose em $\mu\text{mol/mL}$



Fonte: própria autoria

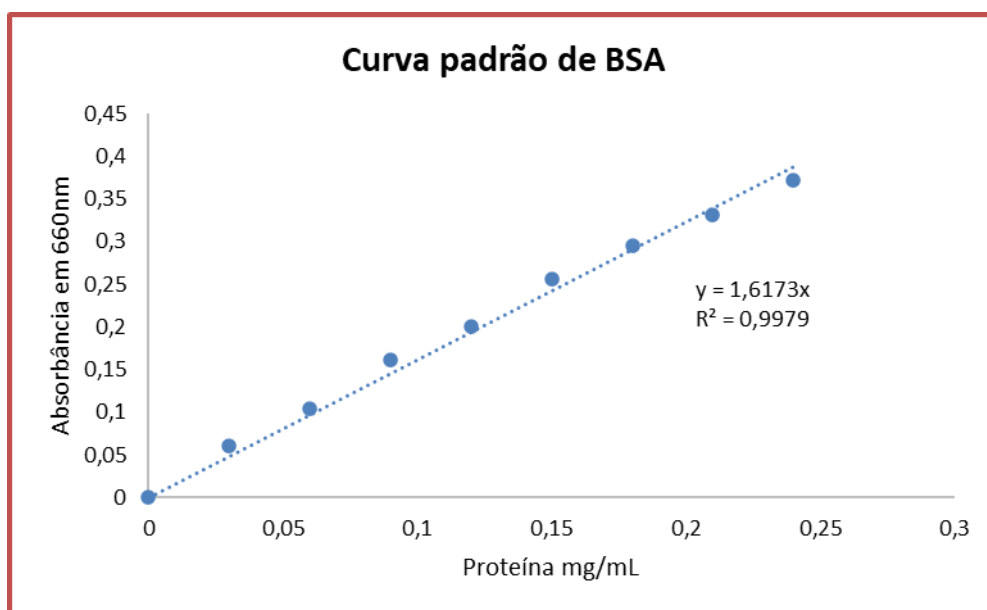
As quantificações obtidas no soro não hidrolisado e hidrolisado foram de $0,089 \mu\text{mol/mL}$ e de $0,064 \mu\text{mol/mL}$, respectivamente. Esses resultados não estão de acordo com Almeida *et. al*, (2001) que definiu o teor de lactose no soro de queijo minas frescal, é em média 4,50%, enquanto o encontrado foi em média de 3% para soro de queijo reconstituído e 2,25% para o hidrolisado. Isso pode ter ocorrido devido ao método empregado para a quantificação. De acordo com Saqib & Whitney (2011), dissacarídeos tais como a lactose podem sofrer hidrólise durante a reação com DNS, resultando em valores imprecisos e de difícil interpretação. A cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês, *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) poderia ser uma alternativa mais confiável e reprodutível a ser empregada nos estudos posteriores. Ademais, como o soro de queijo foi doado liofilizado e sem informações sobre sua procedência, é possível que o tipo do queijo, e seu modo de produção

deste influencie na disponibilidade de lactose do soro, gerando assim, uma grande diferença quando comparado com a literatura.

4.2 Concentração de proteínas totais presente no soro de queijo

A curva de calibração construída para a dosagem de proteínas totais encontra-se plotada na Figura 7:

Figura 7. Curva analítica padrão de BSA em mg/mL.



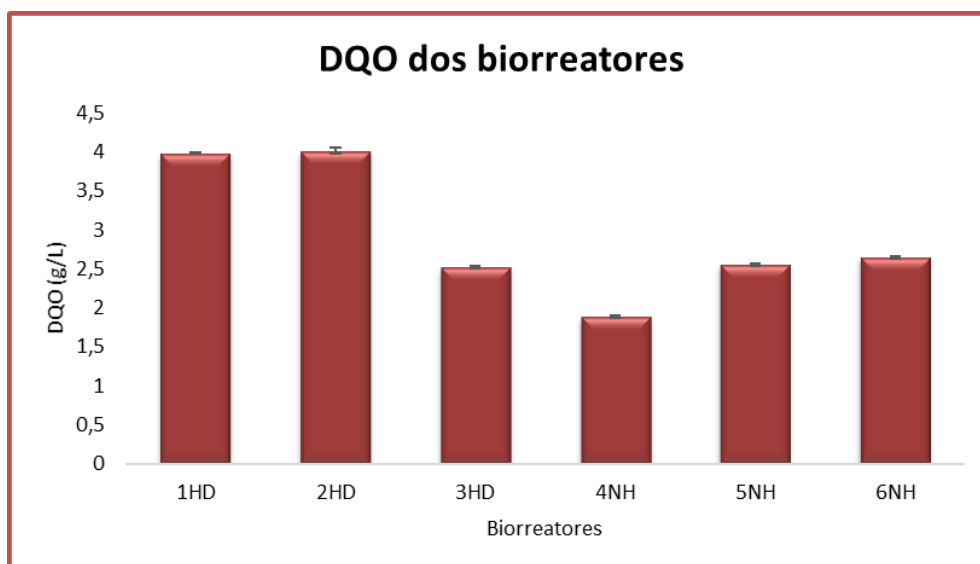
Fonte: própria autoria

A média obtida da concentração de proteínas totais presentes no soro não hidrolisado foi de 3,42 mg/mL e de 1,03 mg/mL para o soro hidrolisado. De acordo com a literatura, o soro do leite possui as seguintes concentrações: 3,4-4 g.L⁻¹ de β -lactoglobulina, 1,2-1,5 g.L⁻¹ de α -lactalbumina, 0,3-0,6 g.L⁻¹ de albumina do soro e 0,05-0,2 g.L⁻¹ de lactoferrina (LEIDENS, 2013). Nesse sentido, a concentração de proteínas presente no soro de queijo estava dentro do esperado. A diminuição das proteínas totais presente no soro de queijo hidrolisado (3,3x menor), mostrou-se como um relevante indicativo de que o método empregado cumpriu com a finalidade desejada. Ou seja, converteu as proteínas em aminoácidos e peptídeos

4.3 Determinação da DQO no soro de queijo

Para verificar a quantidade de carga orgânica oxidada presente no soro de queijo, realizou-se a análise da demanda química de oxigênio (DQO) no soro de queijo reconstituído e em seu hidrolisado. A curva padrão construída possibilitou a determinação da equação da reta ($y = 0,335x$) e do R^2 de 0,9986. A partir destes dados foi possível a quantificação da DQO, com o gráfico apresentado na Figura 8. As médias, o desvio padrão (SD) e concentração da DQO em cada reator foram compiladas na Tabela 10.

Figura 8. Concentração da DQO (g/L) nos biorreatores contendo soro de queijo hidrolisado e reconstituído, respectivamente. Os dados foram computados através das médias das triplicatas de cada amostra nos diferentes reatores.



Fonte: própria autoria

Tabela 10. Médias e desvios padrão da quantificação da DQO obtidas de cada biorreator empregando o soro de queijo hidrolisado e reconstituído.

Reatores	Reator	Média	Desv padrão	DQO (g.L) x 10
Soro Hidrolisado (HD)	1	0,3985	0,002111	3,985075
	2	0,4015	0,035883	4,014925
	3	0,2522	0,010554	2,522388
Soro não hidrolisado (NH)	4	0,1881	0,016886	1,880597
	5	0,2552	0,014775	2,552239
	6	0,2642	0,010554	2,641791

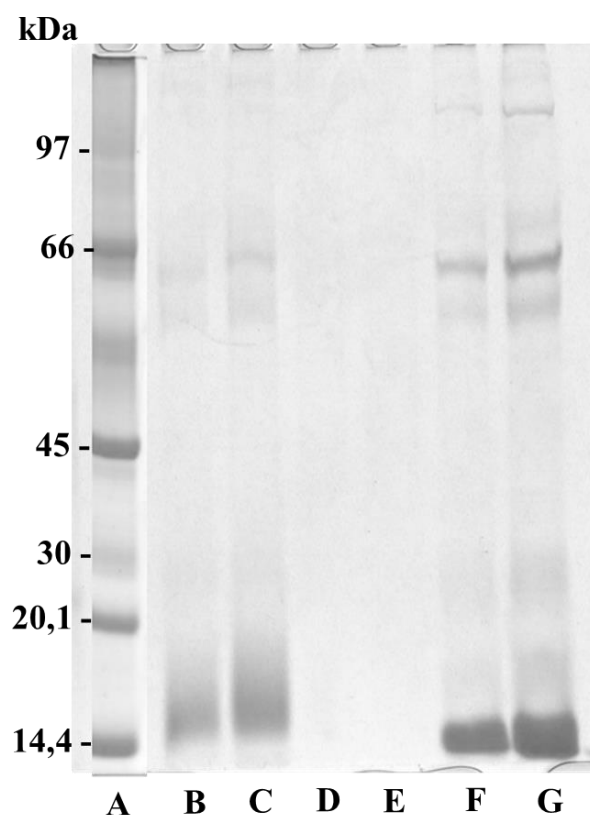
Fonte: própria autoria

Comparando a concentração da DQO obtida para o soro não hidrolisado e hidrolisado, através de análise estatística, determinou-se que o desvio padrão médio entre os reatores ficou em torno de 0,0075. Dessa maneira, demonstra-se que o processo de hidrólise teve pouca interferência na concentração de matéria orgânica disponível para ser oxidada no substrato sem tratamento enzimático e após o tratamento enzimático.

4.4 Verificação dos hidrolisados proteicos pela técnica de *SDS-PAGE*

A Figura 9 apresenta o gel *SDS-PAGE* contendo as proteínas oriundas do soro de queijo bovino reconstituído não hidrolisado e hidrolisado.

Figura 9. SDS-PAGE 12% do soro de queijo bovino: (A) padrão de massa molecular (5 μ L); (B) soro de queijo bovino 1% reconstituído não hidrolisado (15 μ L); (C) soro de queijo bovino 1% reconstituído não hidrolisado (25 μ L); (D) soro de queijo bovino 1% reconstituído hidrolisado com os derivados SM-glioxil-tripsina+ SM-glioxil-alcalase (25 μ L); (F) soro de queijo bovino fluído não hidrolisado (15 μ L); (G) soro de queijo bovino fluído não hidrolisado (25 μ L).



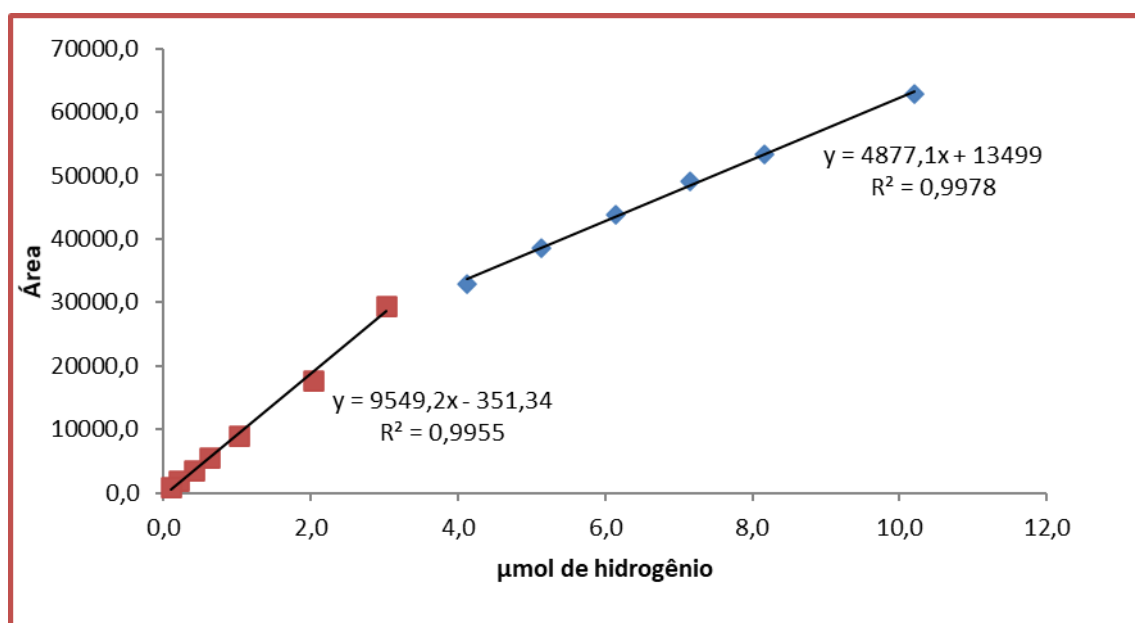
Fonte: própria autoria

Foi possível observar que no soro reconstituído não hidrolisado (colunas B e C), o perfil proteico apresentado foi altamente semelhante com o soro fluído não hidrolisado de um soro bruto (resíduo de laticínio), representado nas colunas F e G. Observa-se que os derivados enzimáticos foram eficientes na hidrólise das proteínas do soro reconstituído, nas quais não foi possível constatar nenhuma banda proteica (colunas D e E). A principal finalidade em hidrolisar as proteínas presentes no soro reconstituído foi fornecer ao consórcio de bactérias uma fonte de nitrogênio mais acessível, diminuindo assim, o gasto energético. Essa estratégia teve como objetivo o aumento do volume e/ou velocidade da produção de biogás utilizando a lactose como principal substrato.

4.5 Produção de biogás

As curvas analíticas construídas para a determinação da concentração de BioH₂ e CH₄ produzidos nos biorreatores são apresentadas nas Figuras 10 e 11, com os valores discriminados nas Tabelas 11 e 12, respectivamente.

Figura 10. Curva analítica de hidrogênio (em μmol). Foram utilizados volumes baixos do biogás para confeccionar a curva de baixa concentração (em vermelho) e mais elevados para obter a curva de alta concentração (em azul).



Fonte: própria autoria

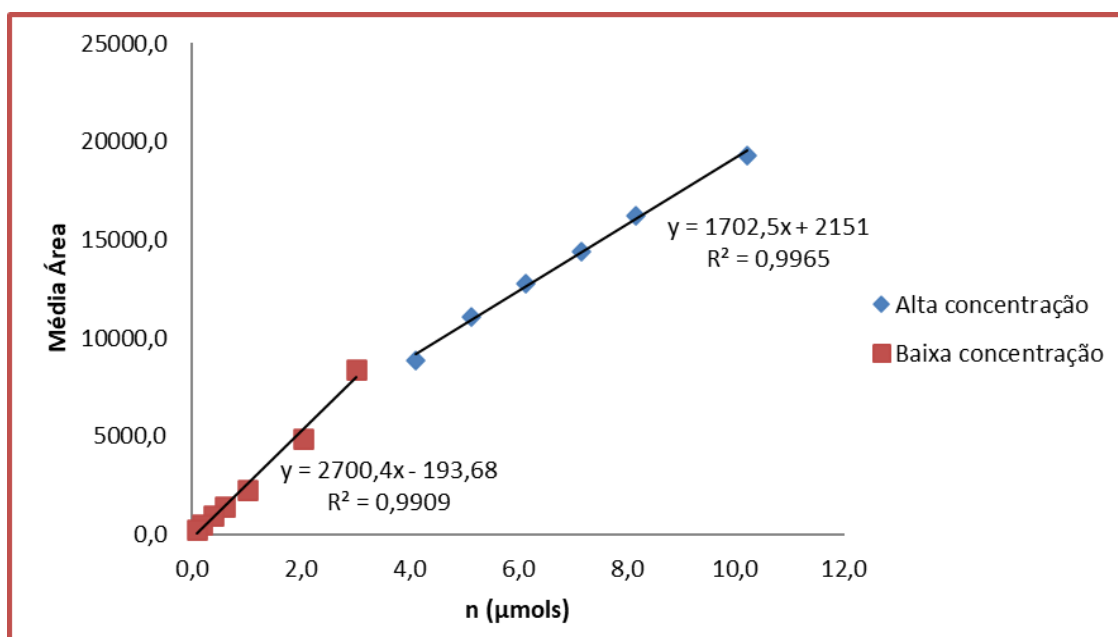
Tabela 11. Dados obtidos do equipamento em cromatógrafo GC-2010 (Shimadzu) durante a injeção de diferentes concentrações de H₂.

Hidrogênio – injeção de concentrações maiores							
Volume (L)	Área 1	Área 2	Área 3	Média das áreas	Desv. Padr.	%desv	n (média em μmols)
0,001	63461,2	64912,4	59954,1	62775,9	2549,2	4,06	10,204
0,0008	52433,6	54969,5	52688,4	53363,8	1396,4	2,62	8,166
0,0007	49849	51037,6	46339,7	49075,4	2442,6	4,98	7,161
0,0006	43362,4	44166,2	44014,2	43847,6	427,0	0,97	6,138
0,0005	38219,5	38627	38909,5	38585,3	346,9	0,90	5,141
0,0004	34090,6	31462,5	33406,8	32986,6	1363,5	4,13	4,124

0,0003	30429,4	30967,4	31020,8	30805,9	327,1	1,06	3,042
Hidrogênio – injeção de concentrações menores							
0,0003	28231,4	31820,2	28618,3	29556,6	1969,8	6,66%	3,032
0,0002	17162,9	17829,8	18450,8	17814,5	644,1	3,62%	2,041
0,0001	9078,9	9249,4	8964,7	9097,7	143,3	1,57%	1,023
0,00006	5491	5485,4	5694,1	5556,8	118,9	2,14%	0,618
0,00004	3746,8	3629,4	3557	3644,4	95,8	2,63%	0,407
0,00002	1906,9	1895,8	1883	1895,2	12,0	0,63%	0,204
0,00001	919,9	912,9	863,2	898,7	30,9	3,44%	0,102

Fonte: própria autoria

Figura 11. Curva analítica de CH₄ (em μmol). Foram utilizados volumes baixos do biogás para confeccionar a curva de baixa concentração (em vermelho) e mais elevados para obter a curva de alta concentração (em azul).



Fonte: própria autoria

Tabela 12. Dados obtidos do equipamento em cromatógrafo GC-2010 (Shimadzu) durante a injeção de diferentes concentrações de CH₄.

Metano – injeção de concentrações maiores							
Volume (L)	Área 1	Área 2	Área 3	Média das áreas	Desv. Pad.	% Desv	n (média em μmols)
0,001	19539,2	19934,3	18471,7	19315,1	756,6	3,92	10,212
0,0008	16163,7	16664,6	15803,4	16210,6	432,5	2,67	8,172
0,0007	14542	14802,9	13935,2	14426,7	445,2	3,09	7,166
0,0006	12660,7	12992	12765	12805,9	169,4	1,32	6,143
0,0005	10992,9	11099,1	11052,1	11048,0	53,2	0,48	5,145
0,0004	8873,7	8316,4	9346,6	8845,6	515,7	5,83	4,127
0,0003	8334,4	8470	8304,2	8369,5	88,3	1,06	3,044
Metano – injeção de concentrações menores							
0,0003	8059,2	9273,1	7809,7	8380,7	782,9	9,34	3,034
0,0002	4621,3	4900,6	5064,8	4862,2	224,2	4,61	2,043
0,0001	2317,5	2347,5	2245,5	2303,5	52,4	2,28	1,024
0,00006	1486,5	1430,9	1465,6	1461,0	28,1	1,92	0,618
0,00004	986,5	966,6	940,9	964,7	22,9	2,37	0,408
0,00002	508,7	507,2	496,8	504,2	6,5	1,29	0,204
0,00001	248,6	237,8	233,5	240,0	7,8	3,24	0,102

Fonte: própria autoria

4.5.1 Monitoramento da produção de BioH₂ e CH₄

Durante o monitoramento da produção de BioH₂ foram coletados 23 pontos para cada um dos 6 reatores monitorados. O tempo inicial refere-se ao momento zero, (ponto 0), enquanto as demais amostras foram coletas nos tempos apresentados nas Tabelas 13 e 14, referentes as dosagens obtidas a partir do soro de queijo hidrolisado e não hidrolisado, respectivamente. Dos 23 pontos analisados, 13 considerados “outliers” porque não apresentaram reposta fisicamente explicável (produção negativa; picos extremos), indicando

um erro de manipulação ou de amostragem. Como as análises foram feitas em triplicata, selecionou-se onze pontos para analisar as curvas (1), (2) e (3) contendo os soros hidrolisados (reatores HD), e 13 pontos para as curvas (4), (5) e (6) contendo os soros não-hidrolisados (reatores NH).

Tabela 13. Produção de BioH₂ empregando soro de queijo hidrolisado. Os dados foram obtidos utilizando o cromatógrafo GC-2010. O tempo (T) foi medido em horas a partir da injeção do primeiro ponto (ponto 0) representado pela amostra 1-HD. A pressão (P) foi representada em milibar e a área (A) foi aquela obtida a partir da análise dos cromatogramas.

Soro de queijo hidrolisado									
R	1			2			3		
Pontos	T(h)	P(mbar)	A(H ₂)	T(h)	P(mbar)	A(H ₂)	T(h)	P(mbar)	A(H ₂)
0	0	61	0	0,15	-15	0	0,27	26	0
1	2,49	77	286,4	2,59	0	163	3,10	36	546,4
2	4,13	103	1070,1	4,25	3	0	4,47	69	1602,2
4	7,55	180	1795,5	8,06	0	112,1	8,20	126	3527
6	12,58	92	4540,6	13,10	11	615	13,25	153	5368,9
8	17,23	165	5572,1	17,33	26	731,7	17,43	134	5829
12	26,29	157	6810,4	26,41	8	2574,2	26,51	38	6808,5
15	30,49	138	6833,5	31	3	2497,5	31,10	30	7128,5
18	38,22	66	6924,4	38,33	-6	1987,9	38,44	14	7530,7
21	47,27	52	7060,4	47,38	0	1805	47,49	8	7403,5
22	48,53	43	7078	49,04	3	1510,6	49,14	6	7296,

Fonte: própria autoria

Tabela 14. Produção de BioH₂ empregando soro de queijo não hidrolisado. Os dados foram obtidos utilizando o cromatógrafo GC-2010. O tempo (T) foi medido em horas a partir da injeção do primeiro ponto (ponto 0) representado pela amostra 1-HD. A pressão (P) foi representada em milibar e a área (A) foi aquela obtida a partir da análise dos cromatogramas.

Soro de queijo não hidrolisado									
R	4			5			6		
Pontos	t(h)	P(mbar)	A(H ₂)	T(h)	P(mbar)	A(H ₂)	T(h)	P(mbar)	A(H ₂)
0	0,38	26	0	0,48	30	0	0,58	11	0
1	3,20	4	114,8	3,31	80	462,2	3,41	42	519,8
2	4,58	50	195,1	5,08	92	114,7	5,25	57	999,1
4	8,31	50	550,9	8,45	95	2149,2	8,57	34	1858,1
6	13,36	99	1869,5	13,53	134	3803,4	14,07	3	3485,2
8	17,53	141	3154,4	18,03	199	5157,9	18,13	95	4926,2
12	27,01	30	5465,8	27,12	234	8235,8	27,23	214	7275
15	31,20	107	6355,4	31,32	114	7190,2	31,42	214	7410,1
18	38,54	43	5464,7	39,05	69	7665,5	39,16	126	7672,4
19	40,19	37	6467,2	40,29	66	7212	40,39	109	7655,6
20	46,25	34	7060,3	46,36	54	8217,6	46,46	106	8366,3
22	49,25	41	5665,6	49,35	49	7843,1	49,45	80	7964,1
23	54,31	20	6111,7	54,42	37	8161,2	54,53	78	6638,4

Fonte: própria autoria

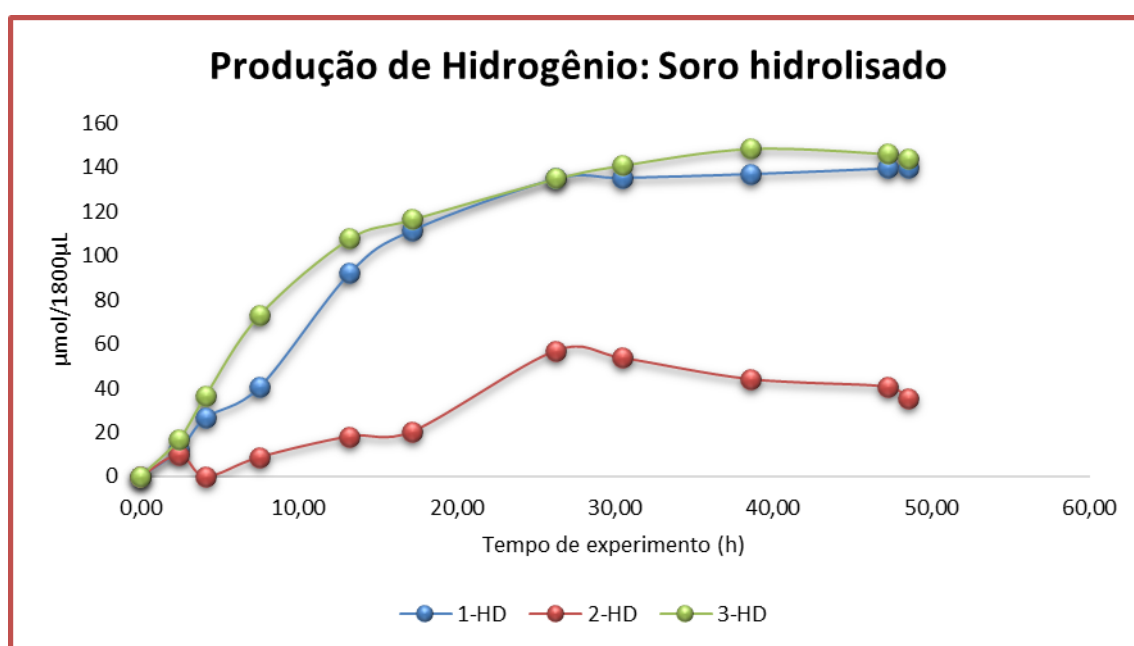
A partir das áreas obtidas nos cromatogramas e a curva de calibração, calculou-se o número de μmols de BioH₂ em 100 μL de cada amostra retirada dos biorreatores. A equação da reta empregada para os cálculos foi aquela derivada da curva de calibração de baixa concentração de H₂, representada na Equação 7, uma vez que as áreas lidas no cromatógrafo não ultrapassaram o valor de 8000, sendo o *cut-off* desta curva de 30.000.

$$y = 9549,2x - 351,34 \quad (\text{Equação 7})$$

Na Figura 12 pode-se observar o perfil de produção em μmols de BioH₂. Para a obtenção do tempo real de produção em cada biorreator, o tempo zero

foi subtraído dos demais pontos para que o primeiro ponto pudesse ser zero e dessa maneira, obter o tempo decorrido real de cada reator. Para determinar quantos μmol de BioH_2 foram produzidos em cada reator, realizou-se o cálculo em relação ao volume de 18.000 microlitros, que representa o volume do *headspace* (Tabela 15).

Figura 12. Desempenho da produção de BioH_2 (em μmol) ao longo do tempo (horas), utilizando o soro de queijo hidrolisado como substrato.



Fonte: própria autoria

Tabela 15. Discretização do tempo em horas e produção de BioH₂ em μmol para 18000 μL de *headspace* dos reatores, utilizando soro de queijo hidrolisado como substrato.

Soro de queijo hidrolisado					
1		2		3	
Tempo (h)	$\mu\text{mol}/1800\mu\text{L}$	Tempo (h)	$\mu\text{mol}/1800\mu\text{L}$	Tempo (h)	$\mu\text{mol}/1800\mu\text{L}$
0	0	0	0	0	0
2,49	12,024	2,44	9,6948	2,43	16,9218
4,13	26,793	4,1	0	4,2	36,81
7,55	40,464	7,51	8,7354	7,53	73,098
12,58	92,214	14,55	18,216	12,58	107,82
17,23	111,654	17,18	20,412	17,16	116,496
26,29	134,996	26,26	57,024	26,24	134,964
30,49	135,432	30,45	53,694	30,43	140,994
38,22	137,142	38,18	44,0946	39,17	148,572
47,27	139,716	47,23	40,644	47,22	146,178
48,53	140,04	48,49	35,0964	48,47	144,162

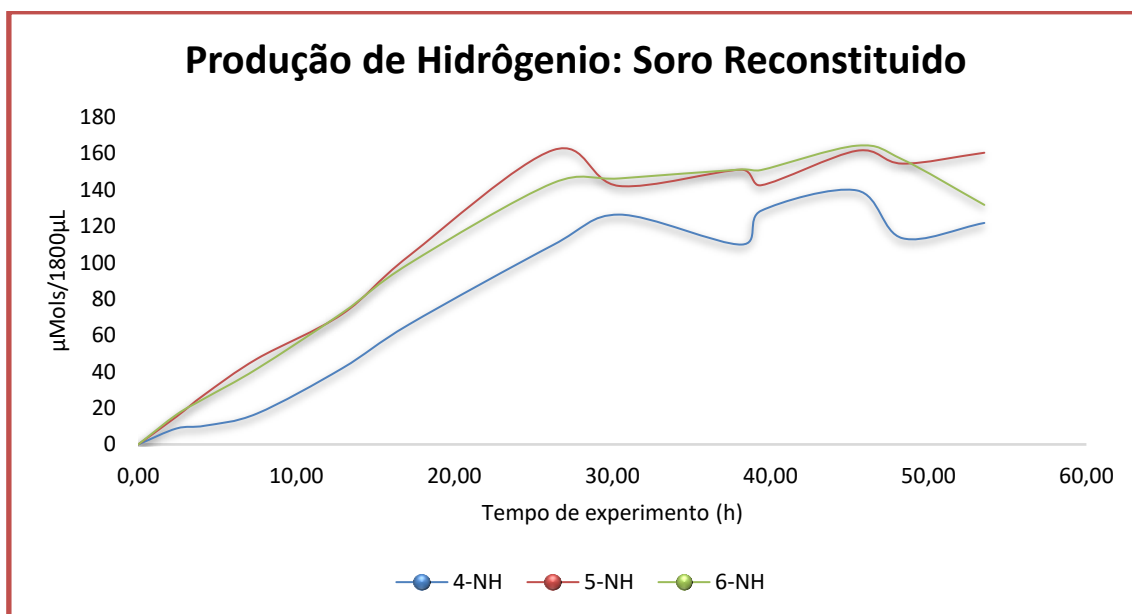
Fonte: própria autoria

No reator 1 observamos um perfil sigmoide conforme descrito por Mockaitis *et al.* (2020). O início da fase exponencial da produção de BioH₂, iniciou-se após 25 horas de monitoramento. Posteriormente, observou-se um patamar de estabilidade (30h e 46 min) que tem correlação com a completa conversão das fontes de carbono e o consumo dos nutrientes presentes no meio. Entretanto no reator 2, não constatamos a mesma curva sigmoide. Analisando a pressão do sistema e as áreas obtidas nas análises das amostras coletadas deste biorreator, concluímos que houve um vazamento do biogás durante o seu monitoramento. As amostras oriundas deste segundo biorreator não foram consideradas adequadas para avaliar a efetividade na produção de BioH₂. Já para o terceiro biorreator, observou-se a formação da curva

sigmoide, porém com um volume ligeiramente menor de BioH₂ produzida em relação ao Reator 1.

Dando continuidade na análise dos dados, a Figura 13 demonstra o perfil de produção de BioH₂ utilizando como substrato o soro de queijo reconstituído. A Tabela 16 traz os valores obtidos para cada biorreator empregado durante a produção do mesmo.

Figura 13. Desempenho da produção de BioH₂ (em μmol) ao longo do tempo (horas), utilizando o soro de queijo reconstituído como substrato.



Fonte: própria autoria

Tabela 16. Discretização do tempo em horas e produção de BioH₂ em μmol para 18000 μL de *headspace* dos reatores, utilizando soro de queijo reconstituído como substrato.

Soro de queijo não hidrolisado					
4		5		6	
Tempo(h)	$\mu\text{mols}/1800\mu\text{L}$	Tempo(h)	$\mu\text{mol}/1800\mu\text{L}$	Tempo(h)	$\mu\text{mol}/1800\mu\text{L}$
0	0	0	0	0	0
2,42	8,784	2,43	15,336	2,43	16,416
4,2	10,296	4,2	27,63	4,27	25,452
7,53	17,01	7,45	47,142	7,59	41,652
12,58	41,868	13,05	71,694	13,09	72,324
17,15	66,078	17,15	103,842	17,15	99,468
26,23	109,656	26,24	161,874	26,25	143,766
30,42	126,414	30,44	142,164	30,44	146,304
38,16	109,938	38,17	151,11	38,18	151,254
39,41	128,52	39,41	142,56	39,41	150,93
45,47	139,716	45,48	161,544	45,48	164,322
48,27	113,418	48,35	154,458	48,47	156,744
53,53	121,824	53,54	160,452	53,55	131,7546

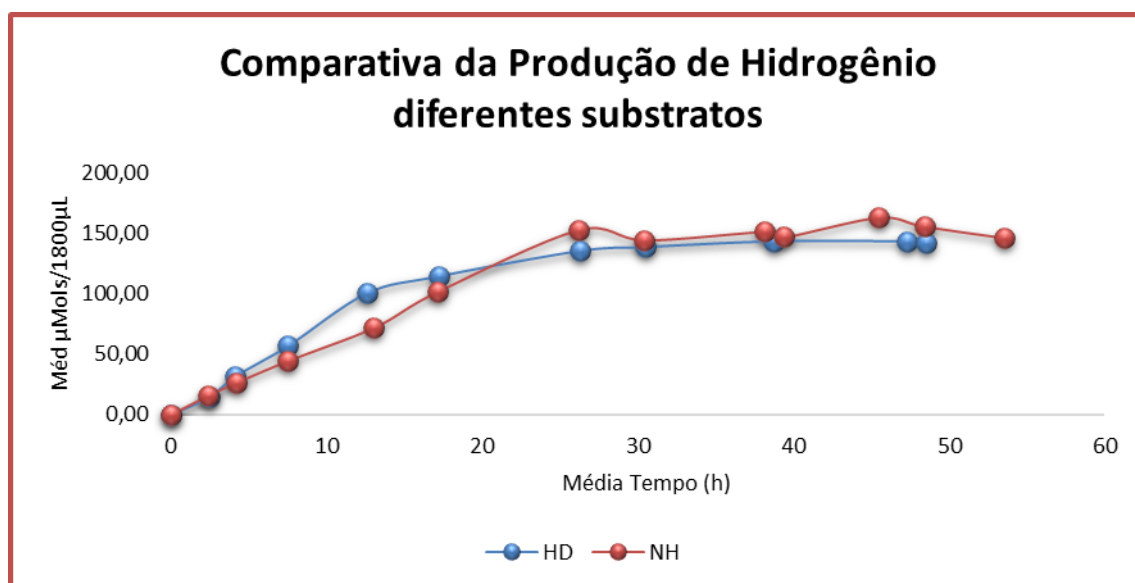
Fonte: própria autoria

No reator 4 observou-se um perfil sigmoide da curva na fase exponencial da produção, porém o patamar de estabilidade é bastante instável quando comparado ao patamar dos reatores utilizando o soro hidrolisado. A quantidade de produção em μmols também foi menor em relação aos outros reatores, o que indica uma menor eficiência do processo, atingindo um pico de aproximadamente 140 μmols de BioH₂. Por meio da avaliação do comportamento de produção no reator 5, foi possível perceber uma maior velocidade de produção, porém o patamar não ficou totalmente definido e também foi instável. O reator 6 apresentou um perfil com uma melhor estabilidade comparada com os dois anteriores, embora a quantidade de BioH₂ produzida também tenha se equiparado com os demais reatores, atingindo um

pico de produção em aproximadamente 45 horas de operação e produzindo uma média de 165 μmol s de BioH_2 .

Para a construção de uma análise comparativa entre os três primeiros reatores em relação aos três últimos, desconsiderou-se as amostras coletadas do reator 2 e do reator 4. Uma das hipóteses para essa discrepância na produção constatada no reator 4 pode estar relacionada com a possível contaminação do reator, devido à baixa produção de biogás. Através da análise em Excel, calculou-se as médias do tempo e da produção em μmol s de BioH_2 para os reatores contendo os soros hidrolisados e reconstituído. A Figura 14 traz a análise comparativa entre os dois primeiros (reatores 1 e 3) e os dois últimos (reatores 5 e 6). A Tabela 17 traz os valores computados do tempo e da produção em μmol s.

Figura 14. Comparativa temporal da produção de hidrogênio, em $\mu\text{mol/h}$, utilizando os diferentes substratos, soro hidrolisado ("HD" em azul) e soro reconstituído ("NH" em vermelho).



Fonte: própria autoria

Ao analisar o gráfico de produção empregando soro de queijo hidrolisado (HD), verificamos que o início da produção de BioH_2 foi mais rápida (menos de 30h de monitoramento). Essa observação é baseada na maior inclinação da curva, demonstrando que a produção de fato se iniciou mais precocemente e conseqüentemente atingiu um patamar de estabilidade entre

as 20/30h de produção, com uma queda após 40h, provavelmente devido à falta de nutrientes, que foram consumidos pelo consórcio microbiano. Esse perfil de produção é resultado da hidrólise das proteínas presentes no soro, facilitando a digestão e metabolização dos substratos por parte dos microrganismos (MOCKAITIS *et al.*, 2020).

Na produção de BioH₂ utilizando o soro de leite reconstituído, observou-se que a produção se iniciou mais tardiamente (após 30h de monitoramento) e consequentemente, também apresentou uma duração maior de sua fase exponencial. Entretanto, a estabilidade desta produção não foi muito bem definida. Esse perfil de produção se deve a presença de dissacarídeos no soro não hidrolisado, que requer a ativação de rotas metabólicas adicionais, incluindo a hidrólise para que a metabolização dos substratos ocorra. Dessa maneira, há uma variação na disponibilidade de nutrientes no meio e o atraso para iniciar a produção do biogás.

Tabela 17. Valores obtidos da produção de BioH₂ empregando os dois substratos propostos. Para obter tais valores, foi calculada a média dos dados obtidos dos reatores 1 e 3 (substrato soro hidrolisado) e 5 e 6 (substrato do soro reconstituído). Foram desconsiderados os dados das amostras 2 e 4.

Tempo de produção com soro hidrolisado (horas)	Hidrogênio produzido com soro hidrolisado (μmols)	Tempo de produção com soro reconstituído (h)	Hidrogênio produzido com soro não reconstituído (μmols)	Desvio Padrão do volume de hidrogênio gerado
0	0	0	0	0,00
2,46	14,4729	2,43	15,873	0,99
4,17	31,8015	4,24	26,541	3,72
7,54	56,781	7,52	44,397	8,76
12,58	100,017	13,07	72,009	19,80
17,2	114,075	17,15	101,655	8,78
26,27	134,98	26,245	152,82	12,61
30,46	138,213	30,44	144,234	4,26
39,1	142,857	38,18	151,182	5,89
47,25	142,947	39,41	146,745	2,69
48,50	142,101	45,48	162,933	14,73
-	-	48,41	155,601	-
-	-	53,55	146,1033	-

Fonte: própria autoria

A partir da determinação dos desvios padrão de cada ponto, obteve-se o desvio padrão médio de $\pm 4,97$ entre os reatores contendo os dois diferentes substratos. Esse valor sugere que houve uma diferença na quantidade de μmols de BioH₂ produzida, porém não tão significativa quanto o esperado. Ambos apresentaram quantidades de BioH₂ bastante semelhantes, embora o uso de soro sem hidrólise superou em volume, mas não em velocidade de produção de H₂ aquele submetido ao tratamento.

Tratando-se da produção do gás metano, foram coletados 39 pontos durante o monitoramento de 192 h. Como o reator 1 foi o primeiro a ser

analisado, determinou-se que ele seria o ponto de partida do experimento e, portanto, o tempo inicial. As amostras subsequentes foram injetadas no cromatógrafo assim que a leitura da anterior foi finalizada. Para a obtenção do número de μmols de CH_4 em $100\mu\text{L}$ de volume coletados em cada ponto, utilizou-se a curva de calibração de baixa concentração, assim como foi feito para o BioH_2 , uma vez que o *cut-off* dessa curva foi de 8.380,7 e, no experimento, não se obteve área maior que 8.000. A equação da reta (Equação 8) serviu para a realização dos cálculos:

$$y = 2700,4x - 193,68 \text{ (Equação 8)}$$

Os valores da concentração em μmols de CH_4 para cada ponto obtido durante o monitoramento de sua produção são apresentados na Tabela 18. Para a obtenção do tempo real de produção em cada biorreator, o tempo zero foi subtraído dos demais pontos para que o primeiro ponto pudesse ser zero e dessa maneira, obter o tempo decorrido real de cada reator. A determinação da concentração de CH_4 obtida em cada reator, levou em consideração o volume de 18.000 microlitros, representada pelo volume do *headspace* (Tabela 19).

Tabela 18. Produção de CH₄ empregando metabólitos do soro de queijo hidrolisado. Os dados foram obtidos utilizando o cromatógrafo GC-2010. O tempo (T) foi medido em horas a partir da injeção do primeiro ponto (ponto 0). A pressão (P) foi representada em milibar e a área (A) foi aquela obtida a partir da análise dos cromatogramas.

1				2			3		
Ponto	T (h)	P (mbar)	A (CH ₄)	T (h)	P (mbar)	A (CH ₄)	T (h)	P (mbar)	A (CH ₄)
0	0	22	0	0,52	22	0	0,64	14	0
1	3,5	168	417,8	3,6	119	366,5	3,71	1,68	472,7
2	6,5	299	1148,5	6,61	99	1122,6	6,74	165	1256,6
3	13,8	441	2479	13,9	165	2601,6	14	199	2622,9
6	22,77	456	2901,7	22,87	256	3407,1	22,99	180	3425,2
9	29	425	3426	29,5	268	3592,6	29,6	153	3872,2
11	34,95	367	3831,6	35,05	42	3990,9	35,57	207	4337,1
12	45,86	536	4457,7	45,95	15	4554,8	46,06	387	4842,9
14	50,59	456	4687,4	50,71	11	4876,6	50,82	303	5222,2
16	54,89	372	4856,5	54,99	23	4856,5	55,5	279	5479,7
18	59,54	372	5094,2	59,66	19	5301,7	59,78	295	5770,4
19	69,63	421	5353,9	69,83	11	5317,5	69,94	456	6054,8
27	81,76	264	5966,8	81,86	8	5181,4	81,99	95	6207,7
29	108,8	494	6488	108,9	126	4910	109	126	6984,2
34	151,5	525	6490,1	151,6	103	5503,2	151,7	410	6894
35	165,63	571	6402,3	165,75	191	5923,1	165,88	471	7243,3
37	173,6	502	6711,7	173,7	183	5849,7	173,8	429	7325,4
38	190,78	559	6930,8	190,89	268	6473,7	190,99	456	7458

Fonte: própria autoria

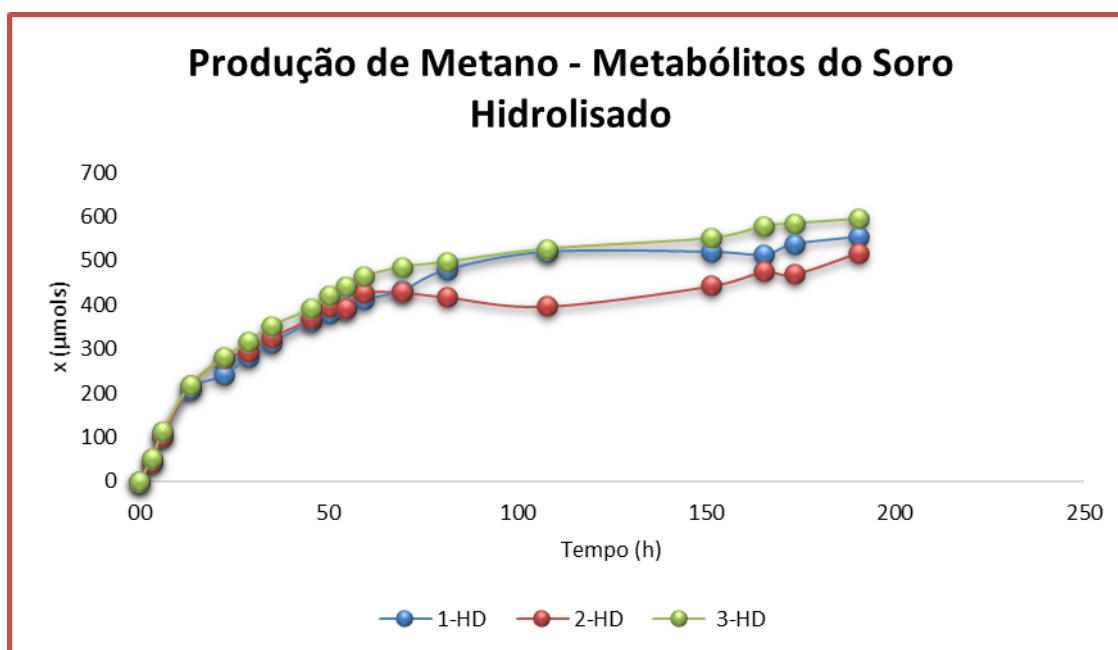
Tabela 19. Discretização do tempo (em horas) e produção de CH₄ (em µmol) para os reatores onde foi utilizado metabólitos do soro de queijo hidrolisado como substratos.

Metabólitos do soro de queijo hidrolisado					
1		2		3	
T (h)	x (µmol)	T (h)	x (µmol)	T (h)	x (µmol)
0	0	0	0	0	0
3,5	47,5525	3,08	43,5631	3,07	51,8219
6,5	104,376	6,09	102,362	6,1	112,783
13,8	207,844	13,38	217,378	13,36	219,035
22,77	240,716	22,35	280,019	22,35	281,427
29	281,489	28,98	294,445	28,96	316,188
34,95	313,031	34,53	325,419	34,93	352,342
45,86	361,72	45,43	369,272	45,42	391,676
50,59	379,583	50,19	394,297	50,18	421,173
54,89	392,734	54,47	392,734	54,86	441,198
59,54	411,219	59,14	427,355	59,14	463,804
69,63	431,415	69,31	428,584	69,3	485,921
81,76	479,077	81,34	418	81,35	497,811
108,8	519,609	108,38	396,894	106,06	526,935
151,5	519,773	151,08	443,025	151,06	551,182
165,63	512,945	165,23	475,679	165,24	578,346
173,6	537,006	173,18	469,971	173,16	584,731
190,78	554,044	190,37	518,497	190,35	595,043

Fonte: própria autoria

Na Figura 15 é apresentado o gráfico de produção do gás metano utilizando metabólitos oriundos do soro de queijo hidrolisado durante as 192h de monitoramento.

Figura 15. Desempenho da produção de CH_4 (em μmol) durante o tempo de monitoramento (em horas), utilizando metabólitos oriundos do soro de queijo hidrolisado como substratos, reatores 1, 2 e 3.



Fonte: própria autoria

Em relação ao primeiro reator, foi constatada a presença de uma curva sigmoide bem definida durante a fase exponencial. No entanto, a fase estacionária não exibiu um patamar de estabilidade. Acredita-se que tenham ocorrido erros durante a coleta das amostras, uma vez que houve revezamento dos analistas durante as 192h de monitoramento do experimento. Já para o segundo reator, pode-se visualizar a não formação de uma curva sigmoide. A justificativa mais plausível seria um vazamento de gás que está de acordo com as medidas de pressão apresentadas na Tabela 18, onde em dado momento a pressão despencou, indicando um escape do gás pelo septo de borracha. Em contrapartida, o reator 3 apresentou uma curva sigmoide bem definida na fase log, embora a fase estacionária também tenha ficado mal definida devido à instabilidade da mesma.

A Tabela 20 traz os valores discriminados de cada ponto obtido dos reatores 4, 5 e 6, para os quais foram utilizados metabólitos oriundos do soro de queijo não hidrolisado como biomassa na produção do gás metano. A Tabela 21 traz os valores obtidos em relação aos 18.000 microlitos correspondentes ao volume do *headspace*.

Tabela 20. Produção de CH₄ empregando metabólitos do soro de queijo não hidrolisado. Os dados foram obtidos utilizando o cromatógrafo GC-2010. O tempo (T) foi medido em horas a partir da injeção do primeiro ponto (ponto 0). A pressão (P) foi representada em milibar e a área (A) foi aquela obtida a partir da análise dos cromatogramas.

R		4			5		6		
Ponto	t (h)	P (mbar)	A (CH ₄)	T (h)	P (mbar)	A (CH ₄)	t (h)	P (mbar)	A (CH ₄)
0	0,75	10	0	0,87	37	0	0,97	18	0
1	3,84	3	666,2	3,98	226	554,4	4,09	191	604
2	6,86	53	1550,1	7,02	26	1517,4	7,54	321	1388,7
5	20,93	210	3591,9	21,03	483	3109,9	21,55	444	2942,9
6	23,09	230	3756	23,59	463	3318,4	23,69	433	3061
8	27,65	249	4101,7	27,75	441	3526,4	27,86	417	3353,3
11	35,67	287	4670,4	35,77	410	4095,1	35,88	367	3563,9
13	48,76	410	5228,5	48,87	452	4634,9	48,98	478	5012,5
17	56,87	321	5392,1	56,97	333	4900,5	57,07	367	4894,5
22	74,74	306	5907,5	74,86	80	5197,7	74,98	306	5325
26	80,83	80	6203,6	80,94	80	5266,9	81,04	222	5275,9
28	96,3	333	6524,4	96,4	172	5830,3	96,5	276	5813,5
29	109,5	399	6643,1	109,6	268	6479,9	109,7	299	5907
31	131,7	487	6887,2	131,8	372	6464,7	131,9	402	6110,5
35	166,0 1	552	7143,2	166,53	483	6815,6	166,64	475	6705
37	173,9	502	7136,7	174	452	6979,1	174,5	379	6664,7
38	191,5	583	7108,1	191,6	547	7221	191,7	452	6682,7

Fonte: própria autoria

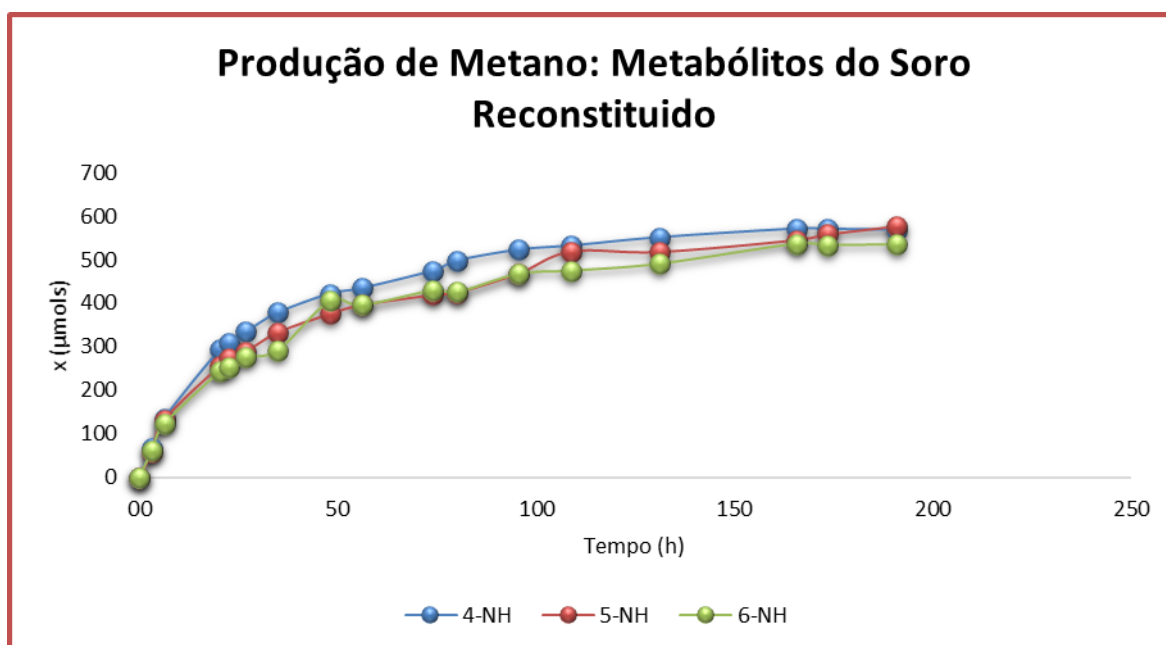
Tabela 21. Discretização do tempo e produção de CH₄ (em µmols) para os reatores onde foi utilizado metabólitos do soro de queijo reconstituído como substrato.

Metabólitos do soro de queijo reconstituído					
4		5		6	
T (h)	x (µmols)	T (h)	x (µmols)	T (h)	x (µmols)
0	0	0	0	0	0
3,09	66,8697	3,11	58,1754	3,12	62,0326
6,11	135,607	6,15	133,064	6,57	123,056
20,18	294,39	20,16	256,907	20,58	243,92
22,34	307,152	22,72	273,121	22,72	253,104
26,9	334,036	26,88	289,297	26,89	275,835
34,92	378,261	34,9	333,522	34,91	292,213
48,01	421,663	48	375,501	48,01	404,865
56,12	434,385	56,1	396,155	56,1	395,689
73,99	474,466	73,99	419,267	74,01	429,167
80,08	497,493	80,07	424,649	80,07	425,349
95,55	522,44	95,53	468,462	95,53	467,156
108,75	531,671	108,73	518,979	108,73	474,427
130,95	550,654	130,93	517,797	130,93	490,253
165,26	570,562	165,66	545,086	165,67	536,485
173,15	570,056	173,13	557,8	173,53	533,351
190,75	567,832	190,73	576,612	190,73	534,75

Fonte: própria autoria

Na Figura 16, foi apresentado o gráfico de produção do gás metano utilizando metabólitos oriundos do soro de queijo sem hidrólise durante as 192h de monitoramento.

Figura 16. Desempenho da produção de CH_4 em μmol durante o tempo de monitoramento (em horas), utilizando metabólitos oriundos do soro de queijo reconstituído como substratos, reatores 4, 5 e 6.



Fonte: própria autoria

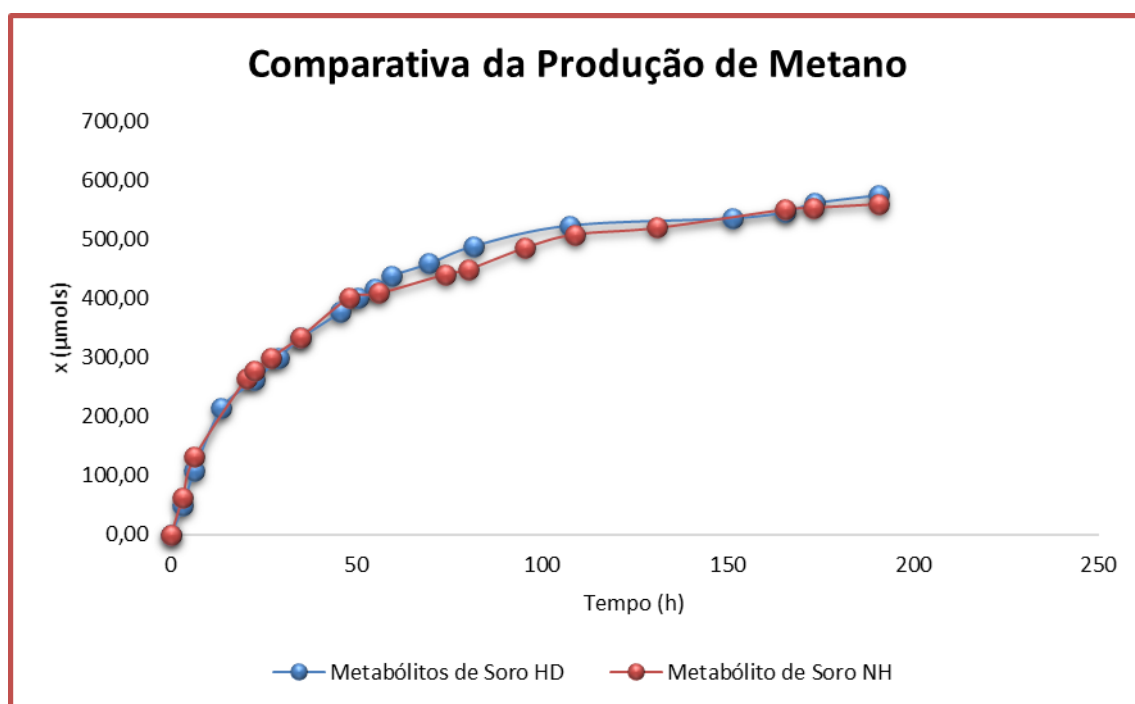
Como pode se observar na Figura 16, o reator 4 apresentou uma curva muito próxima a curva sigmoide, tendo as fases exponencial e estacionária bem definidas, diferindo do que ocorreu no reator 5, onde não foi constatada uma curva definida, com uma menor velocidade de produção e uma fase estacionária quase inexistente. Em relação ao reator 6, este apresentou um comportamento próximo ao reportado pela literatura. Dessa forma, comparando os reatores 4, 5 e 6 com os reatores 1 e 3, pode-se notar que no reator 3, que utilizou o substrato hidrolisado, obteve-se uma produção de metano ligeiramente maior que os demais.

Em relação a velocidade de formação de gás metano, levando em consideração o ponto de 50 horas como ponto de comparação, percebe-se que todos os reatores apresentaram uma concentração de metano de aproximadamente 400 μmols . Esses dados demonstram que o uso de metabólitos derivados da produção de BioH_2 utilizando soro hidrolisado e não-hidrolisado, não influenciaram na concentração de metano. Porém, o uso dos metabólitos derivados do soro não hidrolisado acarretou em um aumento do tempo necessário para que os microrganismos entrassem em fase

estacionária, quando comparado com os reatores onde foram utilizados os metabólitos do soro hidrolisado. Novamente, esse comportamento pode ser explicado pela indisponibilidade de nutrientes hidrolisados, ou seja, com uma absorção e metabolização mais lenta. Os microrganismos tendem a gastar mais tempo e energia durante o processo de metabolização, resultando assim em um maior tempo necessário para a formação do produto de interesse. Este fator também é uma explicação plausível sobre a produtividade ligeiramente maior no reator 3. Neste caso, os microrganismos absorveram mais facilmente os nutrientes disponíveis, maximizando a produção do biogás.

A Figura 17 traz a análise comparativa entre os três primeiros reatores e os três últimos empregados para a produção do gás metano.

Figura 17. Perfil temporal da produção de CH_4 em $\mu\text{mol/h}$, nos reatores operando com metabólitos oriundos do soro hidrolisado (em azul) daqueles que operaram utilizando metabólitos oriundos do soro reconstituído (em vermelho).



Fonte: própria autoria

Analisando a Figura 17, pode-se verificar que os dois tipos de substratos empregados durante a produção de CH_4 , levaram a recuperação energética, não havendo diferenças significativas entre as quantidades de μmol s

produzidos pelos biorreatores, uma vez que ambos atingiram picos médios de produção acima de 550 μmols .

Entretanto, quando avaliamos o quesito tempo de produção, observou-se que o início da utilização do substrato não hidrolisado é mais tardio, conforme já relatado para a produção de BioH_2 . Além disso, apesar dos reatores 4 a 6 utilizarem substratos do soro não hidrolisado, é importante frisar que estes substratos foram oriundos da biodigestão dos microrganismos do biorreator metanogênico da produção de BioH_2 . Dessa maneira, estes metabólitos ficam mais acessíveis para serem consumidos pelo consórcio microbiano responsável por produzir gás metano. Nesse sentido, essa seria a razão para que as produções de CH_4 por parte do consumo dos dois diferentes substratos tenham sido tão similares. A Tabela 22 traz os valores computados do tempo e da produção em μmols de gás metano, a partir da análise comparativa entre os diferentes reatores.

Tabela 22. Média da produção de CH_4 empregando as médias finais das amostras oriundas dos reatores que continham metabólitos derivados do soro hidrolisado e dos reatores que continham metabólitos derivados do soro não hidrolisado.

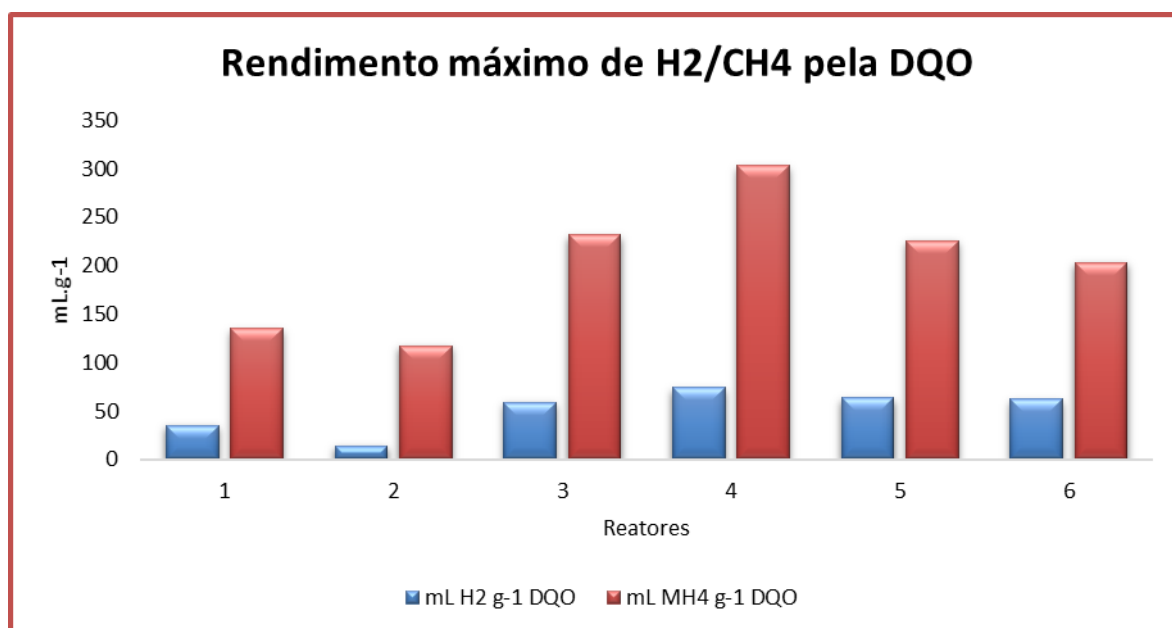
Metabólitos do soro hidrolisado		Metabólitos do soro não hidrolisado		Desvio padrão
T (h)	x média (μmols)	T (h)	x média (μmols)	
0	0	0	0	0,00
3,22	47,65	3,11	62,36	10,40
6,23	106,51	6,28	130,58	17,02
13,51	214,75	20,31	265,07	35,58
22,49	267,39	22,59	277,79	7,36
28,98	297,37	26,89	299,72	1,66
34,80	330,26	34,91	334,67	3,11
45,57	374,22	48,01	400,68	18,71
50,32	398,35	56,11	408,74	7,35
54,74	408,89	74,00	440,97	22,68
59,27	434,13	80,07	449,16	10,63
69,41	448,64	95,54	486,02	26,43
81,48	464,96	108,74	508,36	30,69
107,75	481,15	130,94	519,57	27,17
151,21	504,66	165,53	550,71	32,56
165,37	522,32	173,27	553,74	22,21
173,31	530,57	190,74	559,73	20,62
190,5	555,86128	-	-	-

Fonte: própria autoria

Para calcular o desvio padrão médio entre os substratos, utilizou-se a mesma dinâmica da comparativa da produção de BioH_2 , obtendo um desvio médio de $\pm 9,518$. Portanto, há uma diferença maior no rendimento quando os metabólitos do soro sem hidrólise foram usados como substrato, mesmo que a fase estacionária não tenha demonstrado uma estabilidade significativa, onde a quantidade de CH_4 produzida se equiparou para ambos os substratos empregados.

Visando avaliar a efetividade do rendimento de produção de BioH_2 e CH_4 , calculou-se o rendimento de produção do biogás de acordo com a DQO disponível em cada biorreator (Figura 18).

Figura 18. Avaliação do rendimento máximo de BioH_2 e CH_4 (em mL.g^{-1} DQO). Os valores foram obtidos através das medidas de produção por grama de DQO de todos os biorreatores empregados na produção do biogás com seus respectivos substratos. Os indicadores em azul ilustram a produção de hidrogênio/DQO e os em vermelho a produção de metano/DQO.



Fonte: própria autoria

Concluimos que os biorreatores que continham como substratos o soro de queijo reconstituído e seus metabólitos, foram mais favoráveis para a obtenção de um rendimento maior do biogás, inferindo assim, que a etapa de pré-tratamento enzimático poderia ser removida do processo sem causar maiores alterações. Vale destacar que a etapa de hidrólise faz uso de enzimas imobilizadas, que resultam no encarecimento do processo. No entanto, a

exclusão do pré-tratamento do substrato, não se aplica a todas as rotas de fermentação, onde a hidrólise pode ser uma etapa primordial dependendo do substrato utilizado e do modo de produção empregado.

O rendimento máximo obtido tanto para o BioH₂ (74,29 mL.g⁻¹) quanto para o CH₄ (303,12 mL.g⁻¹) foi alcançado no biorreator 4 para ambos os casos, respectivamente. Peixoto *et al.*, (2012) constatou bons rendimentos durante a produção de hidrogênio e gás metano, utilizando a vinhaça como biomassa, com uma produção de 20,8 mL.g⁻¹ e 255,4 mL.g⁻¹, respectivamente. A produção de metano foi semelhante àquela obtida no presente trabalho, enquanto para a produção de H₂, o soro do queijo mostrou-se como um substrato mais vantajoso, favorecendo uma produção aumentada em relação a vinhaça. No entanto, no estudo de Fernandes e colaboradores (2010), o biorreator de leito empacotado contendo vinhaça como principal biomassa, garantiu uma produção de 579 mL.g⁻¹ de BioH₂. Em suma, nota-se que há grande potencial para a produção de biogás utilizando resíduos industriais e que o rendimento final e otimização do processo está diretamente correlacionado com as diferentes geometrias dos biorreatores e dos meios nutrientes empregados durante a produção.

5. CONCLUSÕES

O emprego de fontes de energia limpa e renováveis vem sendo discutido há muitos anos como potenciais substitutos, ou complementares da energia derivada de combustíveis fósseis. A dependência do Brasil pelas fontes tradicionais, como energia hidrelétrica, levou o país a enfrentar graves crises energéticas nos últimos anos, acirrando a busca por fontes alternativas. Neste contexto, os resíduos industriais se apresentam como atrativos substratos para a geração de energia, diante do elevado teor de matéria orgânica presente nestes resíduos.

O soro de queijo empregado como substrato neste trabalho foi avaliado quanto a sua capacidade de geração de biogás (hidrogênio e metano) em reatores com capacidade máxima de 38 mL, operando a 150 rpm e temperatura de 37°C. Para tal, tanto o soro de queijo reconstituído, quanto o

que passou pelo processo de hidrólise foram investigados. No processo de caracterização do soro reconstituído e hidrolisado, foram encontradas concentrações de 0,089 $\mu\text{mol/mL}$ e 0,064 $\mu\text{mol/mL}$ de lactose, respectivamente, divergindo da literatura. Os resultados obtidos da análise do teor proteico foram de 3,42 mg/mL e 1,03 mg/mL para ambos os soros reconstituído e hidrolisado, que esteve dentro do esperado, demonstrando que o processo de hidrólise foi eficiente. As DQOs médias foram de 0,351 g.L^{-1} e 0,236 g.L^{-1} com desvio padrão médio de 0,081, demonstrando que o processo de hidrólise teve pouca interferência na matéria orgânica disponível.

Tratando-se da obtenção de biogás, observou-se que a produção com o soro de queijo reconstituído é mais tardia e obteve um rendimento máximo de 74,29 mL.g^{-1} para o BioH_2 e de 303,12 mL.g^{-1} para o CH_4 . Quando se compara a produção de metano com os resultados obtidos por Peixoto *et al.* (2012) verifica-se uma semelhança nos perfis de produtividade, porém para a produção de hidrogênio, o soro de queijo alcançou maiores rendimentos. Na comparativa utilizando o substrato hidrolisado, alcança-se um rendimento máximo de 58,90 mL.g^{-1} para o BioH_2 e de 231,81 mL.g^{-1} para o CH_4 , presumindo que a etapa de pré-tratamento enzimático não maximizou a produtividade do biogás, podendo assim, ser excluída nos processos posteriores. No presente trabalho, o monitoramento de ácidos graxos voláteis (AGV's) foi desconsiderado devido à falta de padrões nos equipamentos para executar essa análise, porém é conhecido que estes subprodutos podem ser um fator limitante na produção de biogás. Em suma, nota-se que há grande potencial para a produção de biogás utilizando resíduos industriais derivados do processamento do queijo, incluindo o soro de queijo, e que ainda existem muitos parâmetros a serem otimizados, visando a obtenção de maiores rendimentos na produção de biogás, incluindo o uso de diferentes biorreatores, alterações no modo de operação e sobretudo, a investigação do uso de diferentes substratos combinados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, Keila Emílio de; BONASSI, Ismael Antonio; ROÇA, Roberto de Oliveira. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal. **Food Science and Technology**, v. 21, p. 187-192, 2001.

ALVARADO-CUEVAS, Z.D.; ACEVEDO, L.G.O.; SALAS, J.T.O.; RODRÍGUEZ, A.L. Nitrogen sources impact hydrogen production by *Escherichia coli* using cheese whey as substrate. **New Biotechnology**, v.30, p. 585-590, 2013.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard methods for the examination of waste and wastewater**. 19th ed. Washington, D.C., 1998.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO (ABIQ). **Mercado global de queijos bate recorde em 2019**. São Paulo: ABIQ, 5 ago. 2021. Disponível em: https://www.abiq.com.br/noticias_ler.asp?codigo=2373&codigo_categoria=6&codigo_subcategoria=5. Acesso em: 17 dez. 2021.

BORGES, F. Q. Crise de energia elétrica no Brasil: uma breve reflexão sobre a dinâmica de duas origens e resultados. **RECIMA21-Revista Científica Multidisciplinar**, v. 2, p. e210809-e210809, 2021.

CRUZ, C. Z. P. **Imobilização de alcalase em pó de sabugo de milho: hidrólise das proteínas do soro de queijo bovino e obtenção de peptídeos bioativos**. 106 f. Tese (Doutorado) Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Estadual Paulista. Araraquara/SP, 2017.

DA SILVA, Inara Amoroso. Hidrogênio: Combustível do Futuro. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 20, pp. 122-126, 2016.

DUARTE, K. L. S. **Interferências das condições ambientais e operacionais nas concentrações de biogás em biorreatores de bancada com resíduos**

sólidos. 2014. 135 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental, Centro de Tecnologia e Recursos Naturais. Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, Paraíba, 2014.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA (EPE). **Atlas de Eficiência Energética Brasil 2020**: Relatório de Indicadores. Disponível em: <<https://www.epe.gov.br/pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/atlas-da-eficiencia-energetica-brasil-2020>>. Acesso em Ago/2021.

FERNANDES, B. S.; PEIXOTO, G.; ALBRECHT, F. R.; AGUILA, N. K. S. ZAIAT, M. Potential to produce biohydrogen from various wastewaters. **Energy for Sustainable Development**, v. 14, p. 143-148, 2010.

FERNÁNDEZ, C.; CUETOS, M. J.; MARTÍNEZ, E. J.; GÓMEZ, X. Thermophilic anaerobic digestion of cheese whey: Coupling H₂ and CH₄ production. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 55-62, 2015.

HALLENBECK, P. C. Fundamentals of biohydrogen. In: **Biohydrogen**. Elsevier, 2013. Chapter 2, p. 25-43. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59555-3.00002-7>.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**. v. 2, p. 422-427, 1972.

INSTITUTO DE ENERGIA E MEIO AMBIENTE (IEMA). Crise energética gera forte impacto ambiental no Brasil, alerta IEMA. Disponível em: <https://recontaai.com.br/crise-energetica-gera-forte-impacto-ambiental-no-brasil-alerta-iema>. Acesso em: 28/02/2022.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LAMAISSONA, F.; REGINATTO, V.; AMANTE, E. R.; ANTÔNIO, R. V. Produção de Biocombustíveis a partir da água residuária do processamento da mandioca.

In: **2ND INTERNATIONAL WORKSHOP: Advances in Cleaner Production.** São Paulo, Brasil, 2009.

LAPPA, I, K.; PAPADAKI, A.; KACHRIMANIDOU, V.; TERPOU, A.; KOULOUGLIOTIS, A.; ERIOTOU, E.; KOPSAHELIS, N. Cheese Whey Processing: Integrated Biorefinery Concepts and Emerging Food Applications. **Foods**. v. 8, p. 347, 2019.

LEIDENS, N. **Concentração das proteínas do soro de leite de ovelha por ultrafiltração e determinação das propriedades funcionais dos concentrados proteicos.** Dissertação (Mestrado). 134f. Programa de pós-graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre/RS, 2013.

LUCAS, S. D. M.; PEIXOTO, G.; GOMES, S. D.; ZAIAT, M. Energy recovery from agro-industrial wastewaters through biohydrogen production: kinetic evaluation and technological feasibility. **Renewable Energy**, v.75, p.496-504, 2015.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**., v. 31, p. 426-428, 1959.

MOCKAITIS, G.; BRUANT, G.; GUIOT, S. R.; PEIXOTO, G.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Acidic and thermal pre-treatments for anaerobic digestion inoculum to improve hydrogen and volatile fatty acid production using xylose as the substrate. **Renewable Energy**, v. 145, pp. 1388-1398, 2020.

OLIVEIRA, P. A. V. **Produção e aproveitamento do biogás. Tecnologias para o manejo de resíduos na produção de suínos:** Manual de boas práticas. Concórdia: Gestão Integrada de Ativos Ambientais, 2004.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA (FAO). **Desperdício de alimentos tem consequências no clima, na água, na terra e na biodiversidade.** Disponível em: <http://www.fao.org.br/daccatb.asp>. Acesso em: 08 de setembro de 2021.

PEIXOTO, G. **Sistema fermentativo de duas fases para a produção de hidrogênio e metano a partir de esgoto sanitário combinado com águas residuárias industriais**. 214f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Hidráulica e Saneamento. Universidade de São Paulo. São Carlos/SP, 2011.

PEIXOTO, G.; PANTOJA-FILHO, J. L. R.; AGNELLI, J. A. B.; BARBOZA, M.; ZAIAT, M. Hydrogen and methane production, energy recovery, and organic matter removal from effluents in a two-stage fermentative process. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 168, p. 651-671, 2012.

POGGI-VARALDO, H. M.; MUÑOZ-PÁEZ, K. M. WITHDRAWN: Evaluation of biohydrogen production at ambient temperature from cheese whey and assessment of the associated microbial community. **International Journal of Hydrogen Energy**, In Press, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.08.082>.

SÁ, L. R.; CAMMAROTA, M. C.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia-aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. **Química Nova**, v. 37, p. 857-867, 2014.

SAQIB, A. A. N.; WHITNEY, P. J. Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono-and di-saccharide sugars. **Biomass and bioenergy**, v. 35, p. 4748-4750, 2011.

SANTOS, F. M.; SANTOS, F. A. O combustível “hidrogênio”. **Rev. Educ., Ciênc. Tecnol.**, v. 31, p. 122-126, 2005.

SARATALE, G. D.; SARATALE, R. G.; BANU, J. R.; CHANG, J-S. Biohydrogen Production From Renewable Biomass Resources. In: **Biohydrogen**. 2nd. ed. 2019. p. 247-277.

SPELLMAN, D.; McEVOY, E.; O'CUINN, G.; FITZGERALD, R, J. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: comparison of tnbs, opa and ph stat methods for quantification of degree of hydrolysis. **International Dairy Journal, Barking**, v. 13, p.447-453, 2003.

TANBOLY, E. S. E.; KHORSHID, M. E. H. Recovery of cheese whey, a by-product from the dairy industry for use as an animal feed. **Journal of Nutritional Health & Food Engineering**, v.5, p.148-154, 2017.

TOLMASQUIM, M. T.; GUERREIRO, A.; GORINI, R. Matriz energética brasileira: uma prospectiva. **Novos estudos CEBRAP**, v. 79, p. 47-69, 2007.

TONSO, A.; JUNIOR, A. C. B.; SCHMIDELL, W. Tipos de biorreatores e formas de operação. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**, v. 100, p. 109, 2001.

YASIN, N. H. M.; MUMTAZ, T.; HASSAN, M. A.; RAHMAN, N. A. Food waste and food processing waste for biohydrogen production: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 130, p. 375-385, 2013.

YADAV, J. S. S.; YAN, S.; PILLI, S.; KUMAR, L.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 6, pp. 756-774, 2015.

ZAIA, Dimas AM; ZAIA, Cássia Thaís BV; LICHTIG, Jaim. Determination of total protein by spectrophotometry: advantages and disadvantages of proposed methods. **Química Nova**, v. 21, p. 787-793, 1998.