



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102019021055-9 A2



(22) Data do Depósito: 07/10/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 20/04/2021

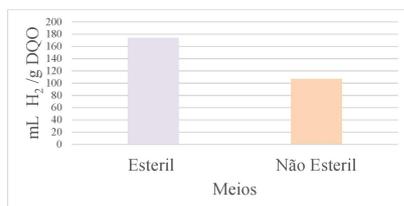
(54) **Título:** PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE BIO-HIDROGÊNIO A PARTIR DE EFLUENTES AGROINDUSTRIAIS E CONSÓRCIO MICROBIANO PARA PRODUÇÃO DE BIO-HIDROGÊNIO

(51) **Int. Cl.:** C12P 3/00; C12N 1/20; C12R 1/01.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA; UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ.

(72) **Inventor(es):** CARLOS RICARDO SOCCOL; WALTER JOSÉ MARTÍNEZ BURGOS; ADRIANE BIANCHI PEDRONI MEDEIROS; EDUARDO BITTENCOURT SYDNEY; JÚLIO CESAR DE CARVALHO; SUSAN GRACE KARP.

(57) **Resumo:** PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE BIO-HIDROGÊNIO A PARTIR DE EFLUENTES AGROINDUSTRIAIS E CONSÓRCIO MICROBIANO PARA PRODUÇÃO DE BIO-HIDROGÊNIO. A busca por fontes energéticas renováveis e a diversificação da matriz energética global estão em constante crescimento. Assim, o hidrogênio produzido a partir de fontes renováveis surge como uma alternativa, pois é um dos poucos combustíveis cuja combustão não gera gases poluentes. Na presente invenção o hidrogênio foi obtido a partir da fermentação escura de dois efluentes agroindustriais, a manipueira e a milhocina, com ou sem hidrólise prévia. Foram utilizados biorreatores operados em batelada com temperaturas na faixa de 15 a 45 °C e pH inicial na faixa de 4 a 8, e como inóculo foi utilizado um consórcio microbiano específico, desenvolvido para esta finalidade. A presente invenção descreve uma tecnologia verde baseada em um processo fermentativo e um consórcio microbiano para a produção de um biocombustível não poluente e de alta densidade energética, e tem aplicação principalmente nos setores energético e agroindustrial.



**PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE BIO-HIDROGÊNIO A PARTIR DE
EFLUENTES AGROINDUSTRIAIS E CONSÓRCIO MICROBIANO PARA
PRODUÇÃO DE BIO-HIDROGÊNIO**

CAMPO DA INVENÇÃO

[001]. A presente invenção trata de um processo para a produção de hidrogênio, realizado em fermentação submersa escura, a partir de dois efluentes agroindustriais, a milhocina e a manipueira, e de um consórcio bacteriano desenvolvido para esta finalidade. O processo e o consórcio descritos na presente invenção têm aplicações em diferentes setores industriais, tais como o energético, o agroindustrial, o metalúrgico, o químico, o petroquímico e o de alimentos, no que tange à produção de um biocombustível e ao aproveitamento de resíduos agroindustriais.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO E ESTADO DA TÉCNICA

[002]. O hidrogênio é um gás sem cor e sem odor que tem amplas aplicações em diversos setores industriais como o energético, o de alimentos, o petroquímico, o químico, entre outros. Atualmente, é produzido principalmente a partir dos combustíveis fósseis, por via química. O petróleo e seus derivados são recursos não renováveis, altamente questionados pelos gases poluentes liberados na sua combustão (COx, NOx, SOx, CxHy). Além disso, esses recursos são cada vez mais escassos, pois alguns estudos indicam que as reservas mundiais de petróleo só suprirão o planeta até o ano de 2050, motivo pelo qual a busca por fontes alternativas, limpas e renováveis de energia é de importância vital.

[003]. A produção de hidrogênio por via biológica, utilizando micro-organismos, é uma alternativa promissora e concorrente dos processos convencionais que empregam

petróleo e/ou carvão. Os micro-organismos podem usar nutrientes até mesmo de efluentes para o seu crescimento e produção do hidrogênio.

[004]. As bactérias estão entre os micro-organismos que apresentam os melhores rendimentos para a produção de hidrogênio, alguns exemplos são citados a seguir: *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium butyricum*, *Escherichia aerogenes*, *Escherichia cloacae*, *Clostridium amylolyticum*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium thermocellum*, *Thermoanaerobacterium aotearoense*, *Thermoanaerobacterium aotearoense*, *Thermotoga neapolitana*, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* DSM 8903, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16, *Janthinobacterium agaricidamnorum* (Y08845), *Polaromonas jejuensis* JS12-13 (NR044379), *Pedobacter aurantiacus* (DQ235228), *Bacillus simplex* (EU236732), *Devosia limi* R-21940 (NR042324), *Flavobacterium limicola* (AB075230), *Pseudomonas meridiana* (AJ537602), *Actinobacterium antarcticum* (HQ699437), *Pseudorhodobacter* sp., *Polaromonas rhizosphaerae* (EF127651).

[005]. Constam alguns estudos na literatura científica sobre a utilização de resíduos agroindustriais para a produção de hidrogênio por via biológica. Por exemplo, Intanoo et al. relataram a síntese de hidrogênio e metano a partir de resíduo líquido de mandioca, por meio do tratamento do efluente em reator anaeróbico de leito de lodo com fluxo ascendente (Optimization of separate hydrogen and methane production from cassava wastewater using two-stage upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB) system under thermophilic operation, *Bioresource Technology*, v. 173, p. 256–265, 2014). Nesse estudo não foi utilizado um consórcio microbiano definido, e o máximo rendimento obtido foi de 54 mL H₂/g DQO. Sreethawong et al. reportaram a produção de hidrogênio, também a partir de resíduo líquido de mandioca, e obtiveram rendimento bastante elevado, da ordem de 180 mL H₂/g DQO sem suplementação, e 440 mL H₂/g DQO com

suplementação de fonte de nitrogênio na forma de NH_4HCO_3 . Da mesma forma, nesse estudo não foi determinada a composição do inóculo, de modo que a reprodutibilidade dos resultados dependeria do acaso (Hydrogen production from cassava wastewater using an anaerobic sequencing batch reactor : Effects of operational parameters, COD:N ratio, and organic acid composition, *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35(9), p. 4092–4102, 2010).

[006]. No documento de patente **CN105400821A** é apresentado o uso de efluentes de laticínios para a produção de hidrogênio. Nesse processo foi definida apenas uma espécie microbiana, *Clostridium butyricum*, e é prevista uma etapa de pré-tratamento com irradiação gama. Ainda, são empregados diferentes reagentes ou meios comerciais, tais como: lactose, peptona, extrato de levedura, NaHCO_3 , NH_4C , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Similarmente, no documento de patente **US2005/0064567A1** é descrito um processo para a produção de hidrogênio a partir de resíduos orgânicos (hidrocarbonetos e proteínas) no estado sólido, também prevendo a adição de reagentes comerciais tais como: Fe, amônio, NH_4CO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, FeCl, entre outros. Nesse processo, não foi definida a composição do inóculo. Todos esses fatores encarecem o processo e limitam sua aplicação em larga escala. Assim, para possibilitar a difusão de uma tecnologia de produção de hidrogênio a partir de resíduos, é fundamental estabelecer condições para que um ou mais micro-organismos produtores sejam capazes de se desenvolver nos resíduos e produzir o gás combustível com eficiência.

[007]. No documento de patente **WO2008081292A3** é apresentado um processo de produção de hidrogênio e metano a partir de águas residuais, em um biorreator de leito fluidizado com biofilme, operado a temperatura elevada para favorecer o metabolismo de bactérias anaeróbicas termofílicas. Além disso o tratamento do efluente é realizado a

temperaturas entre 70 e 130 °C e o tempo de exposição pode variar desde segundos até horas para inativar os patógenos presentes. O emprego de temperaturas elevadas pode contribuir para o aumento no rendimento de bio-hidrogênio e biometano, no entanto representa maiores custos e maior complexidade operacional, o que restringe sua aplicação. Desta forma, identifica-se mais uma vez a necessidade de um consórcio microbiano capaz de produzir gases combustíveis com alto rendimento e que seja capaz de dominar sobre a microflora natural de águas residuais.

[008]. No documento de patente **US2015/0111273A1** é descrito um processo para a produção de hidrogênio por via biológica a partir de materiais orgânicos, no qual poderiam ser usadas pelo menos uma das seguintes espécies microbianas como inóculo: *C. butyricum*, *C. beijerinckii*, *C. acetobutyricum*, *C. bifermentans*, espécies de *Enterobacter* tais como *Enterobacter aerogenes* e espécies de *Bacillus* tais como *B. megaterium* e *B. thuringiensis*. Nesta invenção, o meio de cultivo não é descrito assim como não é definida a composição do inóculo, uma vez que os focos são o método e o sistema de produção.

[009]. No pedido de patente **US2017/0204434A1** é apresentado um processo de produção de hidrogênio usando alguns tipos de resíduos tais como: resíduos industriais, resíduos domésticos, resíduos agroindustriais e agrícolas, resíduos de processamento de alimentos, tais como de carne, produtos lácteos e cerveja, resíduos de papel, resíduos de material vegetal, incluindo produtos como espigas de milho, cascas de nozes, cascas de frutas e sementes, resíduos de plantas, fibra de processamento de bagas, resíduos do processamento de maçãs e framboesas, resíduos de laticínios, incluindo produtos como leite estragado, queijo e soro de leite, resíduos de cervejarias, tais como biomassa de levedura, resíduos de papel e celulose, bagaço de cana de açúcar e fibra de impressão de jornal. Como inóculo é utilizado pelo menos um dos seguintes micro-organismos: *Acetivibrio*,

Acetoanaerobium, Acetofilamentum, Acetogenium, Acetothermus, Acidaminobacter, Anaerobiospirillum, Anaerorhabdus, Anaerovibrio, Atopobium, Bacteroides, Bifidobacterium, Bilophila, Butyrivibrio, Campylobacter, Catonella, Centipeda, Dialister, Dichelobacter, Fervidobacterium, Fibrobacter, Fusobacterium, Halanaerobacter, Halanaerobium, Ilvobacter, Johnsonella, Lachnobacterium, Leptotrichia, Malonomonas, Megamonas, Mitsuokella, Oxalobacter, Pectinatus, Pelobacter, Porphyromonas, Prevotella, Propionibacterium, Propionigenium, Propionispira, Rikenella, Roseburia, Ruminobacter, Sebaldella, Selenomonas, Sporomusa, Succinimonas, Succinivibrio, Syntrophobacter, Syntrophomonas, Sutterella, Saponavida, Thermobacteroides, Thermosiphon, Thermotoga, Tissierella, Wolinella, Zymophilus, Desulfobacter, Desulfobacterium, Desulfobulbus, Desulfococcus, Desulfomicrobium, Desulfomonas, Desulfomonile, Desulfonema, Desulfosarcina, Desulfotomaculum, Desulfovibrio, Desulfurella, Desulfilromonas, Thermodesulfobacterium, Acidaminococcus, Megasphaera, Syntrophococcus, Veillonella, Coprococcus, Peptococcus, Peptostreptococcus, Ruminococcus, Sarcina, Clostridium, Amoebobacter, Chromatium, Lamprobacter, Thiocapsa, Thiocystis, Thiodictyo, Thiopedia, Thiospirillum, Ectothiorhodospira, Rhodobacter, Rhodocyclus, Rhodomicrobium, Rhodopilla, Rhodopseudomonas, Rhodospirillum, Erythrobacter, Methanobacterium, Methanobrevibacter, Methanococcus, Methanococcoides, Methanolobus, Methanolacinia, Methanomicrobium, Methanogenium, Methanospirillum, Methanoplanus, Methanotherix, Methanothermus, Methanocorpusculum, Methanoculleus, Methanohalobium, Methanohalophilus, Methanosarcina, Methanosphaera, Eubacterium, Abiotrophia, Atopobium, Gemella, Granulicatella, Finegoldia, Lactobacillus, Actinomyces, Arcanobacterium, Bulleidia, Collinsella, Cryptobacterium, Holdemania, Rothia, Pseudoramibacter, Mogibacterium,

Slackia e *Eggerthella*. Não foram especificadas outras características do inóculo. É prevista a adição de uma fonte de nitrogênio e de uma ou mais vitaminas. O sistema é mantido a pH constante entre 3 e 6,5, a uma temperatura entre 25 e 40°C, é agitado e operado em modo contínuo. Percebe-se, mais uma vez, a definição de um sistema com condições rigidamente controladas e adição de nutrientes comerciais para garantir o rendimento da produção de hidrogênio.

DESCRIÇÃO DA ABORDAGEM DO PROBLEMA TÉCNICO

[010]. A presente invenção descreve uma tecnologia para produção de hidrogênio com elevado rendimento, baseada na fermentação escura e na definição de composições para o meio de cultivo e para o inóculo, o qual é um consórcio microbiano. Além de ser uma tecnologia que não requer a adição de reagentes comerciais, como se observa no estado da arte, a presente invenção contempla o aproveitamento de resíduos agroindustriais.

[011]. A composição do consórcio microbiano foi definida de modo a favorecer o consumo eficiente dos nutrientes presentes nos efluentes, e também garantir a predominância dos micro-organismos sobre a microbiota natural dos efluentes, nas condições de processo estabelecidas.

[012]. Além disso, a invenção apresenta como vantagem o fato de oferecer uma alternativa de uso para efluentes que são um problema ambiental nas regiões processadoras de mandioca e milho. A manipueira e a milhocina têm alta carga orgânica, o que dificulta seu tratamento e disposição, e no caso específico da manipueira, estão presentes compostos de natureza extremamente tóxica como a linamarina, da qual se origina o ácido cianídrico (HCN). Assim, o aproveitamento desses resíduos para produção de hidrogênio, além de ser um processo econômico para geração de um

biocombustível, contribui para a redução de sua carga orgânica e toxicidade, diminuindo seu impacto ambiental.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[013]. O processo desta invenção consiste no emprego de resíduos derivados do processamento da mandioca e do milho, a manipueira (Map) e a milhocina (Mil), misturados na proporção entre 1 e 50% (m/m) (Mil/Map) ou 99 e 50% (m/m) (Map/Mil) e fermentados para produção de bio-hidrogênio. Ambos efluentes poderão ser ou não hidrolisados, ou apenas um deles poderá ser hidrolisado. No caso de pelo menos um dos efluentes ser hidrolisado o ácido empregado poderá ser H_2SO_4 , HCl ou H_3PO_4 , de modo a obter uma concentração final entre 0,1 a 5% (m/m) no caso de o efluente ser manipueira e de 0,5 a 10% no caso de o efluente ser milhocina. A hidrólise será realizada a uma temperatura entre 100 e 130°C, pressão entre 1 e 1,5 kgf/cm² e tempo entre 1 e 120 min. O pH será ajustado após a mistura dos efluentes conforme descrito anteriormente, pela adição de base de modo a obter pH entre 4 e 8.

[014]. A título de exemplo, verifica-se aumento em torno de 30 a 50% na produção de hidrogênio a partir dos efluentes manipueira e milhocina após hidrólise ácida, utilizando os referidos ácidos inorgânicos, na faixa de temperatura entre 100 e 130°C e pressão entre 1 e 1,5 kgf/cm². Para assegurar o aumento do rendimento na faixa de 30 a 50%, menores concentrações de ácido (0,1–0,9%) devem ser associadas a maior tempo de reação (60–120 min) e maior temperatura (120–130°C). Por se tratar de uma etapa adicional de elevado gasto energético, os experimentos relatados a seguir não contemplam essa etapa (opcional) de hidrólise.

[015]. Ainda como exemplo, verifica-se que a produção de hidrogênio se dá em uma ampla faixa de concentração de milhocina, com variações de rendimento conforme a proporção utilizada, tal qual apresentado na Tabela 1. Os maiores rendimentos são observados quando a concentração de milhocina está abaixo de 10%. No entanto, a depender do volume de efluente que se deseja tratar, é possível produzir hidrogênio utilizando maiores concentrações de milhocina (até 50%).

Tabela 1. Rendimento usando diferentes concentrações de milhocina

Concentrações milhocina %					
1.0	2.49	9.5	17	30	50
0,27 mL H ₂ /mL meio	0,462 mL H ₂ /mL meio	1,03 mL H ₂ /mL meio	0,16 mL H ₂ /mL meio	0,12 mL H ₂ /mL meio	0,05 mL H ₂ /mL meio
41 mL H ₂ / g DQO	68 mL H ₂ / g DQO	127 mL H ₂ / g DQO	40 mL H ₂ / g DQO	< 10 mL H ₂ / g DQO	< 10 mL H ₂ / g DQO

[016]. Também é verificada a produção de hidrogênio em uma ampla faixa de pH, do ácido (pH 4) ao alcalino (pH 8), porém com rendimentos variáveis (Tabela 2). É válido ressaltar que o pH varia consideravelmente ao longo do processo fermentativo, e que os valores reportados na Tabela 2 correspondem ao pH inicial do meio.

Tabela 2. Rendimento a diferentes valores de pH

pH: 4	pH: 6	pH: 8
0,1 mL H ₂ /mL meio 22 mL H ₂ / g DQO	1,16 mL H ₂ /mL meio 110 mL H ₂ / g DQO	0,54 mL H ₂ /mL meio 47 mL H ₂ / g DQO

Nota: Todos os experimentos foram feitos a uma temperatura de 37°C

[017]. Opcionalmente poderá ser realizada a esterilização ou pasteurização do meio, por calor, como forma de eliminar parte ou a totalidade da carga microbiana dos efluentes. Essa etapa poderá ser realizada em condições padrão, a uma temperatura entre 60 e 130°C e tempo entre 1 segundo e 120 min, sendo que a eliminação da carga de contaminantes será diretamente proporcional à temperatura e ao tempo empregados. Também

opcionalmente poderá ser realizada a purga do meio de cultivo para eliminação do oxigênio, pela injeção de argônio, nitrogênio ou dióxido de carbono, a uma vazão entre 0,5 e 10 L/min/L de meio e tempo entre 15 segundos e 120 minutos.

[018]. A título de exemplo, quando o meio for esterilizado ou pasteurizado, o rendimento médio poderá ser em torno de 175 mL de H₂/ g de DQO removida. Sem a etapa de esterilização o rendimento tende a ser menor, em torno de 110 mL de H₂/ g de DQO removida, valor este ainda muito superior a vários reportados na literatura mesmo em meios que passaram pela etapa de esterilização ou pasteurização (**Figura 1**).

[019]. Ainda como exemplo, quando o meio for purgado com argônio, nitrogênio ou dióxido de carbono, o rendimento médio de bio-hidrogênio produzido na etapa de fermentação poderá ser em torno de 175 mL de H₂/ g de DQO removida. Sem a etapa de purga o rendimento tende a ser menor, em torno de 40 mL H₂/ g de DQO removida, valor ainda significativo quando comparado com outros reportados na literatura mesmo em meios que passaram pela etapa de purga (**Figura 2**).

[020]. A purga pode ser realizada com os diferentes gases supracitados, a depender do rendimento desejado (Tabela 3), do custo e da disponibilidade dos mesmos. Por ser um gás nobre, o argônio não interfere nas demais análises e balanços de massa do processo, e por esta razão foi utilizado majoritariamente no desenvolvimento da presente invenção.

Tabela 3. Rendimento usando diferentes gases de purga e diferentes vazões

Vazão	CO ₂	Argônio	N ₂
2 L/min/L meio	0,85 mL H ₂ /mL meio 101 mL H ₂ / g DQO	1,06 mL H ₂ /mL meio 125 mL H ₂ / g DQO	0,92 mL H ₂ /mL meio 142 mL H ₂ / g DQO
2.5 L/min/L meio		175 mL H ₂ / g DQO	
0,5 L/min/L meio		117 mL H ₂ / g DQO	
10 L/min/L meio		170 mL H ₂ / g DQO	

Nota: Todos os experimentos foram feitos a uma temperatura de 37°C e pH de 6, 9.5% de milhocina e tempo de purga de 17s

[021]. Outro exemplo diz respeito ao tempo de purga. Este deve ser de pelo menos 15s para garantir o rendimento do processo, e a partir desse tempo a diferença no rendimento não é significativa (Tabela 4).

Tabela 4. Rendimento usando diferentes tempos de purga

Tempo de purga					
6 (s)	10 (s)	15 (s)	20 (s)	34 (s)	120 (min)
0,21 mL H ₂ /mL meio	0,31 mL H ₂ /mL meio	0,98 mL H ₂ /mL meio	1,04 mL H ₂ /mL meio	0,94 mL H ₂ /mL meio	1,1 mL H ₂ /mL meio
30 mL H ₂ / g DQO	19 mL H ₂ / g DQO	135 mL H ₂ / g DQO	142 mL H ₂ / g DQO	129 mL H ₂ / g DQO	149 mL H ₂ / g DQO

Nota: Todos os experimentos foram feitos a uma temperatura de 37°C, pH de 6 e 9.5% de milhocina

[022]. Os rendimentos alcançados no processo da presente invenção são em grande parte devidos ao consórcio microbiano elaborado, o qual atua como inóculo no processo fermentativo. Esse consórcio contém as famílias bacterianas Porphyromonadaceae, Enterococcaceae, Clostridiaceae, Ruminococcaceae, Actinomycetaceae, Bacillaceae, Lactobacillaceae, Bifidobacteriaceae, Bacteroidaceae, Leuconostocaceae, Streptococcaceae, Lachnospiraceae, Erysipelotrichaceae, Comamonadaceae e Pseudomonadaceae em proporções de 10 a 25%, 30 a 60%, 25 a 50%, 0,5 a 5%, 0,05 a 2%, 0,001 a 2%, 0,001 a 2%, 0,001 a 2%, 0,002 a 0,02%, 0,01 a 0,05%, 0,001 a 0,005%, 0,01 a 0,05%, 0,0005 a 0,002%, 0,001 a 0,01% e 0,001 a 0,2% (abundância relativa de material genético na comunidade bacteriana), respectivamente. Mais especificamente, o consórcio contém os gêneros bacterianos *Enterococcus*, *Clostridium*, *Faecalibacterium*, *Oscillospira*, *Ruminococcus*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Blautia*, *Coprococcus*, *Dorea*, *Allobaculum*, *Comamonas* e *Pseudomonas* em proporções de 0,1 a 2%, 20 a 40%, 0,008 a 1,0%, 0,8 a 1,5%, 0,02 a 1,0%, 0,05 a 1%, 0,005 a 0,09%, 0,005 a 0,09%, 0,005 a 0,09%, 0,001 a 0,005%, 0,005 a 0,09%, 0,001 a 0,009%, 0,005 a 0,09%, 0,001 a 0,01%, 0,01 a 0,05%, 0,0005 a 0,01%, 0,001 a 0,01% e 0,0005 a 0,01% (abundância relativa de material genético na comunidade bacteriana),

respectivamente. A inoculação é realizada pela adição do consórcio, sólido (seco/lioofilizado) ou líquido (com os micro-organismos em suspensão) ao meio de cultivo, de modo a obter uma concentração inicial mínima de células viáveis totais de 10^5 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL, e máxima de 10^{12} UFC por mL.

[023]. Por exemplo, pode-se verificar que a produção de hidrogênio ocorre quando são utilizados micro-organismos de uma única família (Clostridiaceae, Enterobacteriaceae), uma vez que esses são micro-organismos conhecidos do estado da arte como produtores de hidrogênio (Tabela 5). Porém, rendimentos significativamente superiores são verificados utilizando um consórcio microbiano (0,89 mL H₂/mL meio), e rendimentos ótimos são obtidos utilizando o consórcio microbiano na faixa de composição definida na presente invenção (1,05 mL H₂/mL meio – 1,1 mL H₂/mL meio). O processo de produção de bio-hidrogênio é bastante complexo e envolve diversas etapas conduzidas por micro-organismos diferentes, os quais devem ser capazes de, além de consumir os nutrientes com eficiência e convertê-los em hidrogênio, predominar sobre a microflora já existente nos efluentes, no caso de esses não terem sido esterilizados. Visando a essas características, chegou-se à composição microbiana definida na presente invenção.

Tabela 5. Rendimento usando diferentes micro-organismos e consórcios microbianos

Micro-organismos	Rendimento
Clostridiaceae 100%	0,50 mL H ₂ /mL meio
Enterobacteriaceae 100%	0,27 mL H ₂ /mL meio
Porphyromonadaceae (75%), Clostridiaceae (15%), Ruminococcaceae (6%), Enterococcaceae (3%), Actinomycetaceae (0,28%), Bacillaceae (0,03%), Lactobacillaceae (0,027%), Bifidobacteriaceae (0,020%), Bacteroidaceae (0,0015%), Leuconostocaceae (0,04%), Streptococcaceae (0%),	0,89 mL H ₂ /mL meio

Lachnospiraceae (0,06%), Erysipelotrichaceae (0,01%), Comamonadaceae (0,004%), Pseudomonadaceae (0,01%)	
Porphyromonadaceae (10%), Clostridiaceae (25%), Ruminococcaceae (0,5%), Enterococcaceae (30%), Actinomycetaceae (0,05%), Bacillaceae (0,001%), Lactobacillaceae (0,001%), Bifidobacteriaceae (0,001%), Bacteroidaceae (0,002%), Leuconostocaceae (0,01%), Streptococcaceae (0,001%), Lachnospiraceae (0,01%), Erysipelotrichaceae (0,0005%), Comamonadaceae (0,001%), Pseudomonadaceae (0,001%)	1,05 mL H ₂ /mL meio
Porphyromonadaceae (16%), Clostridiaceae (31%), Ruminococcaceae (1,3%), Enterococcaceae (48%), Actinomycetaceae (0,10%), Bacillaceae (0,01%), Lactobacillaceae (0,01%), Bifidobacteriaceae (0,012%), Bacteroidaceae (0,0035%), Leuconostocaceae (0,026%), Streptococcaceae (0,002%), Lachnospiraceae (0,05%), Erysipelotrichaceae (0,0007%), Comamonadaceae (0,0014%), Pseudomonadaceae (0,006%)	1,1 mL H ₂ /mL meio
Porphyromonadaceae (25%), Clostridiaceae (50%), Ruminococcaceae (5%), Enterococcaceae (60%), Actinomycetaceae (2%), Bacillaceae (2%), Lactobacillaceae (2%), Bifidobacteriaceae (2%), Bacteroidaceae (0,02%), Leuconostocaceae (0,05%), Streptococcaceae (0,005%), Lachnospiraceae (0,05%), Erysipelotrichaceae (0,002%), Comamonadaceae (0,01%), Pseudomonadaceae (0,2%)	1,1 mL H ₂ /mL meio

Nota: Todos os experimentos foram feitos a uma temperatura de 37°C, pH 6 e 9.5% de milhocina

[024]. O processo de fermentação é realizado em biorreator do tipo tanque sem agitação com um volume de trabalho de 20 a 80% do volume total do biorreator, a uma temperatura entre 15 e 45°C, por tempo entre 6 e 96h. Após a fermentação ou ao longo da mesma, a mistura de gases é coletada a partir do *headspace* do biorreator e o gás de interesse (H₂) pode ser purificado por algum dos métodos já estabelecidos para a separação de gases.

[025]. Por exemplo, o processo de fermentação pode ser realizado em uma faixa de temperatura de 15 a 45°C, com rendimento variável conforme é apresentado na Tabela 6. A definição da temperatura de processo poderá ser em função da possibilidade ou não de se controlar a temperatura do fermentador, das características climáticas da região onde o mesmo for instalado, e do rendimento desejado. O tempo de processo também depende da produção desejada, uma vez que a partir de 6h já é observada quantidade significativa de hidrogênio, a qual aumenta cumulativamente até 48h e segue aumentando, porém em menor intensidade, até 96h.

Tabela 6. Produção de hidrogênio a diferentes temperaturas

20°C	37°C	45°C
0,06 mL H ₂ /mL meio < 10 mL H ₂ / g DQO	1,06 mL H ₂ /mL meio 120 mL H ₂ / g DQO	0,4 mL H ₂ /mL meio 35 mL H ₂ / g DQO

Nota: Todos os experimentos foram realizados a pH 6

[026]. A presente invenção também se refere ao consórcio microbiano a ser utilizado como inóculo para produção de bio-hidrogênio. Esse consórcio contém bactérias das famílias Porphyromonadaceae, Enterococcaceae, Clostridiaceae, Ruminococcaceae, Actinomycetaceae, Bacillaceae, Lactobacillaceae, Bifidobacteriaceae, Bacteroidaceae, Leuconostocaceae, Streptococcaceae, Lachnospiraceae, Erysipelotrichaceae, Comamonadaceae e Pseudomonadaceae em proporções de 10 a 25%, 30 a 60%, 25 a 50%, 0,5 a 5%, 0,05 a 2%, 0,001 a 2%, 0,001 a 2%, 0,001 a 2%, 0,002 a 0,02%, 0,01 a 0,05%, 0,001 a 0,005%, 0,01 a 0,05%, 0,0005 a 0,002%, 0,001 a 0,01% e 0,001 a 0,2% (abundância relativa de

material genético na comunidade bacteriana), respectivamente. Mais especificamente, o consórcio contém os gêneros bacterianos *Enterococcus*, *Clostridium*, *Faecalibacterium*, *Oscillospira*, *Ruminococcus*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Blautia*, *Coprococcus*, *Dorea*, *Allobaculum*, *Comamonas* e *Pseudomonas* em proporções de 0,1 a 2%, 20 a 40%, 0,008 a 1,0%, 0,8 a 1,5%, 0,02 a 1,0%, 0,05 a 1%, 0,005 a 0,09%, 0,005 a 0,09%, 0,005 a 0,09%, 0,001 a 0,005%, 0,005 a 0,09%, 0,001 a 0,009%, 0,005 a 0,09%, 0,001 a 0,01%, 0,01 a 0,05%, 0,0005 a 0,01%, 0,001 a 0,01% e 0,0005 a 0,01% (abundância relativa de material genético na comunidade bacteriana), respectivamente. Esse consórcio pode se apresentar no estado sólido (seco ou liofilizado) ou líquido com os micro-organismos em suspensão.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE BIO-HIDROGÊNIO A PARTIR DE EFLUENTES AGROINDUSTRIAIS caracterizado por ser realizado nas etapas de:
 - (A) Mistura dos efluentes manipueira (Map) e milhocina (Mil) em proporção entre 1 e 50% (m/m) (Mil/Map)
 - (B) Ajuste do pH pela adição de base de modo a obter pH entre 4 e 8
 - (C) Purga com gás
 - (D) Inoculação de um consórcio microbiano contendo as famílias bacterianas Porphyromonadaceae, Enterococcaceae, Clostridiaceae, Ruminococcaceae, Actinomycetaceae, Bacillaceae, Lactobacillaceae, Bifidobacteriaceae, Bacteroidaceae, Leuconostocaceae, Streptococcaceae, Lachnospiraceae, Erysipelotrichaceae, Comamonadaceae e Pseudomonadaceae em proporções de 10 a 25%, 30 a 60%, 25 a 50%, 0,5 a 5%, 0,05 a 2%, 0,001 a 2%, 0,001 a 2%, 0,001 a 2%, 0,002 a 0,02%, 0,01 a 0,05%, 0,001 a 0,005%, 0,01 a 0,05%, 0,0005 a 0,002%, 0,001 a 0,01% e 0,001 a 0,2% (abundância relativa de material genético na comunidade bacteriana), respectivamente
 - (E) Fermentação em biorreator do tipo tanque sem agitação
2. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela realização de uma etapa opcional de hidrólise antes da etapa (A) pela adição de H₂SO₄, HCl ou H₃PO₄, de modo a obter uma concentração de ácido de 0,1 a 5% (m/m) no caso de o efluente ser manipueira e de 0,5 a 10% no caso de o efluente ser milhocina, seguida por incubação a uma temperatura entre 100 e 130°C, pressão entre 1 e 1,5 kgf/cm² e tempo entre 1 e 120 min.

3. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela realização de uma etapa opcional de esterilização/pasteurização após a etapa (B) a uma temperatura entre 60 e 130°C e tempo entre 1 s e 120 min.
4. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela realização da etapa (C) pela injeção de argônio, nitrogênio ou dióxido de carbono a uma vazão entre 0,5 e 10 L/min/L de meio e tempo entre 15 s e 120 min.
5. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela realização da etapa (D) pela adição do consórcio microbiano de modo a obter uma concentração inicial de células viáveis totais no meio entre 10^5 e 10^{12} unidades formadoras de colônia (UFC) por mL.
6. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela realização da etapa (E) em biorreator do tipo tanque sem agitação com um volume de trabalho de 20 a 80% do volume total do biorreator, a uma temperatura entre 15 e 45°C, por tempo entre 6 e 96h.
7. CONSÓRCIO MICROBIANO PARA PRODUÇÃO DE BIO-HIDROGÊNIO a ser empregado na realização do processo definido na reivindicação 1, caracterizado por conter bactérias das famílias Porphyromonadaceae, Enterococcaceae, Clostridiaceae, Ruminococcaceae, Actinomycetaceae, Bacillaceae, Lactobacillaceae, Bifidobacteriaceae, Bacteroidaceae, Leuconostocaceae, Streptococcaceae, Lachnospiraceae, Erysipelotrichaceae, Comamonadaceae e Pseudomonadaceae em proporções de 10 a 25%, 30 a 60%, 25 a 50%, 0,5 a 5%, 0,05 a 2%, 0,001 a 2%, 0,001 a 2%, 0,001 a 2%, 0,002 a 0,02%, 0,01 a 0,05%, 0,001 a 0,005%, 0,01 a 0,05%, 0,0005 a 0,002%, 0,001 a

0,01% e 0,001 a 0,2% (abundância relativa de material genético na comunidade bacteriana), respectivamente.

8. CONSÓRCIO MICROBIANO de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por conter, mais especificamente, os gêneros bacterianos *Enterococcus*, *Clostridium*, *Faecalibacterium*, *Oscillospira*, *Ruminococcus*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Blautia*, *Coprococcus*, *Dorea*, *Allobaculum*, *Comamonas* e *Pseudomonas* em proporções de 0,1 a 2%, 20 a 40%, 0,008 a 1,0%, 0,8 a 1,5%, 0,02 a 1,0%, 0,05 a 1%, 0,005 a 0,09%, 0,005 a 0,09%, 0,005 a 0,09%, 0,001 a 0,005%, 0,005 a 0,09%, 0,001 a 0,009%, 0,005 a 0,09%, 0,001 a 0,01%, 0,01 a 0,05%, 0,0005 a 0,01%, 0,001 a 0,01% e 0,0005 a 0,01% (abundância relativa de material genético na comunidade bacteriana), respectivamente.

FIGURAS

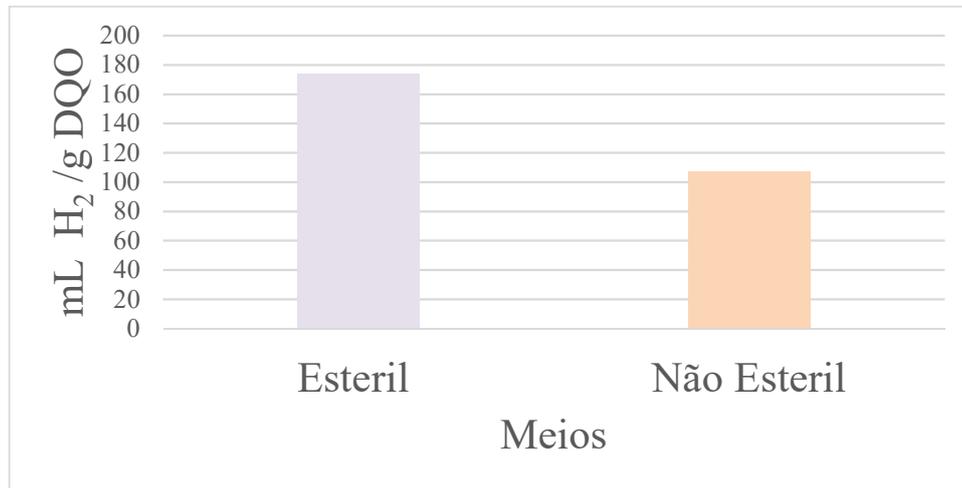


Figura 1

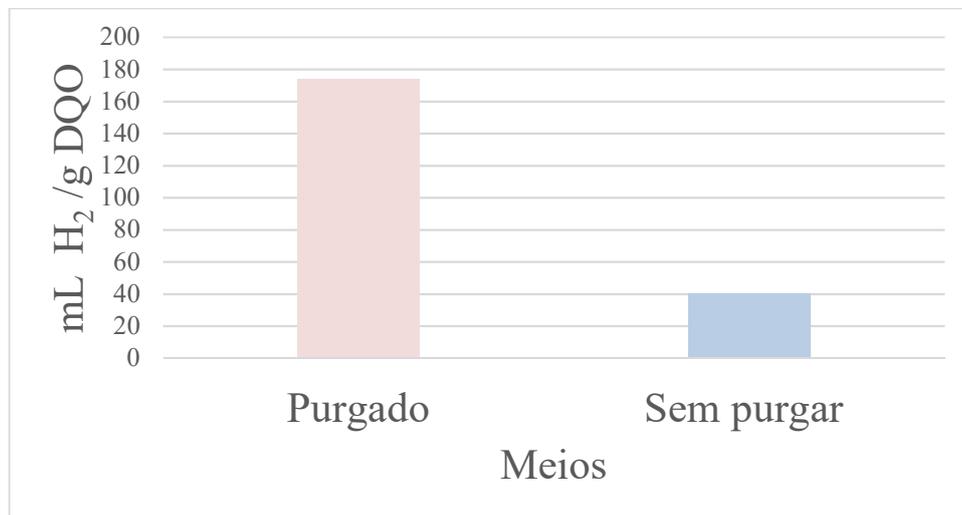


Figura 2

RESUMO

**PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE BIO-HIDROGÊNIO A PARTIR DE
EFLUENTES AGROINDUSTRIAIS E CONSÓRCIO MICROBIANO PARA
PRODUÇÃO DE BIO-HIDROGÊNIO**

A busca por fontes energéticas renováveis e a diversificação da matriz energética global estão em constante crescimento. Assim, o hidrogênio produzido a partir de fontes renováveis surge como uma alternativa, pois é um dos poucos combustíveis cuja combustão não gera gases poluentes. Na presente invenção o hidrogênio foi obtido a partir da fermentação escura de dois efluentes agroindustriais, a manipueira e a milhocina, com ou sem hidrólise prévia. Foram utilizados biorreatores operados em batelada com temperaturas na faixa de 15 a 45 °C e pH inicial na faixa de 4 a 8, e como inóculo foi utilizado um consórcio microbiano específico, desenvolvido para esta finalidade. A presente invenção descreve uma tecnologia verde baseada em um processo fermentativo e um consórcio microbiano para a produção de um biocombustível não poluente e de alta densidade energética, e tem aplicação principalmente nos setores energético e agroindustrial.