

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E DE PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO *Stricto sensu*
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

DEBORA CHRISTINA MOREIRA

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIONICO A PARTIR DE EFLUENTES
AGROINDUSTRIAIS**

PONTA GROSSA

2013

DEBORA CHRISTINA MOREIRA

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO A PARTIR DE EFLUENTES
AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação apresentada como um dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos do Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos
da Universidade Estadual de Ponta Grossa – PR

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Claudia Barana

**PONTA GROSSA
2013**

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

M838 Moreira, Debora Christina
 Produção de ácido propiônico a partir
 de efluentes agroindustriais/ Debora
 Christina Moreira. Ponta Grossa, 2013.
 67f.

 Dissertação (Mestrado em Ciência e
 Tecnologia de Alimentos - Área de
 Concentração: Ciências e Tecnologia de
 Alimentos), Universidade Estadual de Ponta
 Grossa.

 Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Claudia
 Barana.

 1.Ácido propiônico. 2.Planejamento de
 misturas. 3.Biodigestão anaeróbia.
 4.Resíduos agroindustriais. I.Barana, Ana
 Claudia. II. Universidade Estadual de
 Ponta Grossa. Mestrado em Ciência e
 Tecnologia de Alimentos. III. T.

CDD: 628.284.49

TERMO DE APROVAÇÃO

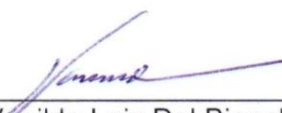
Debora Christina Moreira

PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO A PARTIR DE EFLUENTES AGROINDUSTRIAIS

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:



Profª Ana Cláudia Barana – UEPG



Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi – UNESP



Prof. Dr. Alessandro Nogueira - UEPG

"O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano"
Isaac Newton

***À minha família
Ao meu marido
Aos meus amigos***

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força, proteção e inspiração. Ele nunca nos abandona e sabe o que é melhor para cada um de nós.

À minha família: meus pais, Nilson e Rosa, e meu irmão Douglas, pelo carinho, suporte e confiança desde o início de minha caminhada.

Ao meu marido Cleyberson Cloud Machado, por todo amor, compreensão e incentivo; pela paciência em me ouvir, por me acompanhar em muitas noites de funcionamento do HPLC. Sempre meu melhor amigo!

À família Machado, pelo apoio em todas as etapas do mestrado e também na minha vida pessoal.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Ana Claudia Barana, pela oportunidade e por toda ajuda durante a elaboração deste trabalho.

À Jéssica e Cássia, alunas de iniciação científica, pela amizade e colaboração.

À Denise, do Laboratório de Tecnologia de Alimentos, pela amizade, pela paciência, colaboração e compartilhamento de seus conhecimentos.

A todos os professores do programa de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela disposição em ajudar.

À Radla Zabian Bassetto, pela ajuda nas análises cromatográficas.

Aos amigos: Fernanda Moreira, Renata Dourado de Castro, Enelise Staron, Flávia Almeida, Priscila Wosiack e Tiago Denck Colman, pelos momentos de distração, comemorações e pelos laços de amizade criados que possibilitarão muitos outros momentos alegres.

Em especial à Lara Brites, gostaria de agradecer o companheirismo e os momentos de aprendizagem que compartilhamos; pelos conselhos e incentivos tanto pessoais quanto profissionais; grande amiga e madrinha.

A todos os colegas do mestrado e amigos do CTA, que de muitas maneiras contribuíram para realização deste trabalho.

Aos novos engenheiros de alimentos, da turma de 2012, por me receberem muito bem enquanto fiz meu estágio em docência, uma experiência importantíssima para minha formação.

A CAPES, pela bolsa de mestrado concedida.

E a todos que deram condições para a realização deste trabalho, que sem dúvida é fruto da cooperação de todos.

RESUMO

A busca por fontes de energia renovável e a produção de alimentos com a mínima ameaça ao ecossistema têm sido temas bastante pesquisados em todo o mundo. Diversos processos têm sido desenvolvidos para a utilização de resíduos agroindustriais, transformando-os em compostos químicos e produtos com alto valor agregado. A utilização de resíduos agroindustriais em bioprocessos favorece a busca por processos sustentáveis. O aumento da produtividade agrícola no Brasil abre um novo mercado para o desenvolvimento de pesquisas que abordem este tema. O planejamento estatístico de misturas, aliado à otimização de experimentos, tem aplicação em diversos sistemas industriais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a possibilidade da utilização de misturas de efluentes agroindustriais para a produção de ácido propiônico. Foram utilizados quatro tipos de efluentes: efluente do processamento de milho, efluente do processamento de ração animal, efluente de processamento de carnes e de laticínio. Foram realizados ensaios para a obtenção da melhor composição das misturas, definindo-se a melhor proporção dos substratos. Dentro das condições empregadas, as composições contendo 75% do efluente do processamento de milho e 25% de outro substrato foram as mais adequadas ao processo. Nos ensaios onde as condições de fermentação foram variadas (fervura prévia do substrato, agitação e correção do pH para 6,5), os melhores resultados de produção de ácido propiônico, 229,57 mg.L⁻¹, foram obtidos com substrato composto por 75% de efluente do processamento de milho mais 25% de efluente de fábrica de ração, com 72h de fermentação, correção de pH inicial para 6,5 e sem agitação, seguido de substrato com 75% de efluente do processamento de milho mais 25% de efluente de processamento de carnes, nas mesmas condições, obtendo-se produção de 154,27 mg.L⁻¹ de ácido propiônico. O substrato contendo 75% de efluente do processamento de milho mais 25% de efluente de laticínio, possibilitou produção de 220,96 mg.L⁻¹ de ácido propiônico, após 72 horas de fermentação e com correção de pH a cada 24 horas. As outras condições testadas não foram significativas na biossíntese de ácido propiônico. A análise estatística dos dados confirmou que é possível a utilização de codigestão de efluentes agroindustriais para a produção de ácido propiônico.

Palavras-Chave: Ácido propiônico, planejamento de misturas, biodigestão anaeróbia, resíduos agroindustriais.

ABSTRACT

The search for renewable energy and food production with the minimum threat to the environment are themes that have been studied for all over the world. Several processes have been developed for the use of agroindustrial wastes, transforming them into chemical compounds and products with high added value. The use of agroindustrial wastes in bioprocesses helps the search for sustainable processes. The increasing in the agricultural productivity in Brazil, open a new market to the development of researches that study this issue. The statistical modeling of mixtures, allied with the design of experiments, has application in a several industrial systems. The aim of this work was to study the possibility of use agroindustrial wastewater mixtures to produce propionic acid. Four types of wastewater were studied: corn steep liquor, pet food wastewater, meat processing wastewater and dairy wastewater. Assays were performed to obtain the best composition of the mixtures and the best substrate ratio. Within the conditions employed, the mixture containing 75% of corn steep liquor and 25% of another substrate, were most suitable for the process. Studying the tests in which the fermentations conditions varied (boiling the substrate, agitation and pH correction to 6,5) the best concentrations of propionic acid, 229,57 mg.L⁻¹, were produced by mixing 75% of corn steep liquor and 25% of pet food wastewater, after 72h of fermentation, with initial correcting of pH to 6,5, followed by the mixture containing 75% of corn steep liquor and 25% of meat processing wastewater, that enabled the production of 154,27 mg.L⁻¹ of propionic acid. The mixture with 75% of corn steep liquor and 25% of dairy wastewater with daily pH correction enabled the production of 220,96 mg.L⁻¹ of propionic acid after 72 hours of fermentation. The other essay conditions were not significant for propionic acid biosynthesis. The statistical analysis confirms that it is possible to use codigestion agroindustrial waste for propionic acid production.

Key words: Propionic acid, mixture design, anaerobic digestion, agroindustrial waste.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de digestão anaeróbia.....	18
Figura 2 - Via metabólica da glicólise anaeróbia.....	19
Figura 3 – Rotas de produção de ácido propiônico e produtos de fermentação.	25
Figura 4 - Frasco de vidro borosilicato Duran®, utilizado como fermentador.....	39
Figura 5 - Produção de ácido propiônico, em diferentes tempos de fermentação, nas misturas do Ensaio A.....	46
Figura 6 - Produção de ácido propiônico nas misturas do Ensaio B.....	48
Figura 7 - Influência das condições testadas, na produção de ácido propiônico, nas misturas de substratos.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição da produção do ácido propiônico da literatura.....	26
Tabela 2 – Dados dos diferentes efluentes utilizados neste experimento..	38
Tabela 3 – Ensaio A - Matriz do planejamento experimental de misturas com quatro componentes (mL das amostras), processamento de milho (MIL), da fabricação de ração animal (RAÇ), de processamento de carnes (CAR) e de laticínios (LAC).....	40
Tabela 4 –(Ensaio B) Matriz do planejamento experimental de misturas em rede simplex {2,2} aumentado; processamento de milho (MIL), da fabricação de ração animal (RAÇ), de processamento de carnes (CAR) e de laticínios (LAC).....	41
Tabela 5 – Resultados da produção de ácido propiônico em relação à composição da mistura de substratos do Ensaio A.....	45
Tabela 6 – Resultados da produção de ácido propiônico em relação às proporções de substratos nas misturas do Ensaio B.....	48
Tabela 7 – Resultados dos teores de ácido propiônico produzido durante a digestão anaeróbia das misturas tratadas com fervura prévia a 100 °C por 15 minutos.....	50
Tabela 8 – Resultados dos teores de ácido propiônico produzido durante a digestão anaeróbia das misturas submetidas à agitação durante o período de fermentação e correção do pH a cada 24 horas.....	51
Tabela 9 – Resultados dos teores de ácido propiônico produzido durante a digestão anaeróbia das misturas submetidas à correção de pH no início da fermentação.....	53
Tabela 10 – Resultados dos teores de ácido propiônico produzido durante a digestão anaeróbia das misturas submetidas à correção de pH a cada 24 horas.....	54
Tabela 11 – Resultados agrupados dos maiores teores de ácido propiônico (mg.L ⁻¹) produzidos em cada condição testada.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

AP – Ácido propiônico

AR – Açúcar redutor

CAR – Efluente de processamento de carnes

CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente

DA – Digestão anaeróbia

DQO – Demanda química de oxigênio

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FPV - Farinha de penas e vísceras

LAC – Efluente de laticínio

MIL – Milhocina

PEAD – Polietileno de alta densidade

PET – Polietileno tereftalato

RAÇ – Efluente da produção de ração animal

TDH – Tempo de detenção hidráulica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1. A agroindústria no Brasil.....	16
2.2. Digestão Anaeróbia.....	17
2.2.1. Acidogênese.....	20
2.3. Produção de ácidos orgânicos em reatores anaeróbios.....	21
2.3.1. Ácido propiônico (AP).....	22
2.3.1.1. Produção de ácido propiônico a partir de síntese química.....	23
2.3.1.2. Produção de ácido propiônico em reatores anaeróbios.....	24
2.4. Estratégias de controle operacional.....	26
2.4.1. Tratamento térmico preliminar.....	27
2.4.2. Influência do tempo de detenção hidráulica.....	27
2.4.3. Importância do pH.....	28
2.4.4. Efeito da temperatura.....	28
2.5. Vantagens da utilização de efluentes como matéria prima.....	29
2.6. Co-Digestão anaeróbia (CDA).....	29
2.7. Planejamento experimental de misturas.....	30
2.8. Características do substrato.....	31
2.9. Água residuária de indústria de processamento de milho (milhocina).....	32
2.10. Água residuária de indústria de ração animal.....	33
2.11. Água residuária do processamento de carnes.....	34
2.12. Água residuária de laticínios.....	35
3 OBJETIVOS.....	37
3.1. Objetivo geral.....	37
3.2. Objetivos específicos.....	37
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1. Material.....	38
4.1.1. Substratos.....	38
4.1.2. Fermentadores.....	39

4.2. Métodos.....	39
4.2.1. Planejamento experimental.....	39
4.2.1.1. Ensaio A - Composição da mistura de substratos.....	40
4.2.1.2. Ensaio B - Proporções de substratos nas misturas.....	41
4.2.1.3. Ensaio C – Avaliação do pH, agitação e fervura prévia do substrato na produção de AP.....	42
4.2.2. Análises realizadas.....	43
4.2.3. Análise estatística dos resultados.....	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1. Ensaio A – Estudo e obtenção da composição da mistura de substratos.....	45
5.2. Ensaio B – Estudo e obtenção das proporções de substratos nas misturas..	47
5.3. Ensaio C - Avaliação das variáveis pH, agitação e fervura prévia do substrato na produção de AP.....	49
5.3.1. Efeito da fervura prévia do substrato na produção de AP	50
5.3.2. Efeito da agitação na produção de ácido propiônico	51
5.3.3. Efeito da correção do pH na produção de ácido propiônico.....	52
5.3.4. Resultados agrupados dos teores de ácido propiônico produzido durante a digestão anaeróbia das misturas submetidas à todas as variações de condições aplicadas.....	55
6 CONCLUSÕES.....	57
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

1. INTRODUÇÃO

Os problemas que afligem a humanidade são vários, dentre eles está a busca por fontes de energia limpa e a produção de alimentos com a mínima ameaça aos ecossistemas. A partir deste contexto, tem havido uma crescente busca pela utilização de resíduos agroindustriais, como, por exemplo, bagaço de cana de açúcar, farelo de mandioca, polpa de tomate, entre outros. Diversos processos são desenvolvidos para seu aproveitamento, transformando-os em compostos químicos e produtos com alto valor agregado como álcool, enzimas, ácidos orgânicos e aminoácidos. A utilização em bioprocessos, além de minimizar a quantidade de resíduos que necessitam de tratamento, favorece a solução do problema de poluição. A utilização de substratos alternativos de baixo custo em processos fermentativos, como os resíduos agroindustriais, permite a redução dos custos de produção de ácido propiônico, minimizando problemas ambientais, pois auxilia na destinação desses resíduos. À medida que novas tecnologias são disponibilizadas, novos resíduos são gerados, e outros deixam de ser. Além do mais, alguns resíduos podem passar dessa condição, para a condição de matéria-prima.

A utilização de processos biotecnológicos na substituição de processos petroquímicos tornou-se uma alternativa inovadora de projeto, e um dos grandes desafios é a descoberta de processos e rotas que possibilitem fazer uso de matérias-primas relativamente baratas em contraposição com o crescente custo do petróleo, para o desenvolvimento de processos viáveis. Através da conversão biológica de matéria orgânica é possível obter uma variedade de produtos finais, incluindo ácidos orgânicos e biogás, o qual pode ser usado na geração de energia para aquecimento e eletricidade.

Relatos da utilização de bioprocessos aplicados a diferentes tipos de resíduos são facilmente encontrados na literatura, porém a abordagem de planejamento experimental fazendo uso de misturas ainda é pouco explorada.

Quando não se sabe de antemão qual é a proporção ideal de cada componente, devemos realizar experimentos. Nesses experimentos são arbitradas várias combinações de proporções dos componentes e então observados os valores correspondentes da característica de qualidade, tais valores são denominados respostas do experimento. O uso desta ferramenta possibilita uma economia de tempo, reagentes, e ainda promove uma agregação de valor aos rejeitos, uma vez

que os produtos gerados possuem elevado interesse comercial, como é o caso do ácido propiônico.

Os ácidos orgânicos são amplamente utilizados na indústria alimentícia, sendo assim, sua produção a partir de bioprocessos apresenta relevância, uma vez que o processo de digestão anaeróbia é menos oneroso quando comparado à síntese química atualmente utilizada.

Neste contexto, esta dissertação tem como objetivo a valorização e aproveitamento biotecnológico da mistura de resíduos gerados no processamento de milho, frigoríficos, laticínios e produção de ração animal para a produção de ácido propiônico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A prática de descartar efluentes, tratados ou não, em corpos d'água superficiais é a solução normalmente adotada no mundo inteiro para o descarte de resíduos líquidos. No Brasil, o lançamento das águas residuárias nos corpos d'água receptores devem atender à Resolução nº 357/2005 do CONAMA, a qual estabelece os padrões de qualidade de lançamento e do corpo d'água (CONAMA, 2005).

Os efluentes das indústrias alimentícias apresentam grande diversidade em suas características físicas, químicas e microbiológicas de acordo com o produto e a tecnologia de fabricação utilizada, devendo cada indústria tratar seus efluentes e projetar seu próprio sistema de tratamento. Contudo, a maioria das operações unitárias empregadas em uma estação de tratamento de efluentes não varia, sendo o tratamento baseado em processos físicos, químicos e biológicos. Os processos biológicos de remoção da matéria orgânica envolvem a participação de microrganismos presentes no sistema que irão converter esse material em biomassa e/ou biogás.

2.1. Agroindústria no Brasil

O setor agrícola desempenha um papel fundamental na economia brasileira, tanto em escala regional como nacional (MORAES, 2009). Segundo o IBGE aproximadamente 23% da população (43 milhões de pessoas) trabalham com o agronegócio brasileiro (IBGE, 2012).

Todo o setor, inclusive o agronegócio, é responsável por até um quarto do PIB do país. Atualmente, o Brasil tem um elevado superávit comercial na agricultura e tornou-se um dos maiores exportadores mundiais de soja, açúcar, café, laranja, frango e carne bovina (MARTINELLI et al. 2011).

O processo de desenvolvimento agrícola trouxe consigo grandes custos à sociedade, como o desmatamento, a perda de biodiversidade, a degradação de corpos d'água e da qualidade do ar e aumento do uso de produtos químicos tóxicos, os quais são amplamente citados na literatura, mas não entram no cálculo do preço do crescimento econômico (NEPSTAD et al. 2009).

Há alguns anos a sociedade não reconhecia o setor agroindustrial como gerador de resíduos. Portanto, estudos com rotas tecnológicas que evitam o desperdício e valorize a utilização de resíduos devem ser intensificados para que desperdícios sejam evitados (SENHORAS, 2004; ISRAEL, 2005).

O interesse na biotransformação de resíduos tem aumentado, tendo em vista que se trata de um material de baixo custo e altamente renovável. Deste modo, a utilização de resíduos pode ser um fator relevante para a produção de subprodutos e diminuição nos custos de produção, além de diminuir o impacto sobre o meio ambiente, devido à sua disposição inadequada.

Como resultado dos esforços da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), o Brasil vem melhorado a produtividade agrícola, e como demanda, o mercado doméstico de produtos industrializados, com valor agregado, como carnes e laticínios, têm expandido frente ao crescimento econômico proveniente de programas de redução da pobreza (BARROS, 2008). Além disso, a ênfase do governo brasileiro no desenvolvimento de fontes de energia renováveis abre um novo mercado para pesquisas que visam o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais (CERQUEIRA LEITE et al. 2009).

2.2. Digestão Anaeróbia

A digestão anaeróbia (DA) é a degradação biológica da matéria orgânica realizada pela ação de microrganismos em condições anaeróbias; trata-se de um processo natural, realizado por bactérias anaeróbias facultativas e estritas (MIRZOYAN et al. 2010).

De maneira geral, a digestão anaeróbia pode ser realizada em qualquer uma das três faixas de temperatura: termofílica (45-65 °C), mesofílica (25-45 °C) e psicofílica (10-25 °C) (MARCHAIM, 1992). A DA tem sido muito utilizada na estabilização e redução de águas residuárias, principalmente devido à simplicidade de operação, reduzida geração de lodo, produção de biogás e possibilidade de elevadas taxas de carregamento (APPELS et al. 2008).

A Figura 1 apresenta o esquema da DA proposto por Mosey (1983). Segundo o autor, são quatro os principais grupos de microrganismos envolvidos na conversão de glicose a outros compostos, os quais consistem em: bactérias

acidogênicas, bactérias acetogênicas, arqueias metanogênicas acetoclásticas e arqueias metanogênicas hidrogenotróficas.

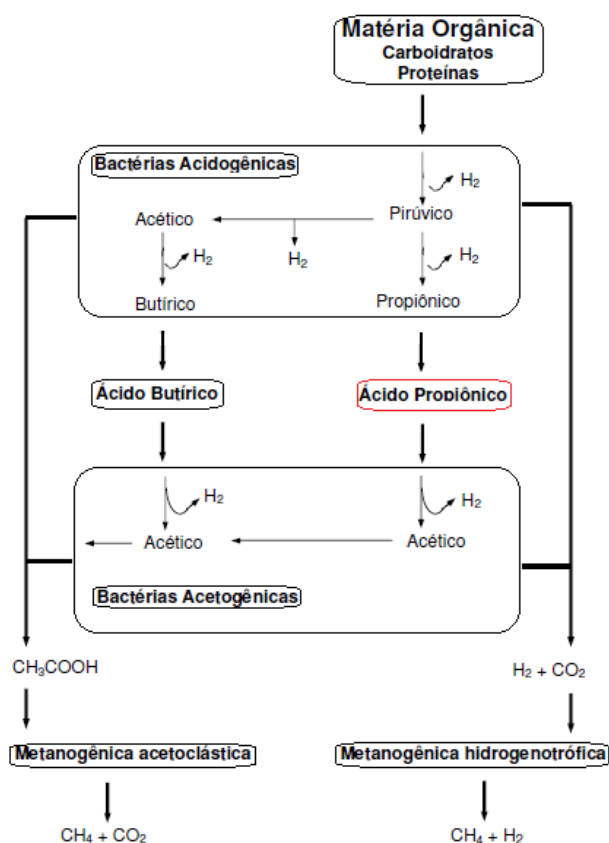
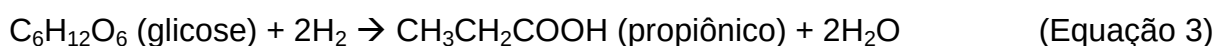
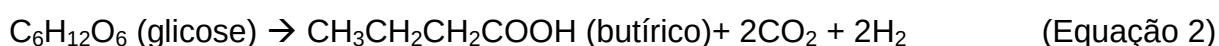
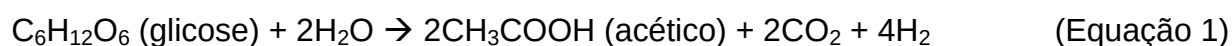


Figura 1. Processo de digestão anaeróbia

Fonte: Mosey, 1983 (adaptado).

A hidrólise da glicose pelas bactérias acidogênicas, de mais rápido crescimento, geram os ácidos acético, propiônico e butírico, de acordo com as reações:



O desvio do metabolismo da glicose em direção ao ácido butírico reduz tanto a produção de hidrogênio quanto o teor ácido no sistema. A formação de ácido

propiónico requer o consumo de hidrogênio e assim há o controle do potencial redox durante as sobrecargas (ZHANG e YANG, 2009).

As arqueias metanogênicas acetoclásticas operam conjuntamente com as bactérias formadoras de ácidos no controle da concentração de ácido acético e do pH da fermentação. As velocidades de crescimento das arqueias são relativamente baixas (tempo de duplicação de 2 a 3 dias a 35°C) comparadas às velocidades de crescimento das bactérias formadoras de ácido (tempo de duplicação de 2 a 3 horas a 35°C).

Alternativamente, a glicose pode ser convertida em piruvato, que é produzido a partir da conversão de lactato pela redução de NAD^+ . Essa via metabólica é denominada glicólise anaeróbica, pois pode ocorrer sem a participação de oxigênio. A glicólise anaeróbica permite a produção de ATP em células em que o oxigênio esteja em quantidade insuficiente (CHAMPE et al. 2009). Esse comportamento favorece a ação das bactérias propiônicas, uma vez que o processo se dá em anaerobiose, não ocorrendo pela ação das mitocôndrias (Figura 2).

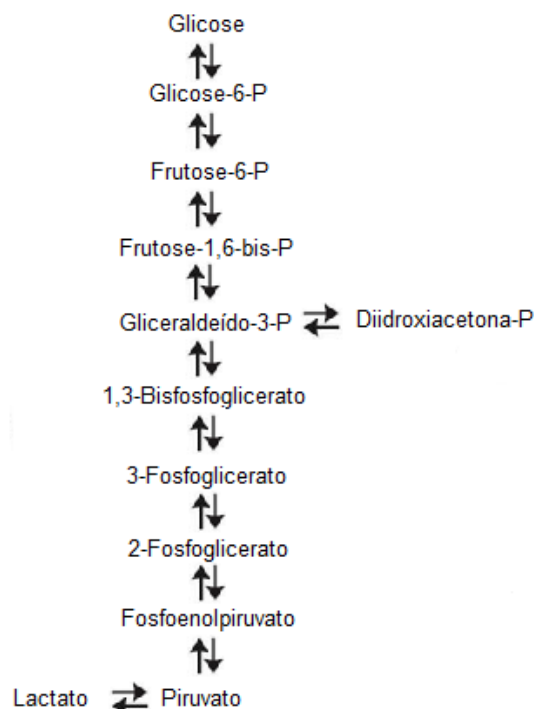


Figura 2. Via metabólica da glicólise anaeróbica

Fonte: Champe et al. (2009).

Apesar de ser imprescindível a conversão do lactato a piruvato para continuação da via metabólica, não há consumo de energia na forma de ATP, como acontece no processo de digestão anaeróbia partindo da glicose, uma vez que se faz necessária a sua fosforilação (LEHNINGER et al. 2002).

2.2.1. Acidogênese

Na fase de acidogênese, os produtos gerados pelas reações de hidrólise são absorvidos por bactérias acidogênicas fermentativas e excretados como ácidos graxos voláteis, tais como ácido acético, fórmico, propiônico, butírico e láctico, além do etanol (BENGTSSON et al. 2008) e de compostos minerais como dióxido de carbono, gás hidrogênio, amônia, ácido sulfídrico, etc. Nesta etapa a maioria das bactérias são anaeróbias obrigatórias, sendo possível existir também espécies facultativas, onde metabolizam o material orgânico pela via oxidativa.

Numerosas espécies de microrganismos são conhecidas por fermentarem compostos orgânicos dissolvidos, em condições anaeróbias, a ácidos orgânicos, principalmente a ácidos acético, propiônico, butírico e láctico, além de outros produtos da fermentação, como álcoois (BENGTSSON et al. 2008). Esses microrganismos apresentam as mais elevadas taxas de crescimento do consórcio microbiano e, neste contexto, a etapa acidogênica só será a limitante do processo se o material orgânico for dificilmente hidrolisado.

Como verificado no sub item 2.2., a equação 1 permitiu formar dois mols de ácido acético por mol de glicose. A equação 2 permite que o sistema absorva parcialmente a sobrecarga orgânica, derivando parte da produção de ácido acético a butírico, na proporção de 1 mol de ácido por mol de glicose, o que reduz a queda de pH do sistema. Além disso, a produção de hidrogênio reduz à metade, diminuindo a velocidade de acúmulo deste no meio. Na equação 3, a pressão parcial de hidrogênio é aliviada pela transferência de hidrogênio às bactérias produtoras de AP (FORESTI et al. 1999).

As diversas características favoráveis da tecnologia anaeróbia - baixa produção de sólidos; baixo consumo de energia; baixos custos de implantação e operação; tolerância a elevadas cargas orgânicas; e possibilidade de operação com elevados tempos de retenção de sólidos e baixos tempos de detenção hidráulica,

conferem aos reatores anaeróbios um grande potencial de aplicabilidade no tratamento de águas residuárias concentradas e diluídas (CHERNICHARO, 2007). Sendo, portanto considerada como uma importante alternativa para o tratamento de vários tipos de resíduos que possuam elevadas concentrações de material orgânico, devido aos baixos custos operacionais e também por se tratar de uma alternativa para a substituição de combustíveis fósseis, minimizando a emissão de gases responsáveis pelo efeito estufa (TICM, 2007).

Segundo Pereira et al. (2008), em um país de clima tropical como o Brasil, processos anaeróbios são considerados uma alternativa segura e econômica para o tratamento de efluentes, isso ocorre devido a pouca variação climática que mantém a temperatura sempre adequada para as bactérias.

2.3. Produção de ácidos orgânicos em reatores anaeróbios

As estratégias para assegurar uma efetiva produção de ácidos orgânicos consistem em garantir e aperfeiçoar as condições operacionais do sistema. Uma vez que a produção de hidrogênio, dióxido de carbono e ácidos orgânicos ocorre em uma fase intermediária da digestão anaeróbia, é necessário que o processo seja interrompido nessa fase para que os produtos gerados não sejam consumidos na etapa posterior (AQUINO e CHERNICHARO, 2005).

Na produção de ácidos orgânicos por processos anaeróbios, diversos estudos utilizaram culturas puras e culturas mistas de microrganismos anaeróbios atuantes na conversão de carboidratos. Ainda, aliado à tecnologia de tratamento de inóculo, diversos autores operaram seus sistemas em condições de pH ácido para inibir a atividade metanogênica durante os experimentos (ZHANG et al. 2006; YU e FANG, 2001; LIU et al. 2002; YU et al. 2003).

Além disso, a produção de hidrogênio e ácidos orgânicos é diretamente influenciada por parâmetros operacionais como o pH (VAN GINKEL et al. 2001; FANG e LIU, 2002; HORIUCHI et al. 2002), TDH (WU et al. 2003; VAN GINKEL e LOGAN, 2005; LIN et al. 2006), concentração de substrato (FANG e LIU, 2002; FAN et al. 2004; VAN GINKEL e LOGAN, 2005) e temperatura (GAVALA et al. 2005).

2.3.1. Ácido Propiônico (AP)

Trata-se de uma substância pura, incolor, possui odor rançoso; é um produto líquido a temperatura ambiente e apresenta solubilidade em água e em alguns solventes orgânicos (SUPERQUIMICA, 2008).

O ácido propiônico é um produto químico, largamente utilizado como matéria prima em diferentes setores industriais (KERJEAN et al. 2003), se apresenta como um agente fungistático natural quando incorporado à ração ou qualquer outro produto alimentício (RODRIGUES et al. 2007). O AP e seus sais de cálcio, sódio e potássio são comumente usados como conservantes em alimentos e também como intermediário na síntese de fibras de celulose e de herbicidas (ZHU et al. 2010) e produtos farmacêuticos (ZANG e YANG, 2009).

Os ésteres de AP são utilizados em indústrias de perfumes, o propionato de celulose é usado como termoplástico na indústria plástica (GOSWAMI e SRIVASTAVA, 2000).

O AP pode ser produzido por síntese química ou a partir de fermentação biológica. Atualmente, o AP é sintetizado principalmente a partir de petróleo (GOSWAMI e SRIVASTAVA, 2000). No entanto, o crescente aumento do preço do petróleo e a busca por produtos obtidos através de rotas biológicas têm motivado o interesse industrial pela produção de ácido propiônico a partir de matérias-primas renováveis.

Estudos sobre a biossíntese de AP têm ganhado relevância, pois além de não utilizar petróleo, o processo é ecologicamente correto, no entanto, o alto custo da síntese biológica torna esse processo não muito atrativo. Esta é uma das questões mais importantes confrontando a biossíntese de AP, uma vez que a produção de ácido chega a cerca de 192.000 toneladas por ano (EKMAN e BÖRJESSON, 2011).

Além disso, processos convencionais de fermentação de ácido propiônico são limitados pela baixa produtividade, rendimento e concentração final devido à forte inibição por produtos metabólicos (GOSWAMI e SRIVASTAVA, 2001).

Os custos de produção biológica de AP podem ser significativamente reduzidos pelo uso de fontes alternativas de nutrientes, com baixo custo, bem como através da obtenção de altos rendimentos em produtos (GALLERT e WINTER, 2002).

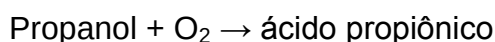
Uma possível alternativa de síntese seria a utilização de subprodutos industriais, para serem utilizados como substrato. Essa estratégia diminui os custos da produção e, conseqüentemente, reduz a poluição causada por esses rejeitos quando lançados no meio ambiente. A otimização e produção de AP usando materiais e processos mais baratos é um interessante tema de pesquisa, uma vez que este ácido é um produto com alto valor (MOCKAITIS et al. 2011).

2.3.1.1. Produção de ácido propiônico a partir de síntese química

O ácido propiônico é produzido atualmente pela oxidação da fase líquida do propano ou propionaldeído (PAIK e GLATZ, 1994; PLAYNE, 1985). Pode ser obtido pelas seguintes rotas químicas (CORAL, 2008).

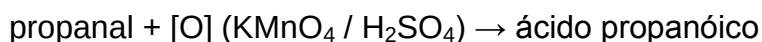
- Oxidação de propanol:

Na presença de cobalto ou manganês, esta reação ocorre rapidamente em temperaturas de 40 a 50 °C (OZADALI et al. 1996; PLAYNE, 1985), com a seguinte reação:



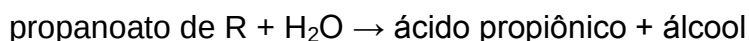
- Oxidação de propanal

A seguinte reação representa esta rota:



- Hidrólise de ésteres

A hidrólise dos ésteres pode ser representada da seguinte forma:



- Síntese ou processo oxo

O processo oxo faz uso do etileno e do gás de síntese, de acordo com as seguintes reações:



Já a síntese biológica tem como objetivo possibilitar um processo economicamente competitivo quando comparada com a síntese química, inclusive fazendo uso de matérias primas renováveis e de preferência que sejam subprodutos, como é o caso dos resíduos agroindustriais.

2.3.1.2. Produção de ácido propiônico em reatores anaeróbios

Considerando-se que o processo de digestão anaeróbia pode ser dividido, de maneira resumida, em duas grande etapas, ou seja, acidogênese e metanogênese, a obtenção de ácidos orgânicos, mais especificamente de ácido propiônico, se torna possível com a interrupção do processo no final da primeira etapa, a acidogênese, e evitar que os compostos produzidos sejam consumidos durante a metanogênese (AQUINO e CHERNICHARO, 2005).

A etapa fermentativa da digestão anaeróbia de resíduos orgânicos (etapa acidogênica) é o processo que possibilita a produção de ácido propiônico. Nesta etapa, os microrganismos acidogênicos decompõem a matéria orgânica em CO_2 , H_2 e ácidos graxos voláteis de cadeia curta.

Cálculos mostram que o AP produzido a partir de bioprocessos pode reduzir a menos de 60% o aquecimento global, quando comparado à obtenção de AP fóssil. Isto é principalmente devido à entrada de grande quantidade de energia renovável (EKMAN e BÖRJESSON, 2011).

A produção do ácido propiônico, por via fermentativa, pode ser realizada a partir de vários substratos, tais como: glicose, sacarose, lactose e lactato, além do glicerol. A rota do processo dependerá da combinação de substrato e do microrganismo que será utilizado. A rota fermentativa para produção do ácido propiônico proveniente das diversas fontes de carbono pode ser representada pela Figura 3.

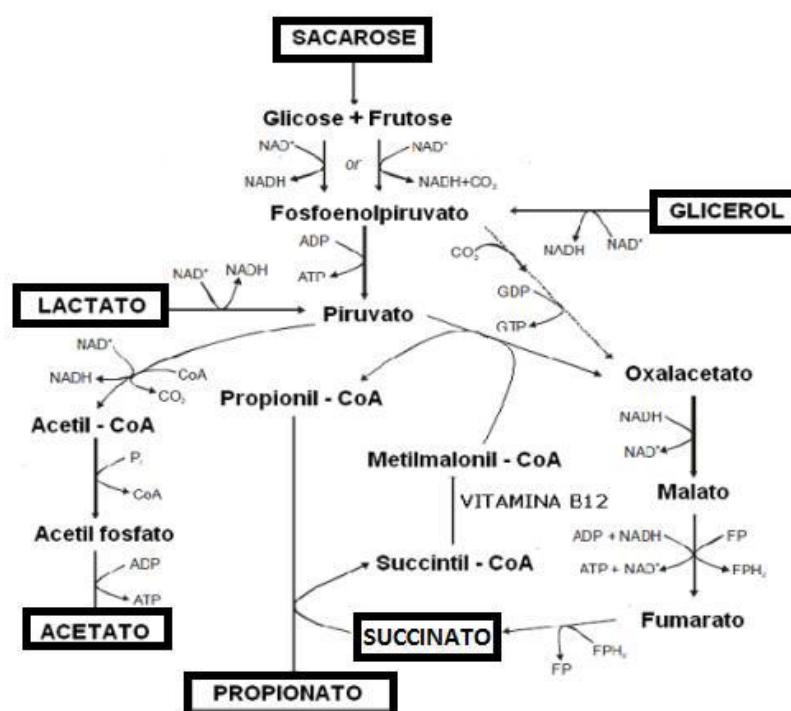


Figura 3 - Rotas de produção de ácido propiônico e produtos de fermentação

Fonte: SUWANNAKHAM (2005) - modificado

Vários fatores podem afetar a produção de ácidos orgânicos em reatores anaeróbios, tais como, o tipo de cultura: mista ou pura; o pH; temperatura; material suporte para o crescimento da biomassa; configuração do reator; concentração de substrato; e fonte de matéria orgânica: sacarose, celulose, efluente doméstico ou glicose (LEITE et al. 2008).

A conversão da glicose em AP é assumida como sendo 15% menor do que a conversão a partir de glicerol, o que significa que um quilograma de AP requer 1,7 kg de glicose em comparação com 1,4 kg de glicerol (BARBIRATO et al. 1997). Sendo assim, metabólitos mais reduzidos, como o glicerol, oferecem maior rendimento quando utilizados na via fermentativa (ZHANG e YANG, 2009).

A maioria dos estudos relatados na literatura utilizam como inóculo a propionibactéria, e diversas fontes de carbono. A Tabela 1 apresenta algumas fontes da literatura com relação a produção de ácido propiônico para diversos substratos, microrganismos e condições de processo.

Tabela 1 - Descrição da produção do ácido propiônico da literatura

Autores (ano)	Substrato	Processo Fermentativo	Microorganismo	Condições	Produtividade do AP
Goswani (2000)	Lactose (47,7 g/L)	Batelada	<i>P.acidipropionici</i> (ATCC 4875)	T=30°C;pH=6,5	0,23 g/(L.h)
	Lactose (47,7 g/L)	Batelada Batelada alimentada	/ <i>P.acidipropionici</i> (ATCC 4875)	T=30°C;pH=6,5	0,31 g/(L.h)
Barbirato (1997)	Glicerol (20 g/L)	Batelada	<i>P. acidipropionici</i> (ATCC 25562)	T=30°C;pH=6,8	0,36 g/(L.h)
	Ácido lático (20 g/L)	Batelada	<i>P. acidipropionici</i> (ATCC 25562)	T=30°C;pH=6,8	0,35 g/(L.h)
	Glicose (20 g/L)	Batelada	<i>P. acidipropionici</i> (ATCC 25562)	T=30°C;pH=6,8	0,28 g/(L.h)
Himmi et al. (2000)	Glicose (20 g/L)	Batelada	<i>P.acidipropionici</i> (ATCC 25562)	T=30°C;pH=7,0	0,24 g/(L.h)
	Glicose (20 g/L)	Batelada	<i>P.freudenreichii</i> <i>ssp. Shermanii</i> (ATCC 9614)	T=30°C;pH=7,0	0,07 g/(L.h)
	Glicerol (20 g/L)	Batelada	<i>P.acidipropionici</i> (ATCC 25562)	T=30°C;pH=7,0	0,42 g/(L.h)
	Glicerol (20 g/L)	Batelada	<i>P.freudenreichii</i> <i>ssp. Shermanii</i> (ATCC 9614)	T=30°C;pH=7,0	0,18 g/(L.h)
Sreethawong et al. (2010)	Manipueira (20 gO ₂ /L)	Batelada	<i>Sem presença de inóculo</i>	T=37°C; pH=5,5	0,42 g/(L.h)
Leite et al. (2008)	Glicose (4g/L)	Horizontal de biomassa imobilizada	<i>microrganismos obtidos da fermentação natural de água residuária sintética</i>	T=30°C; pH=3,3-4,0	0,072g/(L.h)

2.4. Estratégias de controle operacional

Com a finalidade de viabilizar a produção de AP são aplicadas estratégias de controle operacional dos reatores, como as apresentadas a seguir.

2.4.1. Tratamento térmico preliminar

A maioria dos estudos sobre produção de ácidos orgânicos em reatores anaeróbios realiza o pré tratamento do lodo para selecionar bactérias acidogênicas formadoras de endósporos para um bom desempenho do sistema. Este processo também visa a eliminação de arqueias metanogênicas consumidoras de ácidos orgânicos.

Vários métodos para o preparo de um inóculo acidogênico têm sido citado, no entanto, o tratamento térmico é o mais utilizado (IYER et al. 2004; VAN GINKEL e LOGAN, 2005; LIN et al. 2006; KIM et al. 2006; SANO et al. 2006).

Segundo a literatura, os parâmetros do tratamento térmico variam de acordo com a fonte do lodo, com temperaturas variando de 90 a 105°C, e tempos de exposição de 10 minutos a 2 horas (WANG e WAN, 2008; SREETHAWONG et al. 2010).

2.4.2. Influência do tempo de detenção hidráulica

Alguns autores apresentam como método de inibição da metanogênese a operação em baixos tempos de detenção hidráulica (TDH). Com este tipo de procedimento ocorre síntese de ácidos orgânicos pelas bactérias acidogênicas numa velocidade maior do seu consumo pelas arqueias metanogênicas. Desse modo o pH do meio baixa a valores inibitórios ao desenvolvimento das metanogênicas.

Chang et al. (2002) operaram seu reator com variação de TDH de 30 minutos a 5 horas; alcançando concentrações de até 400 mg/L de ácido propiônico utilizando esgoto doméstico como substrato. Já Lin et al. (2009), investigando a produção de H₂, fez uso de TDH entre 2 e 4 horas e obteve aproximadamente 600 mg/L de ácido propiônico, utilizando substrato glicolítico. Leite et al. (2008), também utilizando substrato glicolítico com concentração de 2000mg/L, obtiveram concentrações de até 120 mg/L de ácido propiônico com TDH de 2 horas.

2.4.3. Importância do pH

O pH também é um parâmetro operacional de grande importância na produção biológica de AP pois, conforme constataram Sreethawong et al. (2010), a concentração de hidrogênio e ácidos orgânicos produzidos são diretamente afetadas pelo pH. Em trabalho desenvolvido por Fang e Liu (2002), que consistiu na operação de um reator em batelada degradando glicose anaerobicamente, não houve consumo de hidrogênio por arqueias metanogênicas em condições de operação em pH menores que 5,5. Os autores observaram que a manutenção do sistema em pH 5,5 não permitiu a produção de metano no sistema.

Já Mockaitis et al. (2011) afirmam que a diversidade microbiana e valores de pH superiores a 5,5 estimulam a produção de AP.

2.4.4. Efeito da Temperatura

A digestão anaeróbia é geralmente realizada em temperaturas na mesofílica (30 - 40 °C) e termofílica (50 - 60 °C). Segundo Kim et al. (2002) a digestão termofílica é muito mais rápida que a mesofílica porque as taxas de reação bioquímica aumentam com a temperatura. Entretanto, conforme observado por Zhang e Shen (2005), a produção de ácido propiônico na faixa mesofílica é a mais indicada para o processo, principalmente devido à condição próxima do ideal (35°C) para o funcionamento dos catalisadores bioquímicos.

Ghanimeh et al. (2012), relataram em suas pesquisas que a digestão anaeróbia operada em condições termofílicas é impedida por dificuldades operacionais e problemas de instabilidade, muitas vezes causada pela carência de grande quantidade de microrganismos aclimatados para a etapa de partida do digestor, sendo assim a co-digestão torna-se uma alternativa interessante para ser avaliada em condições mesofílicas, pois ocorre um aumento do consórcio microbiano, resultado da mistura de substratos.

A agitação é algumas vezes utilizada durante processos de digestão anaeróbia, pois promove uma distribuição dos microrganismos e dos nutrientes de maneira mais uniforme, e ainda auxilia em processos de transferência de calor e massa (HOFFMANN et al. 2008; VAVILIN e ANGELIDAKI, 2005).

2.5. Vantagens da utilização de efluentes como matéria prima

A disposição de efluentes biodegradáveis ao meio ambiente, como os resíduos da indústria alimentícia, caracteriza um sério problema ambiental e econômico no mundo todo (LIM et al. 2008).

A obtenção de uma série de produtos a partir de subprodutos de indústrias de alimentos, torna o processo de tratamento mais econômico e sustentável. A acidogênese de resíduos da indústria de alimentos gera ácidos orgânicos voláteis. Acetato, butirato e propionato são os principais produtos da acidogênese e a sua concentração é afetada por vários parâmetros como a natureza do substrato e sua concentração, tempo de detenção hidráulica (TDH), demanda química de oxigênio (DQO), temperatura e pH (LIM et al. 2008).

No aspecto econômico, as águas residuárias constituem matérias-primas que não envolvem custos na sua produção. A sustentabilidade do processo biológico aplicado às águas residuárias pode ainda ser otimizada por meio da combinação da fermentação com a produção de subprodutos de alto valor agregado, como ácidos orgânicos e biopolímeros (HAWKES et al. 2002).

2.6. Co-Digestão anaeróbia (CDA)

Vários autores trabalham com a possibilidade de aperfeiçoar a digestão anaeróbia consorciando resíduos orgânicos a outros resíduos mais ricos em microrganismos e matéria orgânica, tais como lodo de esgoto sanitário, esterco bovino, de galinha, entre outros. Segundo Alvarez e Lidén (2008), a co-digestão anaeróbia é a decomposição de dois ou mais tipos de substratos orgânicos tratados simultaneamente.

Trabalhos realizados sobre a CDA, utilizando uma mistura de dez componentes, incluindo resíduos de frutas, verduras e resíduos de matadouros, em diferentes proporções mostraram que em todos os casos, os resultados encontrados foram melhores que os substratos tratados individualmente. No entanto, o tratamento ou fermentação conjugado de diferentes resíduos deve ser criteriosamente avaliado quanto à viabilidade técnica (RUGHOUNDUN et al. 2012).

O desempenho do processo de CDA é muito dependente dos tipos e da composição do material orgânico a ser degradado, além disso, esta técnica permite o uso de instalações já existentes reduzindo assim os custos de implantação (GÓMEZ et al. 2006). Sosnowski et al. (2008) relatam que a variedade de substratos a ser estabilizada torna o processo de digestão anaeróbia mais estável, propiciando além do aproveitamento energético, a proteção do meio ambiente.

A CDA apresenta como benefícios a diluição de combinações tóxicas dos resíduos, o equilíbrio de nutrientes, o consórcio de microrganismos e o aumento da carga de matéria orgânica biodegradável (SOSNOWSKI et al. 2003).

2.7. Planejamento experimental de misturas

Mistura é aqui definida como sendo uma formulação composta por dois ou mais componentes, cuja composição é variável e independente(pelo menos em relação a um dos componentes). Em uma mistura a quantidade de cada componente é dada em proporção, resultando que a soma de todos eles deve ser sempre igual a unidade, portanto tais componentes (variáveis) não são independentes como em planejamentos fatoriais.

O objetivo principal de um planejamento com misturas é descrever o comportamento de propriedades de sistemas multicomponentes, a partir de um número limitado de ensaios.

Uma importante aplicação do planejamento de experimentos é na composição de misturas. O desenvolvimento de formulações é parte fundamental das atividades de diversas indústrias, entre elas as de alimentos. As empresas alimentícias têm substituído processos de otimização da qualidade do produto que se utiliza de tentativa e erro, onde se varia a proporção de uma matéria prima de cada vez na mistura, pelo planejamento experimental de misturas. A utilização dessa ferramenta estatística possibilita a economia de tempo e reagentes, e permite avaliar o estudo da interação entre as matérias primas (HEINSMAN e MONTGOMERY, 1995).

Um experimento com mistura é aquele no qual dois ou mais ingredientes são misturados para formar um produto final. A resposta a ser medida constitui-se

numa propriedade intensiva da mistura, sendo função apenas das proporções dos componentes presentes (seja em massa, volume ou número de mols) e não da quantidade total da mistura (NUNES, 1998).

Para o planejamento de tais experimentos, devem-se selecionar algumas composições possíveis da mistura, as quais serão ensaiadas a fim de se medir o valor da variável de resposta de interesse.

A abordagem do projeto experimental de misturas, aliada à otimização de suas características de qualidade, possui aplicação potencial em uma larga variedade de sistemas industriais, inclusive no aproveitamento de diferentes tipos de resíduos (CAMPOS et al. 2007).

2.8. Características do substrato

Inúmeros trabalhos publicados na área usam substratos sintéticos na alimentação de reatores fermentativos, os quais contêm sacarose como fonte de carbono orgânico e fazem uso de uma suplementação inorgânica, que traz como referência na maioria dos casos, as formulações realizadas por Bahl et al. (1982).

Sreethawong et al. (2010), ao estudarem a fermentação de águas residuárias provenientes do processamento de mandioca, realizaram análises preliminares sobre os parâmetros de operação do reator anaeróbio, a proporção entre matéria carbonácea e nitrogenada e a composição de ácidos orgânicos. Os resultados obtidos mostraram que a produção de AP foi maior em ensaios com proporções de C:N em 100:4,4, cuja DQO era de 30 g/Ld, ensaios em que foram aplicadas proporções de C:N de 100:2,2 apresentaram menores níveis de produção de AP.

A adição de nutrientes geralmente leva a uma melhora significativa dos processos fermentativos. Porém, alguns desses nutrientes não são economicamente viáveis, dentre eles destaca-se fontes de nitrogênio, por isso ocorre uma grande busca por matérias primas provenientes de fontes renováveis e até mesmo de resíduos agroindustriais (CAPELLARI, 2010).

2.9. Água residuária de indústria de processamento de milho (milhocina)

Durante o processamento de grãos de milho há geração de água residuária denominada água de maceração, milhocina ou o termo em inglês *corn steep liquor*.

Segundo a ABIMILHO (2012), o Brasil encontra-se em quarto lugar na produção mundial de milho nas safras 2011/2012; com um montante de 62 milhões de toneladas; o que significa que uma quantidade elevada de resíduos são gerados em seu processamento.

Embora os resíduos agroindustriais sejam ricos em carboidratos, sua utilização é limitada devido à baixa concentração de proteína e a pobre digestibilidade, decorrente da presença de resíduos celulósicos (JOHN et al. 2007).

Pesquisas atuais estão centradas na procura efetiva de fontes de nitrogênio e novas técnicas de fermentação. Atualmente, o principal uso da milhocina tem sido a alimentação animal, onde, após ser evaporada e concentrada a um xarope de 50% de sólidos, tem sido comercializada, principalmente, como suplemento alimentar para gados. A milhocina possui vitaminas, minerais e carboidratos eficazes como intermediários para a fermentação e, por isso, seu uso tem sido sugerido para a produção de ácidos orgânicos (FORMANEK, 1998; PAREKH et al. 1999, MADDIPATI et al. 2011).

Loss et al. (2009), ao caracterizarem amostras de milhocina, encontraram teores acima de 1000 mg.L^{-1} de nitrogênio total e DQO acima de $14000 \text{ mg O}_2.\text{L}^{-1}$, portanto a milhocina, é uma fonte potencialmente útil de substituição de nitrogênio.

Segundo Hoch (1997), mesmo depois de todos os processos de industrialização do milho, a milhocina ainda é economicamente atrativa, e os estudos já realizados mostram resultados satisfatórios com a sua utilização como meio de crescimento bacteriano, devido, justamente, ao elevado teor de nitrogênio presente.

2.10. Água residuária de indústria de ração animal

No ano de 2009, no Brasil, cerca de 90% dos alimentos produzidos para animais de companhia eram destinados para cães. Com o aumento significativo da produção de *pet food* desde os anos de 1990, as empresas buscam desenvolver diferenciais qualitativos em seus produtos. Em 2008, os produtores de palatilizantes para ração animal depararam-se com a subida de preços de matérias primas e foram obrigados a absorver esse aumento em seus produtos ou se readaptar de alguma maneira (CELESTINO, 2009). Desse modo, a utilização de subprodutos da agroindústria como matéria prima para a fabricação de ração animal é primordial para a viabilizar a concorrência comercial entre as empresas.

A produção de palatilizantes para ração animal utiliza como matéria prima os subprodutos gerados no abate e processamento de suínos, frangos e perus. Sendo os subprodutos constituídos por penas, vísceras e descarte de carcaça animal.

A empresa cedente do efluente em questão, atua na área de processamento de subprodutos de frigorífico de aves e suínos, produzindo farinhas, óleos e palatilizantes. Disponibiliza no mercado cinco tipos de produtos, dentre estes gorduras e farinhas, além de possuir uma planta produtora de palatilizantes destinados aos segmentos *pet food*, todos devidamente registrados nos órgãos competentes.

A fabricação da farinha de penas e vísceras, denominada pela empresa de FPV, é feita em digestores à alta pressão e temperatura. Carcaças descartadas durante o controle de qualidade dos frigoríficos também podem entrar nesta formulação, desde que sua inclusão não altere de maneira significativa a composição estipulada para o produto em questão (BELLAYER et al. 2000).

No processo de digestão ocorre a cocção dos ingredientes com concomitante remoção da água e separação da gordura. A fração sólida, depois de sair pelo digestor, é moída e peneirada (BELLAYER et al. 2000).

Durante esse processo há a geração de efluentes provenientes da água de lavagem de equipamentos, com composição semelhante à do produto final, ou seja, basicamente proteica.

2.11. Água residuária do processamento de carnes

Segundo Sena (2009), o Brasil é o segundo maior produtor de carne industrializada do mundo, e um dos maiores desafios do setor é a busca por novos mercados, visto que a qualidade dos rebanhos e a produtividade crescem consideravelmente a cada ano.

A agroindústria de carnes possui um elevado potencial poluidor de corpos d'água, pois os efluentes gerados apresentam alto teor de matéria orgânica devido à presença de sangue, urina, proteína solubilizada e restos de vísceras e carnes (CUETOS et al. 2008). Os efluentes de indústrias de processamento de carnes e de abatedouros frigoríficos são compostos exclusivamente por material orgânico que podem ser tratados por processos biológicos, uma vez que contêm elevadas concentrações de matéria orgânica facilmente biodegradável, alcalinidade e concentrações apropriadas de fósforo (BEUX et al. 2007, BIGGS et al. 2000).

A indústria de carnes possui duas correntes de água, uma chamada de “linha vermelha”, que pode ser aproveitada, a qual carrega resíduos do abate, como vísceras, pêlos e óleos. A recuperação desses materiais geralmente envolve subprodutos que servem na maioria das vezes como ração animal, porém, com acidez controlada e baixa contaminação. E a água não aproveitável, chamada de “linha verde”, com excrementos, argila, areia e outros resíduos sem valor industrial, este resíduo tem basicamente uma destinação agronômica (TRITT E SCHUCHARDT, 1992).

O aproveitamento de subprodutos e a destinação dos resíduos tem se tornado um passo onerante para as empresas de pequeno e médio porte, gerando assim um desequilíbrio na concorrência com grandes empreendimentos.

A indústria de carnes vem usando de forma eficiente os seus subprodutos, transformando-os em produtos comestíveis ou não. Com o aumento da preocupação sobre saúde e meio ambiente, várias pesquisas têm sido realizadas de forma a permitir um processamento mais eficiente e a melhor utilização destes subprodutos (LIU e OCKERMAN, 2001).

Resíduos de processamento de carnes são tipicamente ricos em gorduras e proteínas, logo representam um bom substrato a ser empregado em bioprocessos. No entanto, a conversão destes materiais em digestores anaeróbios é

frequentemente limitada pelo passo de hidrólise. Uma etapa de hidrólise eficiente é crucial para tornar os substratos complexos acessíveis para ação das bactérias anaeróbias (CAVALEIRO et al. 2013).

A produção de AP a partir da DA de resíduos de processamento de carnes, é muitas vezes comprometida por compostos inibitórios, como a longa cadeia de ácidos graxos e amônia, produzidos durante a hidrólise de lipídios e proteínas (ALVES et al. 2009). A amônia é produzida pela degradação biológica do material nitrogenado, principalmente proteínas, a partir dos aminoácidos hidrolisados (BAYR, et al. 2012).

2.12. Água residuária de laticínios

Em uma indústria de laticínios a vazão dos efluentes líquidos varia ao longo do dia e depende diretamente das operações de processamento ou de limpeza que ocorrem na empresa. Existem também as variações sazonais devidas às modificações introduzidas no perfil qualitativo e/ou, quantitativo da produção, nos horários de produção, nas operações de manutenção, entre outras (SARAIVA et al. 2009).

A parcela representada por este tipo de agroindústria apresenta grande relevância, tornando-se necessário e obrigatório o tratamento prévio de seus efluentes líquidos. Os despejos consistem em quantidades variáveis de leite diluído e materiais sólidos flutuantes. Os efluentes agroindustriais de indústrias de laticínios sempre apresentam elevada taxa de DQO (NAIME e GARCIA, 2005).

A avaliação do potencial poluidor de grandes e médios laticínios já foram bem caracterizados, de forma que diversas medidas mitigadoras já têm sido aplicadas. No entanto, pouco se sabe sobre o potencial de aproveitamento de suas águas residuárias na geração de subprodutos com valor agregado, como o ácido propiônico (SARAIVA; MENDONÇA e PEREIRA, 2009).

O efluente de laticínio é rico em lactose, o que o torna uma fonte rica em carbono (PAULI e FITZPATRICK, 2002; PODLECH et al. 1990). Para que esse açúcar possa ser convertido a ácidos orgânicos pelas bactérias acidogênicas, ele ainda deve ser hidrolisado à glicose e galactose.

Porém, deve-se salientar a importância dos parâmetros de operação do reator de modo a alcançar um bom rendimento de conversão de lactose em glicose pela ação da lactase. Para determinar a faixa de temperatura ótima da lactase, Carminatti (2001) realizou ensaios a várias temperaturas (30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C e 50 °C). O grau de hidrólise obteve seu máximo em aproximadamente 60 minutos, permanecendo constante durante o resto do ensaio. Na faixa de temperatura entre 30 °C e 40 °C ocorreram as melhores conversões da lactose em glicose e galactose, obtendo-se valores próximos a 100% de hidrólise.

Para verificar a influência do pH na atividade da lactase, Carminatti, (2001) utilizou quatro diferentes valores de pH (4, 5, 6 e 7). O grau de hidrólise foi praticamente igual quando a reação ocorreu em pH 6 e 7. A conversão máxima foi de 90%. O tempo necessário para alcançar a conversão máxima em pH 6 foi de aproximadamente 60 minutos, enquanto que para pH 7 foi de 90 minutos. No ensaio realizado em pH 4, o grau de hidrólise pôde ser praticamente desconsiderado, enquanto que para pH 5 o valor máximo obtido foi de 1% de hidrólise.

Uma vez o substrato hidrolisado de forma eficiente, as reações posteriores, provenientes da acidogênese (figura 1, na pág.18), são facilitadas de modo a favorecer a produção de AP.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar as melhores condições e proporções de mistura entre os substratos (efluentes) para a produção de ácido propiônico em processo de fermentação anaeróbia.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar os parâmetros de DQO, NTK, pH e AR de cada resíduo utilizado (Processamento de milho, fabricação de ração animal, processamento de carnes e laticínios);
- Definir a melhor combinação e proporção da mistura de resíduos através de planejamento experimental;
- Avaliar o efeito do tratamento térmico prévio, da agitação da correção de pH no processo de digestão anaeróbia para produção de ácido propiônico;
- Caracterizar e quantificar o ácido propiônico gerado após digestão anaeróbia.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Substratos

Quatro efluentes agroindustriais de diferentes fontes foram utilizadas para avaliação da produção de ácido propiônico por digestão anaeróbia. Os efluentes eram provenientes do processamento de milho (MIL), da fabricação de ração animal (RAÇ), de processamento de carnes (CAR) e laticínio (LAC).

Os efluentes foram coletados, transportados e mantidos em freezer a -18 °C. O acondicionamento foi efetuado em frascos de polietileno de alta densidade (PEAD) com capacidade para 5 litros e em garrafas de polietileno tereftalato (PET) com capacidade de 2 litros.

Todos os efluentes foram cedidos por indústrias da região de Ponta Grossa.

Embora neste estudo os substratos tenham sido preparados com misturas de dois efluentes, na **Tabela 2** estão apresentados os valores de pH, DQO, NTK e AR de cada efluente de maneira isolada para facilitar posterior discussão dos resultados.

Tabela 2 - Dados dos diferentes resíduos utilizados neste experimento

Parâmetro	MIL	RAÇ	CAR	LAC
pH	4,70 ± 0,58	5,20 ± 0,98	5,40 ± 0,74	9,40 ± 0,83
DQO (mgO ₂ .L ⁻¹)	4165,01 ± 12,86	1107,36 ± 17,37	1026,96 ± 15,02	2950,28 ± 18,71
NTK (mg.L ⁻¹)	1316,12 ± 9,21	327,82 ± 8,93	270,56 ± 9,79	157,92 ± 7,08
AR (mg.L ⁻¹)	79,86 ± 4,78	86,53 ± 5,94	92,33 ± 5,22	37,61 ± 6,95

Vale salientar que o valor de pH das amostras MIL e LAC, estão no limite dos padrões de lançamento estipulados pela Resolução CONAMA 357/2005, que prevê uma faixa entre 5 e 9.

4.1.2. Fermentadores

A produção de ácidos orgânicos foi realizada em frascos de vidro borosilicato Duran®, autoclaváveis com volume útil de 200mL (Figura 3). O processo de DA foi operado em batelada à temperatura de 30°C e com Tempo de Detenção Hidráulica (TDH) inicial de 24 horas e final de 72 horas.



Figura 4– Frasco de vidro borosilicato Duran®, utilizado como fermentador

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Planejamento experimental

O planejamento experimental foi realizado em duas etapas. Primeiramente fez-se um planejamento de quatro misturas, denominado de ensaio A, que tinha por objetivo avaliar a combinação de substratos que proporcionaria maior produção de ácido propiônico.

Após definição da melhor mistura, foi feito um segundo planejamento, denominando ensaio B, onde se avaliou, através de uma rede simplex, as concentrações ideais de substrato para a mistura escolhida no ensaio A.

Segundo Barros Neto et al. (2001), essa técnica de cálculos estatísticos visa indicar como os fatores (variáveis envolvidas no processo) podem influenciar uma resposta.

4.2.1.1. Ensaio A - Composição da mistura de substratos

No Ensaio A foi avaliada a mistura que possibilitou maior produção de ácido propiônico. Com o auxílio do Software STAT versão 7.0, obteve-se o planejamento experimental de misturas com quatro componentes, sendo o volume total utilizado do frasco fermentador (200 mL) equivalente a 1 na matriz de planejamento, pois as composições devem ser não-negativas e, se expressas como frações da mistura, sua soma deve ser igual a 1 (WANG et al., 2013).

Os substratos (MIL, RAÇ, CAR e LAC) foram combinados em diferentes proporções de volume de acordo com o planejamento experimental estabelecido (Tabela 3).

Tabela 3 - Ensaio A - Matriz do planejamento experimental de misturas com quatro componentes (mL das amostras), efluente do processamento de milho (MIL), da fabricação de ração animal (RAÇ), de processamento de carnes (CAR) e laticínios (LAC).

Mistura	Variáveis codificadas				Variáveis reais (mL)			
	MIL	RAÇ	CAR	LAC	MIL	RAÇ	CAR	LAC
1	1	0	0	0	200	0	0	0
2	0	1	0	0	0	200	0	0
3	0	0	1	0	0	0	200	0
4	0	0	0	1	0	0	0	200
5	0,5	0,5	0	0	100	100	0	0
6	0,5	0	0,5	0	100	0	100	0
7	0,5	0	0	0,5	100	0	0	100
8	0	0,5	0,5	0	0	100	100	0
9	0	0,5	0	0,5	0	100	0	100
10	0	0	0,5	0,5	0	0	100	100
11	0,625	0,125	0,125	0,125	125	25	25	25
12	0,125	0,625	0,125	0,125	25	125	25	25
13	0,125	0,125	0,625	0,125	25	25	125	25
14	0,125	0,125	0,125	0,625	25	25	25	125
15	0,250	0,250	0,250	0,250	50	50	50	50

4.2.1.2. Ensaio B - Proporções de substratos nas misturas

Após avaliação dos resultados do Ensaio A, onde foi definida e fixada a melhor composição da mistura dos substratos, ou seja, a que apresentou a maior produção de ácido propiônico, realizou-se um novo planejamento de misturas, em rede simplex {2,2} aumentado, para a obtenção da melhor concentração de cada substrato escolhido a ser empregada. Para a investigação da proporção adequada da mistura entre os substratos, foram testadas três proporções de volume de MIL para as demais amostras (0,75:0,25), (0,25:0,75) e (0,5:0,5).

Os valores de proporção das misturas de substratos são demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4 – (Ensaio B) Matriz do planejamento experimental de misturas em rede simplex {2,2} aumentado; processamento de milho (MIL), da fabricação de ração animal (RAÇ), de processamento de carnes (CAR) e de laticínios(LAC).

Mistura	Variáveis codificadas				Variáveis reais (mL)			
	MIL	RAÇ	CAR	LAC	MIL	RAÇ	CAR	LAC
1	1	0	0	0	200	0	0	0
2	0	1	0	0	0	200	0	0
3	0	0	1	0	0	0	200	0
4	0	0	0	1	0	0	0	200
5	0,75	0,25	0	0	150	50	0	0
6	0,25	0,75	0	0	50	150	0	0
7	0,50	0,50	0	0	100	100	0	0
8	0,75	0	0,25	0	150	0	50	0
9	0,25	0	0,75	0	50	0	150	0
10	0,50	0	0,50	0	100	0	100	0
11	0,75	0	0	0,25	150	0	0	50
12	0,25	0	0	0,75	50	0	0	150
13	0,50	0	0	0,50	100	0	0	100

4.2.1.3. Ensaio C – Avaliação do pH, agitação e fervura prévia do substrato na produção de AP

Após definida a melhor combinação de substrato para a produção de AP, o próximo passo foi avaliar o pH do meio, agitação e fervura prévia do substrato na produção de AP.

O processo de digestão anaeróbia para produção de ácido propiônico foi realizado em bateladas de 72 horas cada à temperatura de 30°C (PRAKASHAM et al. 2009). As misturas utilizadas foram MIL + RAÇ; MIL + CAR e MIL + LAC, na proporção de substrato fixada em 75% de MIL e 25% das outras amostras (RAÇ, CAR e LAC). Os frascos foram fechados e submetidos a DA, a cada 24 horas uma amostra era retirada para que fossem realizadas análises de determinação de ácido propiônico.

Segue abaixo a descrição de algumas condições selecionadas para serem aplicadas neste trabalho, sendo estas as mais citadas:

- **Fervura prévia do substrato por 15 minutos para inativação das arqueias metanogênicas e correção inicial do pH para 6,5:** o procedimento de fervura foi realizado em chapa aquecedora, o tempo teve o início da contagem no momento de fervura da mistura de substratos. Após a fervura, a mistura foi resfriada à temperatura de 30 °C e então levada à estufa para manutenção desta temperatura por todo o período de digestão anaeróbia. A correção do pH foi realizada com solução diluída de hidróxido de sódio.

- **Agitação a 100 rpm, correção inicial do pH para 6,5 e, depois, a cada 24 horas:** A mistura foi submetida à correção de pH com solução diluída de hidróxido de sódio e então mantida em banho térmico (30° C) com agitação de aproximadamente 100 rpm. A agitação era interrompida apenas nos momentos de retirada de amostras e nova correção de pH.

- **Correção inicial do pH para 6,5 e, depois, a cada 24 horas:** Inicialmente o pH da mistura foi corrigido com solução diluída de hidróxido de sódio, em seguida os frascos com as misturas de substratos foram levados à estufa a 30

°C, amostras foram retiradas a cada 24 horas, neste momento houve nova correção do pH.

- **Correção do pH para 6,5 somente no início da dDA:** Após correção inicial do pH com solução de hidróxido de sódio, as misturas foram mantidas em estufa a 30 °C por um período de 72 horas, amostras foram retiradas a cada 24 horas.

4.2.2. Análises realizadas

Para se caracterizar os substratos utilizados e monitorar o processo fermentativo, foram realizadas as análises físico-químicas listadas a seguir.

- Potencial hidrogeniônico (pH): foi realizada empregando-se potenciômetro devidamente calibrado, segundo metodologia descrita em APHA (1998).

- Demanda Química de Oxigênio (DQO): foi mensurada através do método colorimétrico de refluxo fechado, como descrito por APHA (1998).

- Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK): foi determinado através do método micro Kjeldahl, onde a amostra é digerida em meio ácido seguida de destilação e titulação da mesma, conforme descrito em APHA (1998).

- Teor de açúcares redutores (AR): utilizou-se o método de Somogyi-Nelson, descrita por Southgate (1991), tendo como padrão a solução de glicose a 0,01%. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro com absorvância de 510 nm.

- Ácido Propiônico: a determinação de ácido propiônico foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, em cromatógrafo Waters e2695 Separations Module, Detector Waters 2998 – Photodiode Array Detector, utilizando o software Empower Pro. As alíquotas das amostras foram rapidamente centrifugadas, 3 minutos, de modo a separar material particulado presente. Em seguida foram diluídas na própria fase móvel, ácido fosfórico 0,1%, e filtradas em membrana de 0,2 µm diretamente nos vials. A coluna utilizada foi Shodex RSpak KC 811, em temperatura de 40°C, as amostras foram mantidas a 20°C durante o procedimento. O fluxo do eluente foi constante a 1 mL/min, com um loop de injeção de 10 µL. O comprimento de onda selecionado foi de 210 nm. O protocolo das análises

cromatográficas foi realizado segundo a metodologia e laudos do fabricante da coluna.

4.2.3. Análise estatística dos resultados

Todas as análises descritas foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

Análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey foram utilizados para se comparar médias das amostras ao nível de confiança de 95% ($p < 0,05$) utilizando o software Microsoft Excel - Action 2.4, 2007 for Windows (Microsoft, USA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O planejamento experimental para misturas foi aplicado com o objetivo de verificar possíveis interações entre os resíduos utilizados em contraste com os resíduos puros. Abaixo estão apresentados os resultados obtidos a partir dessas interações.

5.1. Ensaio A: Estudo e obtenção da composição da mistura de substratos

Na tabela 5 estão apresentados os resultados de produção de ácido propiônico obtidos durante Ensaio A.

Tabela 5 - Resultados da produção de ácido propiônico em relação à composição da mistura de substratos do Ensaio A

VALORES CODIFICADOS					TEMPO DE FERMENTAÇÃO		
Mistura de substratos (proporção de volume)					Ácido Propiônico (mg.L ⁻¹)		
Mistura	MIL	RAÇ	CAR	LAC	24h	48h	72h
1	1	0	0	0	3,34 ± 5,79 ^f	50,00 ± 2,34 ^c	15,17 ± 6,22 ^g
2	0	1	0	0	32,21 ± 3,77 ^d	34,42 ± 3,79 ^d	32,69 ± 2,85 ^e
3	0	0	1	0	20,09 ± 2,38 ^e	22,18 ± 2,77 ^e	22,14 ± 2,54 ^f
4	0	0	0	1	0,00 ± 0,00 ^f	1,74 ± 3,01 ^{ij}	6,16 ± 1,42 ^j
5	0,5	0,5	0	0	72,39 ± 3,05 ^a	185,13 ± 7,45 ^a	171,10 ± 5,77 ^a
6	0,5	0	0,5	0	65,05 ± 4,65 ^b	72,35 ± 3,67 ^b	67,25 ± 2,51 ^c
7	0,5	0	0	0,5	44,31 ± 5,14 ^c	77,65 ± 2,57 ^b	115,37 ± 5,78 ^b
8	0	0,5	0,5	0	32,39 ± 2,29 ^d	32,42 ± 2,96 ^d	29,34 ± 2,65 ^e
9	0	0,5	0	0,5	0,00 ± 0,00 ^f	7,39 ± 2,14 ^{gh}	12,46 ± 1,68 ^{gh}
10	0	0	0,5	0,5	0,00 ± 0,00 ^f	4,98 ± 4,63 ^{hi}	8,89 ± 3,27 ^{hij}
11	0,625	0,125	0,125	0,125	42,14 ± 3,74 ^c	45,63 ± 3,57 ^c	49,38 ± 5,73 ^d
12	0,125	0,625	0,125	0,125	26,05 ± 4,93 ^e	32,21 ± 3,01 ^d	32,91 ± 2,69 ^e
13	0,125	0,125	0,625	0,125	0,00 ± 0,00 ^f	0,00 ± 0,00 ^j	6,23 ± 2,16 ^{ij}
14	0,125	0,125	0,125	0,625	0,00 ± 0,00 ^f	9,49 ± 8,30 ^{fg}	10,94 ± 5,97 ^{hi}
15	0,250	0,250	0,250	0,250	23,47 ± 4,59 ^e	13,13 ± 12,03 ^f	0,00 ± 0,00 ^k

(*) Médias seguidas de uma mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

Comparando-se os valores de produção de AP obtidos em cada tempo de fermentação para cada mistura, observa-se que todos os resultados individuais se revelaram diferentes estatisticamente ao nível de confiança de 95%. No entanto, apesar da diferença estatística, foi possível observar que as misturas combinadas com 0,5 de MIL e 0,5 de qualquer outro substrato (misturas 5, 6, e 7), apresentaram maior produção de AP, quando comparadas às misturas com proporções diferentes de todos os outros substratos (Figura 5).

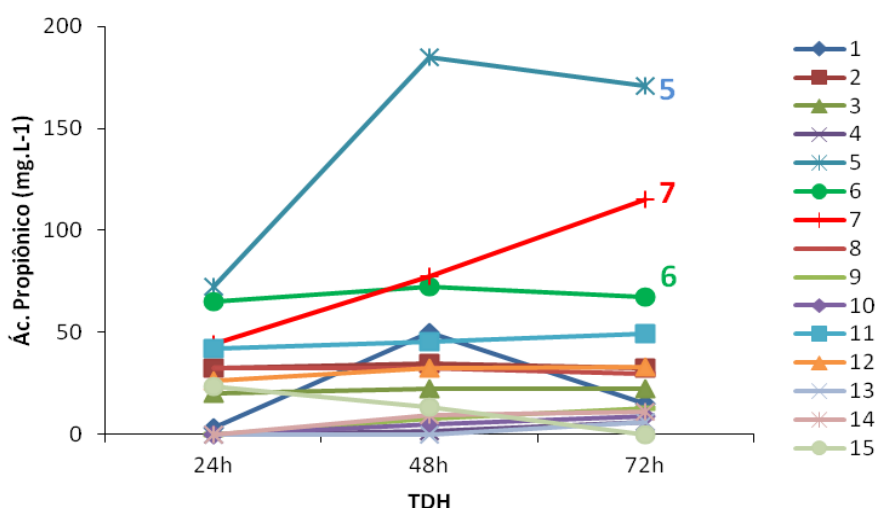


Figura 5 - Produção de ácido propiônico, em diferentes tempos de fermentação, nas misturas do Ensaio A

Observa-se que, em 24 horas, a mistura que proporcionou maior desenvolvimento de AP, foi a mistura 5, bem como para 48 e 72 horas o que demonstra que a mistura das amostras MIL e RAÇ, proporcionou maior produção de AP. Outro fator importante é que a quantidade de MIL utilizada interfere na produção de AP. Nos resultados de produção de ácido propiônico de todas as misturas observa-se que, quanto menores as quantidades de MIL, menor a produção de AP. Esse resultado pode ser explicado devido ao fato de a milhocina (MIL) ser o efluente de maior DQO, o que favorece uma maior produção de ácido propiônico (PAREKH et al. 1999; OZADALI et al. 1996; PAIK e GLATZ, 1994).

De acordo com Parekh et al. (1999), a milhocina contém micro-nutrientes que são necessários para o crescimento de microrganismos, fato que também pode ter colaborado para maior produção de ácido propiônico.

Leite et al. (2008), estudaram a produção de hidrogênio e ácidos orgânicos em sistemas anaeróbios e também observaram que para a ação dos

microrganismos propiônicos é indispensável uma concentração mínima de carbono, que pode ser fornecida pela DQO, a qual engloba concentrações de carbono provenientes de açúcares e nitrogênio orgânico que são nutrientes empregados pelas propionibactérias.

Sreethawong et al. (2010) estudando efeitos operacionais de reatores anaeróbios em batelada, observou ser necessária a adequação do meio quanto a concentração de fonte de carbono e de nitrogênio, quando o objetivo é a produção de ácidos orgânicos, como observado nesse estudo.

Através dos resultados experimentais obtidos, definiu-se que as misturas que proporcionaram maior produção de AP foram as que apresentaram 0,5 MIL e 0,5 de qualquer outro substrato (RAÇ, CAR e LAC).

5.2. Ensaio B: Estudo e obtenção das proporções de substratos nas misturas

Para melhor compreensão do efeito da mistura de efluentes na produção de AP, o segundo planejamento foi realizado em rede simplex {2,2} aumentado, para a obtenção da melhor concentração de cada substrato a ser empregada. Deste modo variou-se as concentrações de RAÇ, CAR e LAC mantendo-se fixa a concentração de milhocina (MIL).

Verificou-se que a maior produção de AP foi obtida com a fermentação da mistura 5 (0,75% amostra MIL e 0,25% amostra RAÇ), seguida pela mistura 8 (0,75% amostra MIL e 0,25% amostra CAR) em todos os intervalos de tempos. A mistura 11 (0,75% amostra MIL e 0,25% amostra LAC) apesar de não apresentar grande formação de AP, em 24 e 48 horas, apresentou um valor menor apenas que o da amostra 5 em 72 horas (Tabela 6) (Figura 6).

Tabela 6 - Resultados da produção de Ácido Propiônico em relação às proporções dos substratos nas misturas do Ensaio B

VALORES CODIFICADOS					TEMPO DE FERMENTAÇÃO		
Mistura	Mistura de substratos (proporção de volume)				Ácido Propiônico (mg.L ⁻¹)		
	MIL	RAÇ	CAR	LAC	24h	48h	72h
1	1	0	0	0	3,34 ± 5,79 ⁱ	50,00 ± 2,34 ^e	15,17 ± 6,22 ^h
2	0	1	0	0	32,21 ± 3,77 ^f	34,42 ± 3,79 ^g	32,69 ± 2,85 ^f
3	0	0	1	0	20,09 ± 2,38 ^g	22,18 ± 2,77 ^h	22,14 ± 2,54 ^g
4	0	0	0	1	0,00 ± 0,00 ⁱ	1,74 ± 3,01 ^k	6,16 ± 1,42 ⁱ
5	0,75	0,25	0	0	132,46 ± 4,12 ^b	196,61 ± 7,04 ^A	210,33 ± 8,72 ^A
6	0,25	0,75	0	0	52,94 ± 3,27 ^d	40,65 ± 5,71 ^f	32,58 ± 5,10 ^f
7	0,50	0,50	0	0	75,17 ± 2,91 ^c	83,68 ± 8,66 ^c	70,38 ± 6,45 ^d
8	0,75	0	0,25	0	143,45 ± 3,70 ^A	148,22 ± 6,59 ^b	163,56 ± 7,44 ^c
9	0,25	0	0,75	0	8,78 ± 4,53 ^h	70,05 ± 2,09 ^d	61,76 ± 4,42 ^e
10	0,50	0	0,50	0	20,23 ± 3,06 ^g	18,45 ± 7,49 ⁱ	21,07 ± 3,79 ^g
11	0,75	0	0	0,25	38,14 ± 6,77 ^e	48,03 ± 7,90 ^e	186,95 ± 6,63 ^b
12	0,25	0	0	0,75	0,00 ± 0,00 ⁱ	0,00 ± 0,00 ^k	0,00 ± 0,00 ^j
13	0,50	0	0	0,50	0,00 ± 0,00 ⁱ	10,50 ± 1,75 ^j	0,00 ± 0,00 ^j

(*) Médias seguidas de uma mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

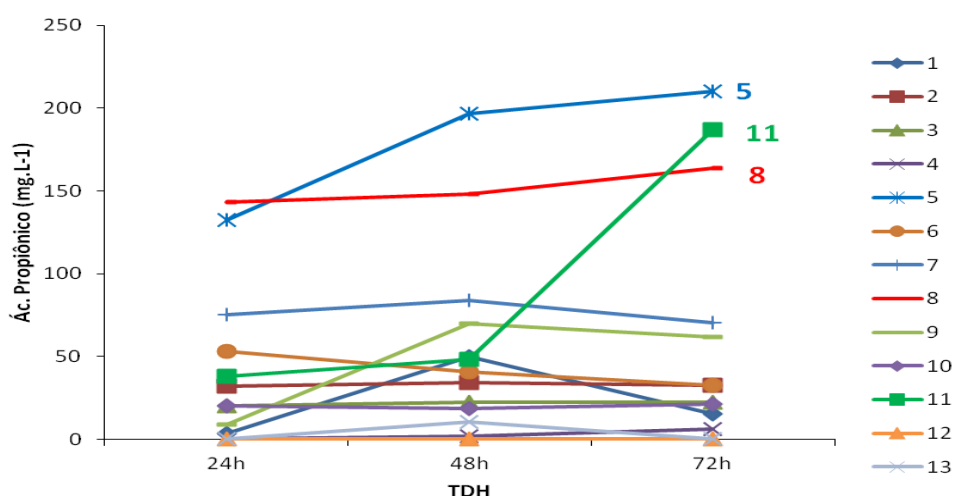


Figura 6. Produção de ácido propiônico nas misturas do Ensaio B

Os resultados de ácido propiônico obtidos estão de acordo com os apresentados por Elbeshbishy e Nakhla (2012), que realizaram DA de misturas de substratos sintéticos como fonte de carbono e fonte de nitrogênio e obtiveram

resultados satisfatórios em misturas com proporções de 20% fonte de nitrogênio e 80% fonte de carbono, em uma relação de massa.

A fonte de carbono pode ser garantida pela DQO do substrato utilizado para fermentação (Leite et al. 2008; Feng et al. 2011; Sreethawong et al. 2010). Neste caso, a MIL apresentava a maior DQO, bem como é uma excelente fonte de carboidratos e nitrogênio orgânico, o que contribuiu para ação dos microrganismos formadores de AP e, conseqüentemente, para a produção de AP (OZADALI et al. 1996).

Observando-se os resultados apresentados na Tabela 6 conclui-se que as misturas que apresentaram maiores quantidades de MIL, foram as que proporcionaram maiores concentrações de AP, como já observado no ensaio A.

Em estudos realizados por Zabriskie et al. (1980), constatou-se que a milhocina, além de conter carbono e nitrogênio orgânico, possui cerca de 15 a 17% de ácido láctico, que é um promissor substrato para a fermentação de AP. Segundo Paik e Glatz (1994), as propionibactérias preferem o lactato à glicose ou outros açúcares disponíveis como substrato porque, na via metabólica da glicólise anaeróbia (Figura 2), o lactato está presente em uma etapa posterior à da glicose, ou seja, as bactérias propiônicas se utilizam de uma via mais curta para obtenção de energia.

Como a MIL se mostrou um substrato promissor na produção de AP optou-se pelas misturas 5, 8 e 11, que possibilitaram as maiores produções do ácido, para avaliação da interferência dos fatores fervura prévia, agitação e correção do pH para 6,5 na produção de AP.

5.3. Ensaio C - Avaliação das variáveis pH, agitação e fervura prévia do substrato na produção de AP

Depois de estabelecidas as melhores misturas para produção de AP, ensaios A e B, prosseguiu-se com o experimento avaliando-se a influência da fervura prévia do substrato, agitação e correção do pH para 6,5 no processo fermentativo.

Nos itens abaixo estão apresentados os resultados da produção de AP obtidos a partir das misturas de substratos, variando-se as seguintes parâmetros:

fervura prévia da mistura, agitação da mistura durante o período de fermentação e correção do pH.

5.3.1. Efeito da fervura prévia do substrato na produção de AP

Na tabela 7 estão dispostos os resultados da influência da fervura prévia nas misturas de substratos (MIL+RAÇ), (MIL+CAR) e (MIL+LAC), após serem submetidas à aquecimento em aproximadamente 100°C por um período de 15 minutos.

Tabela 7. Resultados dos teores de ácido propiônico produzido durante a digestão anaeróbia das misturas tratadas com fervura prévia a ~100 °C por 15 minutos

MISTURAS (tempo de fermentação)	pH	AR (mg.L⁻¹)	DQO (mgO₂.L⁻¹)	NTK (mg.L⁻¹)	ÁC PROP (mg.L⁻¹)
MIL+RAÇ (0h)	6,40 ± 0,17	129 ± 7,28	5228 ± 9,67	1228 ± 15,71	nd
MIL+RAÇ (24h)	6,20 ± 0,15	123 ± 10,81	5209 ± 12,05	1105 ± 25,69	29,60 ± 2,73 ^{Ba}
MIL+RAÇ (48h)	6,27 ± 0,20	119 ± 6,20	5116 ± 19,73	1000 ± 21,23	45,07 ± 2,88 ^{Aa}
MIL+RAÇ (72h)	6,43 ± 0,15	117 ± 5,77	5002 ± 27,53	1122 ± 19,06	38,23 ± 2,72 ^{Ac}
MIL+CAR (0h)	6,30 ± 0,18	140 ± 10,61	5187 ± 25,07	1035 ± 18,80	nd
MIL+CAR (24h)	6,10 ± 0,54	133 ± 12,06	5185 ± 22,85	1004 ± 15,05	25,26 ± 2,38 ^{Ca}
MIL+CAR (48h)	6,30 ± 0,21	118 ± 12,50	5084 ± 19,54	991 ± 19,57	34,93 ± 1,85 ^{Bb}
MIL+CAR (72h)	6,30 ± 0,18	107 ± 14,29	5165 ± 20,66	905 ± 21,04	83,12 ± 3,30 ^{Ab}
MIL+LAC (0h)	6,70 ± 0,13	193 ± 11,42	5172 ± 21,89	1105 ± 15,31	nd
MIL+LAC (24h)	5,60 ± 0,29	116 ± 10,83	5144 ± 25,73	894 ± 18,75	24,52 ± 2,40 ^{Ba}
MIL+LAC (48h)	5,80 ± 0,18	144 ± 13,61	5003 ± 23,63	1000 ± 15,97	20,34 ± 1,98 ^{Bc}
MIL+LAC (72h)	6,20 ± 0,25	110 ± 10,09	5005 ± 23,02	947 ± 19,73	129,41 ± 5,93 ^{Aa}

(*) nd:não determinado. (**) Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula não diferem entre si dentro do mesmo grupo de mistura e médias seguidas de uma mesma letra minúscula não diferem entre as misturas em um mesmo tempo, significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

Quando comparamos os resultados encontrados para produção de AP, apresentados na Tabela 7, com os encontrados na Tabela 6 das mistura 5, 8 e 11 (sem fervura), pode se afirmar que, apesar das variações de concentração de AR, DQO e NTK, durante o período de fermentação, a fervura não interferiu

positivamente na produção de AP, apresentando menor produção de AP. Este fato se deve, possivelmente à morte dos microrganismos produtores de AP durante a exposição à temperatura próxima de 100°C.

Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Prakasham et al. (2009), que realizaram experimentos com misturas de resíduos agroindustriais, os quais foram submetidos a tratamento térmico prévio a 100 °C por um período de 30 minutos e ao final do processo também obteve baixas concentrações de propionato.

5.3.2. Efeito da agitação na produção de ácido propiônico

A velocidade de agitação deste experimento foi fixada em 100 rpm pois esta foi a velocidade mínima necessária para manter as misturas dispersas e suspensas de forma homogênea (Tian et al. 2013).

Tabela 8 - Resultados dos teores de ácido propiônico produzido durante a digestão anaeróbia das misturas submetidas à agitação durante o período de fermentação e correção do pH a cada 24 horas

MISTURAS (tempo de fermentação)	pH	AR (mg.L⁻¹)	DQO (mgO₂.L⁻¹)	NTK (mg.L⁻¹)	ÁC PROP (mg.L⁻¹)
MIL+RAÇ (0h)	6,40 ± 0,17	129,43 ± 7,28	5228,98 ± 9,67	1228,27 ± 15,71	nd
MIL+RAÇ (24h)	5,87 ± 0,05	129,11 ± 4,20	5172,36 ± 11,69	1193,17 ± 30,40	55,76 ± 2,79 ^{Ba}
MIL+RAÇ (48h)	6,50 ± 0,10	98,11 ± 10,71	5038,54 ± 26,74	1210,72 ± 22,64	103,09 ± 4,22 ^{Ab}
MIL+RAÇ (72h)	6,57 ± 0,12	92,67 ± 6,05	5040,29 ± 32,41	1193,17 ± 30,12	101,84 ± 2,53 ^{Ab}
MIL+CAR (0h)	6,30 ± 0,18	140,11 ± 10,61	5187,47 ± 25,07	1035,25 ± 18,80	nd
MIL+CAR (24h)	5,90 ± 1,20	133,22 ± 30,90	5146,63 ± 17,84	1017,71 ± 30,39	45,51 ± 1,79 ^{Bb}
MIL+CAR (48h)	6,40 ± 1,50	130,11 ± 25,27	5048,09 ± 24,22	972,09 ± 28,62	80,98 ± 3,25 ^{Ac}
MIL+CAR (72h)	6,47 ± 0,90	123,00 ± 33,09	5013,98 ± 22,14	968,14 ± 12,15	82,00 ± 2,40 ^{Ac}
MIL+LAC (0h)	6,70 ± 0,13	193,33 ± 11,42	5172,36 ± 21,89	1105,44 ± 15,31	nd
MIL+LAC (24h)	5,43 ± 1,00	144,44 ± 25,54	5120,36 ± 35,66	982,61 ± 20,78	38,88 ± 1,61 ^{Cc}
MIL+LAC (48h)	6,20 ± 1,22	130,78 ± 17,43	5059,13 ± 32,14	965,07 ± 20,40	146,26 ± 1,65 ^{Ba}
MIL+LAC (72h)	6,23 ± 1,05	93,11 ± 15,28	5038,54 ± 31,71	947,52 ± 22,64	170,71 ± 3,60 ^{Aa}

(*) nd:não determinado. (**) Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula não diferem entre si dentro do mesmo grupo de mistura e médias seguidas de uma mesma letra minúscula não diferem entre as misturas em um mesmo tempo, significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

Comparando-se os resultados obtidos neste ensaio com os apresentados na Tabela 6 (sem agitação) nota-se que o efeito da agitação foi negativo na produção do ácido propiônico. Pois se compararmos a mistura MIL + LAC com 72 horas de fermentação, temos que, com agitação houve produção de $170,71 \text{ mg.L}^{-1}$ e, sem agitação, de 163 mg.L^{-1} . Já com a mistura MIL + RAÇ houve produção de $101,84 \text{ mg.L}^{-1}$ de AP com agitação e 210 mg.L^{-1} de AP sem agitação. Com a mistura MIL + CAR obteve-se produção de 82 mg.L^{-1} e 163 mg.L^{-1} de AP, com agitação e sem agitação, respectivamente.

Tian et al. (2013) em seus estudos realizaram experimentos visando a produção de AP testando várias intensidades de agitação e obtiveram pouco mais que 800 mg.L^{-1} em 100 rpm, a 55°C .

A baixa produção de AP em meio sob agitação se deve, possivelmente ao fato de a agitação ter suprimido o crescimento e propagação dos microrganismos produtores de AP (VAVILIN e ANGELIDAKI, 2005). Ao estudar reações autocatalíticas, Zhabotinsky (1991) e Vavilin e Zaikin (1971) observaram que a agitação deve ser mínima para estimular a formação dos centros de iniciação da reação.

De acordo com estudos anteriores realizados por Cavaleiro et al. (2013) e Alves et al. (2009), os resíduos de matadouros e processamento de carnes possuem em sua composição uma porcentagem elevada de gorduras e graxas, o que pode ter influenciado negativamente na produção de AP, durante a agitação.

5.3.3. Efeito da correção do pH na produção de ácido propiônico

A correção e manutenção da alcalinidade do meio foi testada, porque este pode ser um fator determinante na atuação das bactérias propiônicas (LEITE et al. 2008).

Na Tabela 9 estão apresentados os resultados obtidos da fermentação conduzida apenas com correção inicial do pH para 6,5.

Tabela 9. Resultados dos teores de ácido propiônico produzido durante a digestão anaeróbia das misturas submetidas à correção de pH no início da fermentação

MISTURAS (tempo de fermentação)	pH	AR (mg.L⁻¹)	DQO (mgO₂.L⁻¹)	NTK (mg.L⁻¹)	ÁC PROP (mg.L⁻¹)
MIL+RAÇ (0h)	6,50 ± 0,17	129,43 ± 7,28	5228 ± 9,67	1228 ± 15,71	nd
MIL+RAÇ (24h)	6,27 ± 0,98	124,11 ± 13,21	5105 ± 20,26	1122 ± 15,19	53,59 ± 0,99 ^{Cb}
MIL+RAÇ (48h)	6,30 ± 1,12	78,22 ± 9,73	5069 ± 21,32	1070 ± 20,40	190,65 ± 3,02 ^{Ba}
MIL+RAÇ (72h)	6,30 ± 1,27	70,11 ± 9,27	5033 ± 14,35	1052 ± 22,64	229,57 ± 2,17 ^{Aa}
MIL+CAR (0h)	6,50 ± 0,18	140,11 ± 10,61	5187 ± 25,07	1035 ± 18,80	nd
MIL+CAR (24h)	6,17 ± 1,90	121,67 ± 13,46	5048 ± 25,04	959 ± 20,19	92,12 ± 0,87 ^{Ca}
MIL+CAR (48h)	6,20 ± 1,04	74,11 ± 8,69	5090 ± 16,32	929 ± 20,40	144,41 ± 2,32 ^{Bb}
MIL+CAR (72h)	6,20 ± 1,00	64,22 ± 12,67	5048 ± 16,17	917 ± 17,94	154,27 ± 1,75 ^{Ab}
MIL+LAC (0h)	6,50 ± 0,13	193,33 ± 11,41	5172 ± 21,89	1105 ± 15,31	nd
MIL+LAC (24h)	5,67 ± 0,52	153,33 ± 19,30	5105 ± 23,72	912 ± 20,39	23,76 ± 2,37 ^{Cc}
MIL+LAC (48h)	6,13 ± 0,55	113,00 ± 17,43	5038 ± 18,91	894 ± 18,43	31,53 ± 1,78 ^{Bc}
MIL+LAC (72h)	6,23 ± 1,06	105,89 ± 15,81	5012 ± 20,88	877 ± 20,40	43,10 ± 3,31 ^{Ac}

(*) nd:não determinado. (**) Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula não diferem entre si dentro do mesmo grupo de mistura e médias seguidas de uma mesma letra minúscula não diferem entre as misturas em um mesmo tempo, significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

Os melhores resultados obtidos até este momento são provenientes da digestão anaeróbia das misturas (MIL+RAÇ) e (MIL+CAR) com uma produção de 229,57 e 154,27 mg.L⁻¹, respectivamente.

No entanto, apesar dos teores de AP obtidos das misturas (MIL+RAÇ) e (MIL+CAR), a mistura (MIL+LAC) não sofreu influência positiva da correção inicial de alcalinidade. Possivelmente por MIL possuir ácido láctico, que quando combinada ao LAC que apresenta lactose em sua composição, apresentaria uma excelente produção de AP, no entanto de acordo com Carminatti (2001), a faixa de pH ideal para a ação da lactase é de 6 a 7, como o pH foi corrigido inicialmente isso dificultou a produção de AP, já q a lactase não estava em sua faixa ideal de pH durante toda a fermentação.

Outro fator que pode ter contribuído com a diminuição da produção de AP, foi a elevada concentração de ácidos orgânicos formada, pois esse fato reduz o pH potencialmente a níveis que inibem e, eventualmente, matam os microrganismos metanogênicos (MSHANDETE et al. 2004).

Para se determinar a influencia do pH, realizou-se um ensaio com manutenção do pH em 6,5 a cada 24 horas na produção de AP. Na Tabela 10 estão listados os resultados encontrados.

Tabela 10- Resultados dos teores de ácido propiônico produzido durante a digestão anaeróbia das misturas submetidas à correção de pH a cada 24 horas

MISTURAS (tempo de fermentação)	AR (mg.L⁻¹)	DQO (mgO₂.L⁻¹)	NTK (mg.L⁻¹)	ÁC PROP (mg.L⁻¹)
MIL+RAÇ (0h)	129,43 ± 7,28	5228 ± 9,67	1228 ± 15,71	nd
MIL+RAÇ (24h)	128,33 ± 15,85	5100 ± 18,44	1228 ± 15,19	52,17 ± 2,69 ^{Ba}
MIL+RAÇ (48h)	115,44 ± 12,66	4981 ± 18,86	1193 ± 12,64	53,28 ± 2,87 ^{Bb}
MIL+RAÇ (72h)	100,22 ± 9,25	4405 ± 26,32	1158 ± 19,81	114,98 ± 3,08 ^{Ac}
MIL+CAR (0h)	140,11 ± 10,61	5187 ± 25,07	1035 ± 18,80	nd
MIL+CAR (24h)	136,33 ± 12,57	5038 ± 28,86	1035 ± 20,39	44,09 ± 1,34 ^{Cb}
MIL+CAR (48h)	121,56 ± 8,75	5013 ± 15,44	1017 ± 18,23	53,00 ± 3,20 ^{Bb}
MIL+CAR (72h)	114,00 ± 9,33	5007 ± 17,83	982 ± 20,39	135,75 ± 2,10 ^{Ab}
MIL+LAC (0h)	193,33 ± 11,42	5172 ± 21,89	1105 ± 15,31	nd
MIL+LAC (24h)	116,67 ± 19,34	5146 ± 19,27	1017 ± 20,39	41,92 ± 2,06 ^{Cb}
MIL+LAC (48h)	115,33 ± 22,01	5079 ± 15,94	1000 ± 20,40	62,27 ± 4,00 ^{Ba}
MIL+LAC (72h)	64,28 ± 18,07	5007 ± 23,58	929 ± 18,64	220,96 ± 1,78 ^{Aa}

(*) nd:não determinado. (**) Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula não diferem entre si dentro do mesmo grupo de mistura e médias seguidas de uma mesma letra minúscula não diferem entre as misturas em um mesmo tempo, significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

Observando os resultados encontrados para a produção de AP, nota-se que a correção do pH para 6,5 a cada 24 horas de fermentação, favoreceu a produção de AP a partir da digestão anaeróbia da mistura (MIL+LAC). Como já citado anteriormente, a MIL e LAC apresentam juntas lactato e lactose, que com a manutenção do pH a cada 24 horas, estavam em condições ideais para a fermentação (6,5) aumentando assim a produção de AP a partir desses substratos (CARMINATTI, 2001).

Nas demais misturas não foi possível observar uma contribuição significativa da manutenção do pH, já que os resultados encontrados na Tabela 10 para produção de AP (mg.L⁻¹), são inferiores aos encontrados na Tabela 9, mostrando que para as amostras MIL+RAÇ e MIL+CAR o ajuste do pH não contribuiu para o aumento da produção.

5.3.4. Resultados agrupados dos teores de ácido propiônico produzido durante a digestão anaeróbia das misturas submetidas a todas as variações de condições aplicadas

Na Tabela 11 abaixo estão listados os melhores resultados alcançados na produção de AP, frente às modificações aplicadas.

Tabela 11 – Resultados agrupados dos maiores teores de ácido propiônico (mg.L^{-1}) produzidos em cada condição testada

Condições	MIL+RAÇ	MIL+CAR	MIL+LAC
Fervura	45,07 $\pm$ 2,88 ^d	83,12 $\pm$ 3,30 ^c	129,41 $\pm$ 5,93 ^c
Agitação/pH (24h)	103,09 $\pm$ 4,22 ^c	80,98 $\pm$ 3,25 ^c	170,71 $\pm$ 3,60 ^b
pH (24h)	114,98 $\pm$ 3,08 ^b	135,75 $\pm$ 2,10 ^b	220,96 $\pm$ 1,78 ^a
pH início	229,57 $\pm$ 2,17 ^a	154,27 $\pm$ 1,75 ^a	43,10 $\pm$ 3,31 ^d

(*) Médias seguidas de uma mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Observa-se que cada mistura de substrato apresentou um comportamento diferente para as modificações testadas no processo de fermentação. Entre os diferentes processos, houve diferença estatística pelo teste de Tukey.

Para a mistura de substratos (MIL+RAÇ) e (MIL+CAR), os maiores teores de AP, 229,57 mg.L^{-1} e 154,27 mg.L^{-1} , respectivamente, foram alcançados corrigindo-se o pH da mistura somente do início do processo, ao decorrer de 72 horas de fermentação. Já para a mistura (MIL+LAC), a correção de alcalinidade somente no início do processo não foi suficiente para garantir uma produção satisfatória de AP. A manutenção do pH em 6,5 a cada 24 horas, apresentou um teor de AP de 220,96 mg.L^{-1} , também após transcorrido 72 horas. Assim, a manutenção do pH contribuiu para a etapa de acidogênese e favoreceu a atividade das bactérias propiônicas, como já descrito por Li et al. (2012).

Na figura 7, é possível visualizar o comportamento das misturas estudadas frente às modificações aplicadas.

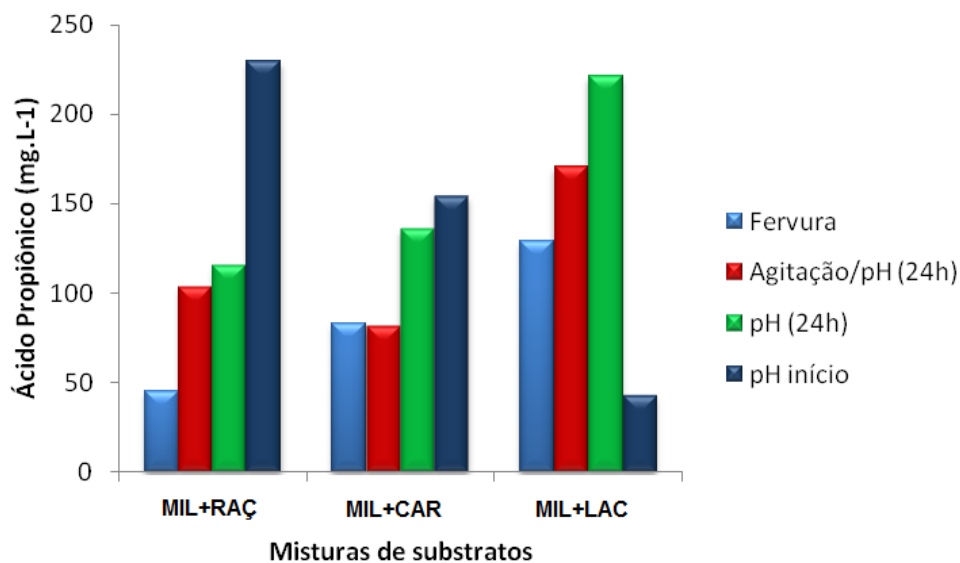


Figura 7 - Influência das condições testadas, na produção de ácido propiônico, nas misturas de substratos

Analisando-se a Figura 7, observa-se que a correção de pH no início foi um fator determinante na produção de AP, produto da fermentação das misturas de substratos, pois duas misturas apresentaram o mesmo comportamento durante o experimento, no entanto apenas a mistura (MIL+LAC) exigiu que o pH fosse controlado a cada 24 horas. Segundo Pierotti (2007), há situações em que ocorre um decréscimo no valor do pH sem sua posterior estabilização.

Dentre os substratos utilizados, a mistura entre MIL + RAÇ foi a que apresentou maior produção de AP, durante todo o decorrer do estudo.

6 CONCLUSÕES

Nos ensaios onde as condições de fermentação foram variadas (fervura prévia do substrato, agitação e correção do pH para 6,5), os melhores resultados de produção de ácido propiônico, $229,57 \text{ mg.L}^{-1}$, foram obtidos com substrato composto por 75% de efluente do processamento de milho mais 25% de efluente de fábrica de ração, com 72h de fermentação, correção de pH inicial para 6,5 e sem agitação, seguido de substrato com 75% de efluente do processamento de milho mais 25% de efluente de processamento de carnes, nas mesmas condições, obtendo-se produção de $154,27 \text{ mg.L}^{-1}$ de ácido propiônico. O substrato contendo 75% de efluente do processamento de milho mais 25% de efluente de laticínio, possibilitou produção de $220,96 \text{ mg.L}^{-1}$ de ácido propiônico, após 72 horas de fermentação e com correção de pH a cada 24 horas. As outras condições testadas não foram significativas na biossíntese de ácido propiônico. A análise estatística dos dados confirmou que é possível a utilização de codigestão de efluentes agroindustriais para a produção de ácido propiônico.

De uma forma geral pode-se concluir que, nas condições empregadas, a utilização de misturas de resíduos agroindustriais com características semelhantes aos empregados no presente estudo, podem ser consideradas boas fontes para a produção de ácido propiônico a partir da co-digestão. A utilização desses resíduos como fonte para a produção de ácidos orgânicos é viável, contribuindo com o processo de agregação de valor econômico a sub-produtos da agroindústria.

Com os resultados obtidos dos planejamentos experimentais com a mistura dos resíduos foi possível determinar a melhor combinação e ainda mais, a proporção de cada um dos quatro resíduos. Entretanto, os resultados indicam que o processo produtivo ainda apresenta qualidade inadequada quando comparado a dados da literatura; sendo, portanto, necessário continuar com novos experimentos. Mais pesquisas são necessárias, a fim de estabelecer relações entre condições do processo durante a fermentação acidogênica e produção de ácido propiônico de diferentes matérias-primas potenciais.

O grande desafio para tornar a biossíntese do ácido propiônico competitiva em potencial consiste em propor soluções que tratem da limitação da conversão provocada pela considerável inibição da reação pelo produto principal, resultando em uma baixa concentração final de ácido propiônico. O fato da concentração do

produto desejado ser baixa leva a custos mais altos na etapa de purificação. Desta forma, a necessidade de compreender o processo e determinar as condições ótimas de operação, que possam contribuir para um aumento da conversão, é imprescindível para o desenvolvimento de um processo eficiente e competitivo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIMILHO –Associação Brasileira das Indústrias do Milho. Disponível em www.abimilho.com.br. Acesso em 10/11/2012.

ALVAREZ, R.; LIDÉN, G. Semi-continuous co-digestion of solid slaughterhouse waste, manure, and fruit and vegetable waste. **Renewable Energy**, n.33, p.726-729, 2008.

ALVES, M.M.; PEREIRA, M.A.; SOUSA, D.Z.; CAVALEIRO, A.J.; PICAVER, M.; SMIDT, H.; STAMS, A.J.M. Waste lipids to energy: how to optimize methane production from long-chain fatty acids (LCFA). **Microbiology Biotechnology**, v.2, n.5, p.538–550, 2009.

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20^{ed.}, Washington, DC, USA: American Public Health Association, 1998.

APPELS, L.; BAEYENS, J.; DEGRÉVE, J.; DEWIL, R. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. **Progress in Energy and Combustion Science**. n.34, p. 755–781, 2008.

AQUINO, S.F.; CHERNICHARO, C.A.L. Artigo Técnico: Acúmulo de ácidos graxos voláteis (agvs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v.10, n.2, p.152-161, 2005.

BAHL, H.; ANDERSCH, W.; BRAUN, K.; GOTTSCHALK, G. Effect of pH and butyrate concentration on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* grown in continuous culture. **European Journal Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 14, p. 17-20, 1982.

BARBIRATO, F.; CHEDAILLE, D.; BORIES, A. Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.47, p.441-446, 1997.

BARROS, G. Brazil: the challenges in becoming an agricultural superpower. In: Lael BRAINARD, L., MARTINEZ-DIAZ, L., Brazil as an Economic Superpower? Understanding Brazil's Changing Role in the Global Economy. **Brookings Institution Press**, Washington, DC, p. 2–35, 2008.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas-SP: Editora da UNICAMP, 2001.

BAYR, S.; RANTANEN, M.; KAPARAJU, P.; RINTALA, J. Mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion of rendering plant and slaughterhouse wastes. **Bioresource Technology**, n.104, p.28–36, 2012.

BELLAVER, C.; BRUM, P.A.R.; LIMA, G.M.M. In vitro solubility of meat and bone meal protein with different pepsin concentrations. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.3, p.489-492, 2000.

BENGTSSON, S.; HALLQUISTA, J.; WERKERA A.; WELANDER, T. Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: Effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production. **Biochemical Engineering Journal**, v.40, p.492-499, 2008.

BEUX, S.; NUNES, E.; BARANA, A.C. Effect of temperature on two-phase anaerobic reactors treating slaughterhouse wastewater. **Brazilian archives of biology and technology**, v.50, n.6, p.1061-1070, 2007.

BIGGS, S.; HABGOOD, M.; JAMESON, G.J.; YAN, Y. Aggregate structures formed via a bridging flocculation mechanism. **Chemical Engineering Journal**, n.80, p.13-22, 2000.

CAMPOS, L.F.A.; MENEZES, R.R.; LISBOA, D.; SANTANA, L.N.L.; NEVES, G.A.; FERREIRA, H.C. Planejamento experimental no estudo da maximização do teor de resíduos em blocos e revestimentos cerâmicos. **Revista Cerâmica**, n.53, p.373-380, 2007.

CAPELLARI, J.B. **Biossíntese de ácido láctico por *Lactobacillus Amylovorus* a partir de resíduos agroindustriais**. Dissertação de Mestrado, Mestrado em Engenharia de Processos – UNIVILLE, Joinville, 2010.

CARMINATTI, C. A. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase *Kluyveromyces lactis***. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2001.

CAVALEIRO, A.J.; FERREIRA, T.; PEREIRA, F.; TOMMASO, G.; ALVES, M.M. Biochemical methane potential of raw and pre-treated meat-processing wastes. **Bioresource Technology**, n.129, p.519–525, 2013.

CELESTINO, P. Uma única chance para agradar: A indústria de palatilizantes se mostra altamente desenvolvida e interessada em agregar cada vez mais valor às rações. **Pet Food Brasil**, Editora Stilo, n.5, p.22-24, 2009.

CERQUEIRA LEITE, R.C.; LEAL, M.R.L.V.; CORTEZ, L.A.B.; GRIFFIN, W.M.; SCANDIFFIO, M.I.G. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol? **Energy**, n. 34, p.655–661, 2009.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A.; FERRIER, D.R. *Bioquímica Ilustrada*, 4ªed, Editora Artmed, 2009.

CHANG, J. S.; LEE, K. C.; LIN, P. J. Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, p. 1167-1174, 2002.

CHERNICHARO, C.A.L. **Reatores Anaeróbios** - Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. UFMG, v. 5, 2ª ed., 2007.

CONAMA – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº357 de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para

o seu enquadramento, bem como estabelece os padrões de qualidade e de lançamento, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 2005.

CORAL, J. Propionic acid production by *propionibacterium sp.* Using low-cost carbon sources in submerged fermentation. Dissertação de mestrado. Biotechnologist and Bioprocess Engineering, Division Federal University of Parana, 2008.

CUETOS, M. J.; GOMÉZ, X.; OTERO, M.; MORÁN, A. Anaerobic digestion of solid slaughterhouse waste (SHW) at laboratory scale: Influence of co-digestion with the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW), **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 99-106, 2008.

EKMAN, A.; BÖRJESSON, P. Environmental assessment of propionic acid Produced in an agricultural biomass-based biorefinery system. **Journal of Cleaner Production**, n.19, p.1257-1265, 2011.

ELBESHBISHY, E.; NAKHLA, G. Batch anaerobic co-digestion of proteins and carbohydrates. **Bioresource Technology**, n.116, p. 170-178, 2012.

FAN, Y.; LI, C.; LAY, J.J.; HOU, H.; ZHANG, G. Optimization of initial substrate and pH levels for germination of sporing hydrogen-producing anaerobes in cow dung compost. **Bioresource Technology**, n.91, p. 189-193, 2004.

FANG, H. P.; LIU, H. Effect of pH on Hydrogen production from glucose by a mixed culture. **Bioresource Technology**, n. 82, p. 87-93, 2002.

FORESTI, E.; FLORÊNCIO, L.; HAANDEL, A.V.; ZAIAT, M.; CAVALCANTI, P.F.F. Fundamentos do Tratamento Anaeróbio. In: José Roberto Campos. (Org.). **Sistemas Anaeróbios para Tratamento de Esgoto Doméstico**. 1ªed. Rio de Janeiro: ABES, p. 29-52, 1999.

FORMANEK, J.A. Genetic manipulation and characterization of solvent producing clostridia. Ph.D. **Thesis**. University of Illinois, IL, USA, 1998.

GALLERT, C.; WINTER, J. Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology. **Naturwissenschaften**, n.89, p.483-496, 2002.

GAVALA, H.N.; SKIADAS, I.O.; AHRING, B.K. Biological hydrogen production in suspended and attached growth anaerobic reactor system. **International Journal of Hydrogen Energy**, n.31, p. 1164-1175, 2005.

GÓMEZ, X.; CUETOS, M.J.; CARA, J.; MORÁN, A.; GARCÍA, A.I. Anaerobic co-digestion of primary sludge and the fruit and vegetable fraction of the municipal solid wastes – Conditions for mixing and evaluation of the organic loading rate. **Renewable Energy**, n.31, p. 2017-2024, 2006.

GOSWAMI, V., SRIVASTAVA, A.K. Fed-batch propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici*. **Biochemistry Engineering Journal**, n.4, v.2, 121–128, 2000.

GOSWAMI, V.; SRIVASTAVA, A.K. Propionic acid production in an in situ cell retention bioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.56, p.676-680, 2001.

GHANIMEH, S.; EL FADEL, M.; SAIKALY, P. Mixing effect on thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic fraction of municipal solid waste. **Bioresource Technology**, n.117, p.63-71, 2012.

HAWKES, F. R.; DINSDALE, R.; HAWKES, D. L.; HUSSY, I. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. **International Journal of Hydrogen Energy**, n. 27, p. 1339-1347, 2002.

HEINSMAN, J.A.; MONTGOMERY, D.C. Optimization of a household product formulation using a mixture experiment. **Quality Engineering**, v.7, n.3, p. 583-600, 1995.

HIMMI, E.H.; BORIES. A.; BOUSSAID, A.; HASSANI, L. Effects of inoculants containing propionic bacteria on fermentation and aerobic and *Propionibacterium freudenreichii* ssp *shermanii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.53, p. 435-440, 2000.

HOCH, J.A. Panspermia, spores and the *Bacillus subtilis* genome. **Nature**, n.390, p.237-238, 1997.

HOFFMANN, R.A.; GARCIA, M.L.; VESKIVAR, M.; KARIM, K.; AL-DAHMAN, M.H.; ANGENENT, L.T. Effect of shear on performance and microbial ecology of continuously stirred anaerobic digesters treating animal manure. **Biotechnology and Bioengineering**, n.100, p.38–48, 2008.

HORIUCHI, J.I.; SHIMIZU, T.; TADA, K.; KANNO, T.; KOBAYASHI, M. Selective production of organic acids in anaerobic acid reactor by pH control. **Bioresource Technology**, n.82, p. 209-213, 2002.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia Estatística, 2012. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2&z=t&o=22&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1>> Acesso em 03.12.12.

ISRAEL, C.M. **Utilização do resíduo do processamento do palmito para a produção de enzimas hidrolíticas por fungos do gênero Polyporus**. Dissertação de mestrado, FURB, 2005.

IYER, P.; BRUNS, M. A.; ZHANG, H.; VAN GINKEL, S.; LOGAN, B.E. Hydrogen producing bacterial communities from a heat-treated soil inoculums. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.66, p. 166-173, 2004.

JOHN, R.P.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.74, p.524–534, 2007.

KERJEAN, J.R.; CONDON, S.; LODI, R.; KALANTZOPOULOS, G.; CHAMBA, J.; SUOMALAINEN, T.; COGAN, T.; MOREAU, D. Improving the quality of European hard-cheeses by controlling of interactions between lactic acid bacteria and propionibacteria. **Food Research International**, n. 33, p. 281–287, 2003.

KIM, M.; AHN, Y.; SPEECE, R.E. Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion; mesophilic vs. thermophilic. **Water Research**, n.36, 4369-4385, 2002.

KIM, S.; HAN, S.; SHIN, H. Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. **Process Biochemistry**, n.41, p.199-207, 2006.

LEITE, A. C. J., FERNANDES, B. S., POZZI, E., BARBOZA, M., ZAIAT, M. Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. **International Journal of Hydrogen Energy**, n.33, 579-586; 2008.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica. São Paulo, 3ªed. Ed. Sarvier, 2002.

LI, H.; LI, C.; LIU, W.; ZOU, S. Optimized alkaline pretreatment of sludge before anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, n.123, p. 189-194, 2012.

LIM, S.J., KIM, J.K., JEONG, C. M., CHOI, J., AHN, Y. H., CHANG, H. N. Anaerobic organic acid production of food waste in once-a-day feeding and drawing-off bioreactor. **Bioresource Technology**, n.99, 2008.

LIN, C.Y.; LEE, C.Y.; TSENG, I.C.; SHIAO, I.O. Biohydrogen production from sucrose using base-enriched anaerobic mixed microflora. **Process Biochemistry**, n.41, p.915-919, 2006.

LIN, C. N.; WUA, S.Y.; CHANGA, J.S.; CHANG, J.S. Biohydrogen production in a three-phase fluidized bed bioreactor using sewage sludge immobilized by ethylene–vinyl acetate copolymer. **Bioresource Technology**, n. 100, p. 3298–3301, 2009.

LIU, D. C.; OCKERMAN, H. W. **Meat co-products**. In: HUY, Y. H.; NIP, W.; ROGERS, R. W.; YOUNG, O. A. Meat science and applications, New York: Marcel Dekker, cap. 5, p. 581-603, 2001.

LIU, W.T.; CHAN, O.N.; FANG, H.H.P. Microbial community dynamics during start up of acidogenic anaerobic reactors. **Water research**, n.36, p. 3203-3210, 2002.

LOSS, E.; ROYER, A.R.; RODRIGUES, M.B.; BARANA, A.C. Use of maize wastewater for the cultivation of the *Pleurotus* spp. Mushroom and optimization of its biological efficiency. **Journal of Hazardous Materials**, n.166, p.1522–1525, 2009.

MADDIPATI, P.; ATIYEH, H.K.; BELLMER, D.D.; HUHNKE, R.L. Ethanol production from syngas by *Clostridium* strain P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract. **Bioresource Technology**, n.102, p.6494–6501, 2011.

MARCHAIM, U. **Biogas Processes for Sustainable Development**. FAO, Rome, Italy, 1992.

MARTINELLI, L.A.; GARRETT, R.; FERRAZ, S.; NAYLOR, R. Sugar and ethanol production as a rural development strategy in Brazil: Evidence from the state of São Paulo. **Agricultural systems**, n. 104, p. 419-428, 2011.

MIRZOYAN, N.; TAL, Y.; GROSS, A. Anaerobic digestion of sludge from intensive recirculating aquaculture systems: Review. **Aquaculture**, n.306, p. 1-6, 2010.

MOCKAITIS, G.; LEITE, J.A.C.; PASOTTO, M. B.; ZAIAT, M. Biosynthesis of propionic acid by anaerobic processes. In: James C. Taylor (Org). **Advances in Chemistry Research**. 1ªed. New York: Nova Science Publishers, n.16, p.1-8, 2011.

MORAES, A.L.M. Brazil responses to the world economic and financial crisis: an agricultural approach. **Revista de Política Agrícola**. n.18, p. 29–35, 2009.

MOSEY, F. E. Mathematical modeling of the anaerobic digestion process: Regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile fatty acids from glucose. **Water Science Technology**, Copenhagen, n.15, p. 209-232, 1983.

MSHANDETE, A.; KIVAIISI, A.; RUBINDAMAYUGI, M.; MATTIASSON, B. Anaerobic batch co-digestion of sisal pulp and fish wastes. **Bioresource Technology**, n.95, p.19–24, 2004.

NAIME, R.; GARCIA, A.C. Utilização de enraizadas no tratamento de efluentes agroindustriais. **Estudos Tecnológicos**, v.1, n.2, p.9-20, 2005.

NEPSTAD, D.C.; SOARES-FILHO, B.S.; MERRY, F.; LIMA, A.; MOUTINHO, P.; CARTER, J.; BOWMAN, M.; CATTANEO, A.; RODRIGUES, H.; SCHWARTZMAN, S.; MCGRATH, D.G.; STICKLER, C.M.; LUBOWSKI, R.; PIRIS-CABEZAS, P.; RIVERO, S.; ALENCAR, A.; ALMEIDA, O.; STELLA, O. The end of deforestation in the brazilian amazon. **Science**. n.326, 1350–1351, 2009.

NUNES, D.B. **Rotinas para a otimização experimental de misturas, 1998, 163f. Dissertação** (Mestrado em Engenharia de Produção), Área de concentração: Engenharia da Qualidade – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

OZADALI, F.; GLATZ, B.A.; GLATZ, C.E. Fed-batch fermentation with and without on-line extraction for propionic and acetic acid production by *Propionibacterium acidipropionicum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.44, p.710-716, 1996.

PAIK, H.D.; GLATZ, B.A. Propionic acid production by immobilized cells of a propionate-tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.42, p.22-27, 1994.

PAREKH, M., FORMANEK, J., BLASCHECK, H.P. Pilot-scale production of butanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 using a low-cost corn steep water based fermentation medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.51, p.152–157, 1999.

PAULI T.; FITZPATRICK J.J. Malt combining nuts as a nutrient supplement to whey permeate for producing lactic by fermentation with *Lactobacillus casei*. **Process Biochemistry**, n.38, p.1–6, 2002.

PEREIRA, A.D.; BEVILACQUA, P.D.; BASTOS, R.K.X.; BRITO, G.M.; SEPULVEDA, R.V. Qualidade microbiológica da biomassa produzida em um sistema de wetlands construídas. In: 25º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. CD-ROM, 2008.

PLAYNE, M. J., Propionic and Butyric Acids. In: *Moo-young, M. Comprehensive Biotechnology*. **Great Britain:Pergamon Press**, p. 731-759, 1985.

PODLECH P.A.S.; LUNA M.F.; JERKE P.R.; DE SOUZA NETO C.A.C.; DOS PASSOS R.F.; SOUZA O. Semicontinuous lactic fermentation of whey by *Lactobacillus bulgaricus*. I. Experimental results. **Biotechnology Letters**, n.12, p.531–534, 1990.

PRAKASHAM, R.S.; SATHISH, T.; BRAHMAIAH, P.; RAO, Ch. S.; RAO, R.S.; HOBBS, P.J. Biohydrogen production from renewable agri-waste blend: Optimization using mixer design. **International Journal of Hydrogen Energy**, n. 34, p. 6143-6148, 2009.

RODRIGUES, C., VANDENBERGHE, L. P. S., TEODODRO, J., PARADA, J. L., MIAYOCA, M., SOCCOL, C. R. Produção de ácido propiônico por fermentação submersa utilizando diferentes substratos. XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos – SINAFERM, 1-CD-ROM, p. 7, Curitiba- PR, 2007.

SANO, A.; YASUDA, K.; KATO, Y.; BANDO, Y.; NAKAMURA, M. Hydrogen fermentation by using heat-shocked granular sludge. **Journal Chemical Engineering of Japan**, n.39, p. 580-582, 2006.

SARAIVA, A.B.; MENDONÇA, R.C.S.; PEREIRA, D.A. Subsídios para o uso sustentável da água em uma indústria de laticínio de pequeno porte: avaliação do consumo e geração de efluentes. *Revista Brasileira de Agroecologia*, v.4, n.2, p.568-571, 2009.

SARAIVA, A.B.; MENDONÇA, R.C.S.; SANTOS, A.L.; PEREIRA, D.A. Consumo de água e geração de efluentes em uma indústria de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n.367/368, p.10-18, 2009.

SENA, R.F. **Tratamento de efluentes da indústria de processamento de carnes utilizando flotação por ar dissolvido e processos de oxidação avançada**. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

SENHORAS, E.M. **Oportunidades da cadeia agroindustrial do coco verde. Do coco verde nada se perde tudo se desfruta**. Revista Urutaguá 2004. Disponível em : http://www.urutagua.uem.br//005/22eco_senhoras.htm Acesso: 15 ago de 2011.

SOSNOWSKI, P.; WIECZOREK, A.; LEDAKOWICZ, S. Anaerobic co-digestion of sewage sludge and organic fraction of municipal solid wastes. **Advances in Environmental Research**, n. 7, p.609-616, 2003.

SOSNOWSKI, P.; KLEPACZ-SMOLKA, A.; KACZOREK, K.; LEDAKOWICZ, S. Kinetic investigations of methane co-fermentation of sewage sludge and organic fraction of municipal solid wastes. **Bioresource Technology**, n. 99, p.5731-5737, 2008.

SOUTHGATE, D.A.T. **Determination of food carbohydrates**. Elsevier Applied Science, p.232, 1991.

SREETHAWONG, T.; CHATSIRIWATANA, S.; RANGSUNVIGIT, P.; CHAVADEJ, S. 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**, n.35, p. 4092-4102, 2010.

SUPERQUIMICA – **Ficha de informações de segurança de produto químico – FISPQ**. Superquímica – Disponível em www.superquimica.com.br/fispq, acesso dia 14/06/2013, 2008.

SUWANNAKHAM, S. **Metabolic engineering for enhanced propionic acid fermentation by propionibacterium acidipropionici**. Tese de doutorado. Univ. Estatal de Ohio, Columbus, USA, 2005.

TIAN, Z.; CHAULIAC, D.; PULLAMMANAPPALLIL, P. Comparison of non-agitated and agitated batch, thermophilic anaerobic digestion of sugarbeet taigs. **Bioresource Technology**, n. 129, p. 411-420, 2013.

TICM, Spanish Ministry of Tourism, Trade and Industry. **Spanish Royal Decree R.D. 661/2007**, de 25 de Mayo, por el que se regula la actividad de producción de energía eléctrica régimen especial (in Spanish). BOE 126, 22846–22886, 2007.

TRITT, W.P.; SCHUCHARDT, F. Materials flow and possibilities of treating liquids and solids wastes from slaughterhouses in Germany: a review. **Bioresource Technology**, n.41, p.235-245, 1992.

VAN GINKEL, S.; SUNG, S.; LAY, J.J. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. **Environmental Science and Technology**, n.35, p. 4726-4730, 2001.

VAN GINKEL, S.; LOGAN, B.E. Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids. **Environmental Science and Technology**, n.39, p.9351-9356, 2005.

VAVILIN, V.A., ZAIKIN, A.N. Effect of solution mixing on a rate of the autocatalytic reaction. **Kinetics and Catalysis**, n.12, p.309–313, 1971.

VAVILIN, V.A.; ANGELIDAKI, I. Anaerobic degradation of solid material: importance of initiation centers for methanogenesis, agitation intensity, and 2D distributed model. **Biotechnology and Bioengineering**, n. 89, p. 113–122, 2005.

YU, H.Q.; FANG, H.P. Acidification of mid and high-strength dairy wastewaters. **Water science and technology**, v.35, n.15, p. 3697-3705, 2001.

YU, H.Q.; ZHENG, X.J.; HU, Z.H.; GU, G.W. High-rate anaerobic hydrolysis and acidogenesis of sewage sludge in a modified upflow reactor. **Water Science and Technology**, v. 48, n.4, p. 69-75, 2003.

ZABRISKIE, D.W.; ARMIGER, W.B.; PHILLIPS, D.H.; ALBANO, P.A. Traders' guide to fermentation media formulation. **Traders Protein**, Memphis, Tenn, 1980.

ZHABOTINSKY A.M. A history of chemical oscillations and waves. **Chaos**, n.1, p.379–385, 1991.

ZHANG, A.; YANG, S.T. Propionic acid production from glycerol by metabolically engineered *Propionibacterium acidipropionici*. **Process Biochemistry**, n.44, p.1346-1351, 2009.

ZHANG, Y.; SHEN, J. Effect of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, n. 31, p. 441-446, 2005.

ZHANG, P. Z.; SHOW, K.Y.; TAY, J.H.; LIANG, D.T.; LEE, D.J.; JIANG, W.J. Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production and anaerobic microbial community. **Process Biochemistry**, n.41, p.2118-2123, 2006.

ZHU, Y., LI, J., TAN, M., LIU, L., JIANG, L., SUN, J., LEE, P., DU, G., CHEN, J. Optimization and scale-up of propionic acid production by propionic acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici* with glycerol as the carbon source. **Bioresource Technology**, n.101, 2010.

WANG, J.; WAN, W. Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. **International Journal Hydrogen Energy**, n. 33, p. 2934-2941, 2008.

WANG, X.; YANG, G.; LI, F.; FENG, Y.; REN, G.; HAN, X. Evaluation of two statistical methods for optimizing the feeding composition in anaerobic co-digestion: Mixture design and central composite design. **Bioresource Technology**, n.131, p.172-178, 2013.

WU, S.Y.; LIN, C.N.; CHANG, J.S. Hydrogen production with immobilized sewage sludge in three-phase fluidized-bed bioreactors. **Biotechnology Progress**, n.19, p. 828-832, 2003.