



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



Produção de Hidrogênio e Etanol a partir da Alga Verde
Chlamydomonas reinhardtii

Uberlândia - MG - Brasil

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



Produção de Hidrogênio e Etanol a partir da Alga Verde
Chlamydomonas reinhardtii

Rosangela Lúcio Costa

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiana Regina Xavier
Batista**

**Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Química da Universidade Federal de Uberlândia
como parte dos requisitos necessários à obtenção
do título de Mestre em Engenharia Química.**

Uberlândia - MG

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C837p
2014
Costa, Rosangela Lúcio, 1978-
Produção de Hidrogênio e Etanol a partir da alga verde
Chlamydomonas reinhardtii / Rosangela Lúcio Costa. - 2014.
86 f. : il.

Orientadora: Fabiana Regina Xavier Batista.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.
Inclui bibliografia.

1. Engenharia química - Teses. 2. Biogás - Teses. 3. Hidrogênio -
Moléculas - Teses. 4. Biocombustíveis - Teses. I. Batista, Fabiana
Regina Xavier. II. Universidade Federal de Uberlândia, Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

CDU: 66.0


DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM21/07/2014

BANCA EXAMINADORA:



Prof.^a. Dr.^a. Fabiana Regina Xavier Batista

Orientador (PPG-EQ/UFU)



Prof.^a. Dr.^a. Juliana de Souza Ferreira

Colaboradora (PPG-EQ/UFU)



Prof.^a. Dr.^a. Miria Hespanhol M. Reis

(PPG-EQ/UFU)



Prof.^a. Dr.^a. Vicelma Luiz Cardoso

(PPG-EQ/UFU)



Prof. Dr. Álvaro Paiva Braga de Sousa

(Instituto de Tecnologia em

Imunobiológicos Bio - Manguinhos)

Dedico este trabalho aos meus pais, Agostinho (em memória) e Madalena, pelo apoio incondicional em todas as etapas, compreensão e muito carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me ter dado a oportunidade de viver esta existência, as dificuldades, que me tornam mais forte a cada dia, pelas alegrias e conquistas, e principalmente pela paciência, para não me entregar ao desamino diante das minhas fraquezas.

Agradeço aos meus pais, Agostinho (em memória) e Madalena, pelo incondicional apoio em todas as etapas da minha vida. Obrigado ao meu pai que me deixou a herança mais valiosa, o conhecimento. Foi pelo exemplo de caráter, humildade e respeito de ambos que me tornei quem sou hoje. E a você meu querido pai, a quem dedico este trabalho.

À Prof.^a Dr. Fabiana Regina Xavier Batista por acreditar e ter grande confiança em minha pessoa, pela eficaz e dedicada orientação e principalmente pela amizade formada, agradeço pela oportunidade a mim concedida.

À Prof.^a Dr. Juliana de Souza Ferreira pela ajuda e entusiasmo durante todas etapas da pesquisa e pela amizade.

Aos funcionários da FEQUI: Cléo e Cecília, sempre dispostas a ajudar.

Aos funcionários do posto de tecnologia avançada da UFU: Ana Cláudia, Olésia, Wesley, pelo apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade concedida.

Aos órgãos de fomento, CAPES, FAPEMIG e CNPQ pela oportunidade concedida de fazer parte do programa de pós-graduação e pelo apoio financeiro, sem o qual este projeto não poderia ser realizado.

Aos meus colegas de laboratório pelo apoio incondicional nos momentos difíceis, jamais esquecerei. Em especial a minha querida amiga Thamayne Valadares de Oliveira, por muitas horas perdidas em meu auxílio, foram demasiadamente úteis. Ao meus amigos Bruno Arantes Moreira e Deivid Marques Nunes pelas suas palavras de incentivo ao longo desta caminhada. Enfim, a todos que colaboraram de uma forma ou outra, para o bom desenvolvimento deste trabalho.

Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a Vontade.

Albert Einstein

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas.....	xi
Lista de Quadros.....	xii
Simbologia.....	xiii
Resumo.....	xiv
“Abstract”	xv
1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVO	22
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1 Fontes de energia renovável.....	23
3.2 Hidrogênio	24
3.3 Produção de hidrogênio: o uso de rotas biológicas	24
3.4 Etanol	33
3.5 Produção de Etanol com algas verdes.....	34
3.6 Parâmetros que influenciam na produção de biocombustíveis	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Alga verde e meio de cultivo	39
4.2 Condições de cultura	41
4.2.1 Reativação da <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	41
4.2.2 Cultivo do inóculo	42
4.3 Condições para a fermentação	42
4.4 Produção de hidrogênio molecular e bio-etanol por fotofermentação	44
4.4.1 Avaliação da idade do inóculo.....	44
4.4.2 Avaliação do tempo de fermentação.....	44
4.4.3 Avaliação da concentração celular	44
4.4.4 Avaliação do teor de enxofre presente no meio.....	44
4.4.5 Avaliação do efeito da concentração celular do inóculo, teor de enxofre e temperatura na produção de H ₂ realizada através de planejamento fatorial 2 ³ (I)	45
4.4.6 Avaliação das fontes de carbono através do planejamento fatorial 2 ³ (II)	46

4.4.7	Avaliação do sistema de co-cultura	49
4.5	Metodologia analítica.....	50
4.5.1	Determinação da concentração celular	50
4.5.2	Análises cromatográficas.....	52
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	54
5.1	Avaliação da idade do inóculo	54
5.2	Avaliação do tempo de fermentação	55
5.3	Avaliação da concentração celular do inóculo.....	57
5.4	Avaliação do teor de enxofre presente no meio	59
5.5	Avaliação da concentração celular do inóculo, teor de enxofre e temperatura na produção de H ₂	63
5.6	Avaliação de fontes de carbono	65
5.7	Sistema híbrido	71
5.7.1	Ensaio 1	71
5.7.2	Ensaio 2	74
5.7.3	Ensaio 3	75
5.8	Co-cultura de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> e a <i>Rhodobacter capsulatus</i>	76
6.	CONCLUSÕES	79
6.1	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	81
	REFERÊNCIAS	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Modelo esquemático de produção de hidrogênio via biofotólise direta. H ₂ ase representa a enzima [FeFe]-hidrogenase.	25
Figura 3.2 - (a) Alga verde unicelular <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (KOTYK, 2008); (b) Vias de transporte de elétrons relacionadas à hidrogenase em algas.	27
Figura 3.3- Modelo esquemático de produção de hidrogênio via biofotólise indireta.	28
Figura 3.4 - Vias de transportes de elétrons relacionados a produção de hidrogênio através da nitrogenase.	30
Figura 3.5- Esquema experimental da biofotólise baseado na fotossíntese por algas verdes.....	32
Figura 3.6 - Esquema experimental da co-cultura entre algas verdes e bactérias.	33
Figura 3.7 - Caracterização do processo de produção da fase industrial de uma usina com processo conjunto para obtenção de açúcar, etanol e eletricidade.	34
Figura 3.8-Diagrama das vias fermentativas da alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	36
Figura 4.1 - Fluxograma experimental das etapas executadas no presente estudo.....	39
Figura 4.2 - Fermentação das algas verdes <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	43
Figura 4.3 -Curva de calibração para a <i>C. reinhardtii</i> com R ² =0,992.....	51
Figura 4.5 -(a) kit de transferência;(b) ampolas de armazenamento;(c) transferência do gás para as ampolas.	52
Figura 4.6 - (a) seringa para uso no CG; (b) transferência do gás para a seringa do CG;.....	53
Figura 5.1 - Análise dos efeitos (meio, concentração celular de inóculo, temperatura e suas interações) para a produção de H ₂	64
Figura 5.2- Análise dos efeitos (acetato, citrato, permeado e suas interações) para a produção de H ₂	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Produção de energia primária no Brasil em % no período de 2008/2012.....	23
Tabela 4.1 - Composição do meio TAP.	40
Tabela 4.2 - Composição da solução TAP sais.	40
Tabela 4.3 - Composição do solução de fosfato e traços de elementos.....	40
Tabela 4.4 - Componentes do Sais TAP com a substituição dos sulfatos por cloreto.....	41
Tabela 4.5 - Componentes do traço de elementos com a substituição dos sulfatos por cloreto.	41
Tabela 4.6 – Variáveis independentes (teor de SO_4^{2-} , concentração celular de inóculo e temperatura) e seus respectivos níveis utilizados no planejamento fatorial 2^3 (I).....	45
Tabela 4.7 - Planejamento fatorial 2^3 (I) com três réplicas no ponto central para a análise das variáveis teor de SO_4^{2-} , concentração celular do inóculo e temperatura (valores reais entre parênteses).	46
Tabela 4.8 - Variáveis independentes (concentração de acetato, citrato e permeado) e seus respectivos níveis utilizados no planejamento fatorial 2^3 (II)	46
Tabela 4.9 - Planejamento fatorial 2^3 (II) com três réplicas no ponto central para a análise das variáveis fontes de carbono (valores reais entre parênteses)	47
Tabela 4.10 - Componentes do meio basal RCV originalmente utilizado para cultivo da <i>Rhodobacter capsulatus</i>	49
Tabela 4.11 - Composições da solução de micronutrientes utilizada no meio basal RCV.	49
Tabela 4.12 -Experimentos realizados com a co-cultura da <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> e <i>R. capsulatus</i> nos meios de cultura RCV e TAP, respectivamente.	50
Tabela 5.1 - Concentração final de células e volume de biogás obtidos em 5 dias de fermentação. A concentração celular do inóculo utilizada foi de 0,10g/L. (1) concentração celular final (g/L), (2) produtividade de H_2 , (3) produtividade de O_2 , ambas em $\mu\text{mol/L}\cdot\text{d}$ e (4) volume de biogás produzido (mL).....	54
Tabela 5.2 -Concentrações de ácidos obtidas nas análises em HPLC, para uma concentração celular de 0,10 g/L, sendo as idades da cepa 5, 10, 15 dias avaliadas.	55
Tabela 5.3 - Avaliação do tempo de fermentação na produção de células e de biogás, com concentração celular do inóculo de 0,10g/L.....	56
Tabela 5.4 - Avaliação do tempo de fermentação na evolução de ácidos orgânicos, etanol e hidrogênio. A concentração inicial de inóculo de 0,10g/L foi utilizada. (1) ácido acético, (2) ácido propiônico, (3)	

ácido butírico todos em mmol/L, (4) etanol em mmol/L, (5) produtividade de H ₂ e (6) produtividade de O ₂ , ambos em μmol/L·d.....	57
Tabela 5.5- Concentrações de ácidos orgânicos e etanol obtidas após 5 dias de fermentação em culturas com idade de inóculo foi de 10 dias.....	57
Tabela 5.6 - Concentração final de células e volume de biogás obtidos em 5 dias de fermentação, variando a concentração inicial. (1) Concentração Celular Final (g/L), (2) produtividade de H ₂ , (3) produtividade de O ₂ ambas em μmol/L·d e (4) biogás produzido em mL.....	58
Tabela 5.7 –Investigação do efeito do enxofre residual na produção de H ₂ . A idade de inóculo de 10 dias foi fixada sendo as concentrações de inóculo de 0,10 e 0,20 g/L avaliadas.....	59
Tabela 5.8 - Comparação da produtividade de H ₂ a partir de uma fermentação em meio isento de enxofre.....	62
Tabela 5.9- Produtividade de H ₂ e concentrações de ácidos obtidos no planejamento fatorial 2 ³ (I). (1) produtividade de H ₂ , (2) produtividade de O ₂ ambas em μmol/L·d, (3) ácido acético, (4) ácido propiônico, (5) etanol em mmol/L.....	63
Tabela 5.10 - Estimativa dos efeitos (meio, concentração celular e temperatura) na produtividade de H ₂ (μM·H ₂ /L·d) por <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	65
Tabela 5.11 - Avaliação do efeito das fontes de carbono (0,10 e 1 g/L) na produção de H ₂ . A concentração celular de inóculo da alga foi de 0,10 g/L. Na qual, (1) ácido acético, (2) ácido propiônico, (3) ácido fórmico, (4) etanol em mmol/L e (5) produtividade de H ₂ em μmol/L·d.....	66
Tabela 5.12 - Comparação da produção de etanol a partir de diferentes sistemas fermentativos.....	67
Tabela 5.13 –Planejamento fatorial 2 ³ (II)com 3 réplicas no ponto central, As variáveis independentes foram a concentração de acetato, citrato e permeado. A concentração celular de inóculo foi de 0,10 g/L e o teor de enxofre de 10 mg SO ₄ ²⁻ . (1) produtividade de H ₂ , (2) produtividade de O ₂ ambas em μmol/L·d, (3) concentração celular final (g/L).....	68
Tabela 5.14 - Comparação entre os dados de síntese metabólica para o planejamento fatorial supracitado, (1) Ácido Lático, (2) Ácido Acético, (3) Ácido Propiônico, (4) Ácido Málico, (5) Lactose, (6) Ácido Fórmico, todos em mmol/L.....	69
Tabela 5.15 - Estimativa dos efeitos na produtividade de H ₂ por <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	70
Tabela 5.16 - Resultados do sistema híbrido para a concentração celular de inóculo de alga e bactéria de 0,10g/L e tempo de fermentação de 5 dias. No qual, (1) Ácido Lático; (2) Ácido Fórmico, (3) Ácido Acético; (4) Ácido Propiônico; (5) Ácido Butírico; (6) Etanol em mmol/L e (7) H ₂ em μmol/L·d.....	72
Tabela 5.17 - Comparação da produção de hidrogênio e etanol a partir de diferentes sistemas fermentativos.....	73

Tabela 5.18 - Resultados do sistema híbrido com fontes de carbono (0,1g/L), concentração celular de alga e bactéria de 0,10g/L e fermentação de 5 dias. Onde (1) ácido acético, (2) ácido propiônico, (3) ácido fórmico, (4) etanol em mmol/L e (5) produtividade de H ₂ em μmol/L·d.	74
Tabela 5.19 – Produtos obtidos a partir do uso de fontes de carbono (1g/L) suplementares. A concentração celular de 0,10 g/L para ambos micro-organismos (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> e <i>Rhodobacter capsulatus</i>).....	75
Tabela 5.20 - Produtos do metabolismo da co-cultura mantida em meio RCV, onde(1) Produtividade H ₂ (μmol/L·d), (2) Ácido Lático, (3) Ácido Acético, (4) Ácido Propiônico, (5) Ácido Butírico, (6) Etanol em mmol/L.	77
Tabela 5.21 - Produtos do metabolismo da co-cultura mantida em meio TAP. Na qual (1) Produtividade H ₂ (μmol/L·d), (2) Ácido Lático, (3) Ácido Acético, (4) Ácido Propiônico, (5) Ácido Butírico, (6) Etanol em mmol/L.	77

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1 - Comparação entre os principais processos biológicos da produção de hidrogênio.	31
Quadro 4.1 - Condições de cultivo empregadas nas culturas de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> e <i>Rhodobacter capsulatus</i> para o sistema híbrido. Em ambas as fermentações a concentração inicial de inóculo foi de 0,1g/L e o tempo de fermentação de 5 dias.....	48
Quadro 4.2 - Ensaio híbridos utilizando as algas verdes <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> e <i>Rhodobacter capsulatus</i> com diferentes fontes de carbono.....	48

SIMBOLOGIA

Acetato de Sódio – AC

Adenosina Trifosfato (*Adenosine Triphosphate*) - ATP

Álcool desidrogenase – ADH

Atimicina – A

Chlamydomonas reinhardtii– C

Citocromo do complexo *b* – Cyt *b*

Citocromo do complexo *f* – Cyt *f*

Citrato de Sódio – C

Concentração Celular - C.C.

Desidrogenase bifuncional aldeído/álcool – ADH1

D-lactato desidrogenase – D-LDH

Enzima da hidrogenase - [FeFe]-hidrogenase

Ferredoxina – Fd

Ferro – Fe

Ferredoxina via oxidoreductase - UR

Ferredoxina-NAD(P)⁺-oxido reductase – FRN

Fosfo-acetiltransferase – PTA

Fotossistema I – FSI

Fotossistema II – FSII

Hidrogênio – H₂

Hidrogênio – H₂

NAD(P)H-oxido reductase – Red

Nucleotídeos da nicotinamida – NAD(P)H

Oxigênio – O₂

Permeado – PE

Peso em mg de massa seca – P_i

Peso em mg de massa úmida – P_o

Peso em mg de sólidos fixos - P_f
Piruvato ferredoxina oxido-redutase - (PFR1)
Piruvato-descarboxilase – PDC
Piruvato-formato-liase – PFL1
Quinase de etilo – ACK
R. capsulatus - R
Sólidos Fixos – SF
Sólidos Totais – ST
Sólidos Voláteis – SV
Sulfato – SO_4^{2-}
Temperatura – T
Ubiquinona - UQ
Volume – V

RESUMO

Em virtude da redução da disponibilidade de combustíveis fósseis, juntamente com as mudanças climáticas ocasionadas pelo aumento da concentração de dióxido de carbono na atmosfera, a utilização de combustíveis alternativos que não ocasionem o acúmulo de gases do efeito estufa na atmosfera tem se tornado cada vez mais recorrente. Desta maneira se destaca a utilização de biocombustíveis como o hidrogênio (H_2). O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de biocombustíveis através de rota biológica, utilizando reatores de 50 mL lacrados, mantidos em uma estufa à $25^\circ C$ com foto-período de 12h e intensidade luminosa de 2200 lux ($30 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$). Neste contexto, a alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* foi utilizada, sendo que os parâmetros operacionais idade do inóculo, concentração celular de inóculo e tempo de fermentação, juntamente com o efeito da concentração de enxofre no meio de cultivo foram avaliados. Salienta-se que o fator temperatura também foi avaliado e para tal, um planejamento fatorial 2^3 (I), com 3 réplicas no ponto central, foi utilizado. A influência das variáveis independentes, teor enxofre no meio (7, 11,5 e 16 mg de SO_4^{2-}), concentração celular de inóculo (0,10, 0,15 e 0,20 g/L) e temperatura (25, 30 e $35^\circ C$) na variável resposta produtividade de H_2 foi investigada. Além disso, o desempenho de algumas fontes de carbono como o acetato de sódio e permeado de soro de leite (rico em lactose) também foi verificado isoladamente. Neste experimento, o meio com supressão de enxofre e uma concentração inicial de inóculo de 0,1 g/L foram empregados. O efeito de outras fontes de carbono também foi verificado através do planejamento fatorial 2^3 (II), com três réplicas no ponto central. Neste caso, o efeito do citrato de sódio, juntamente com o acetato de sódio (0,10, 1 e 1,9 g/L) e o permeado do soro de leite (1, 1,5 e 2 g/L), em um meio basal contendo teor fixo de enxofre (10 mg SO_4^{2-}) e a concentração celular de inóculo de 0,10 g/L, foi investigado. Na sequência um sistema híbrido composto por algas verdes e bactérias fotossintetizantes foi avaliado. Nesta etapa, a supressão total de enxofre e uma concentração celular de inóculo de 0,10 g/L foram utilizadas. Posteriormente, a avaliação de concentrações distintas (0,10 e 1 g/L) das fontes de carbono utilizadas foi verificada. O meio de cultivo fornecido às bactérias foi suplementado com substratos como ácido málico (30 mmol/L), permeado (6 g/L) e o glutamato de sódio (2,54 g/L). Destacou-se ainda a investigação do uso da co-cultura das algas e das bactérias na síntese do produto-alvo. Neste experimento a contribuição das algas e bactérias em uma proporção que variou de 0 a 100% foi avaliada. Os resultados mais promissores mostraram que o citrato (1,9 g/L) e o permeado (2 g/L) influenciaram positivamente na produção de H_2 (1975,10 $\mu mol/L \cdot d$). No sistema híbrido, uma maior produção de etanol (19,93 g/L) foi observada na condição de 0,10 g/L de permeado associado ao acetato. Por fim, para a co-cultura observou-se que em meio basal RCV, etanol (12,60 g/L) e hidrogênio (7,41 $\mu mol/L \cdot d$) foram obtidos simultaneamente.

Palavra-chave: biogás, *Chlamydomonas reinhardtii*, hidrogênio molecular.

ABSTRACT

The lack of fossil fuels and the climate changes caused by increases on the carbon dioxide in the atmosphere encouraged the use of alternative fuels that do not cause greenhouse gases accumulation. Therefore, the use of biofuels, such as hydrogen (H₂), produced from renewable sources stands out. The aim of this work was to evaluate hydrogen and ethanol production by biological routes using 50 mL sealed bioreactor maintained in incubator at 25° C, 12 h photoperiod with luminosity of 2200 lux (30 μE·m⁻²·s⁻¹). A green alga *Chlamydomonas reinhardtii* was used. The operational parameters age of inoculum, inoculum density, time of fermentation and the effect of sulfur contents in the culture medium on the biofuels production were investigated. The temperature was also evaluated by a 2³ factorial design (I), with three central points was used. The influence of sulfur content into the medium (7, 11.5 e 16 mg of SO₄²⁻), inoculum density (0.10, 0.15 and 0,20 g/L) and the temperature (25, 30 e 35° C) on the H₂ productivity was evaluated. In addition, the behavior of carbon sources such as sodium acetate and milk whey permeate (rich in lactose) on the target-product synthesis was also verified. In this case, sulfur deprived condition and 0.1 g/L of inoculum density were used. To increase the hydrogen production the influence of different carbon sources was also investigated. In this case, 2³ factorial design (II) with three central points was also used. Furthermore, the effect of supplementary carbon source (sodium citrate) and sodium acetate, both varying from 0.1 g/L (low level) to 1.9 g/L (high level) and milk whey permeate (1, 1.5 and 2 g/L) using a basal medium with sulfur content of 10 mg SO₄²⁻ and inoculum density of 0.1 g/L were evaluated. To improve hydrogen system production a hybrid configuration using the green algae (*C. reinhardtii*) and the photosynthetic bacterium (*R. capsulatus*) was performed. In this step, sulfur deprived and 0.1 g/L inoculum density were fixed. After that, the carbon source at different concentrations (0.1 and 1 g/L) was evaluate. It is important to note the medium offered to PNS bacterium was previously supplemented with malic acid (30mM), permeate (6 g/L) and sodium glutamate(2.54 g/L). Co-cultures of both strains were also performed to biofuels evolution. In these experiments a microorganism contribution range was from 0 to 100%. The results shown that citrate (1.9 g/L) and permeate (2 g/L) strongly increased the hydrogen production (1975.10 μM/L·d). Ethanol was also produced with isolated carbon source was investigated. In the hybrid system, ethanol concentration was 1.3-fold (19,93 g/L) higher at 0.1 g/L of permeate associated to acetate. Finally, to co-culture maintained in RCV medium, ethanol (12,60 g/L) and hydrogen (7.41 μM/L·d) were obtained simultaneously.

Keyword: biogás, *Chlamydomonas reinhardtii*, molecular hydrogen.

INTRODUÇÃO

Os recentes aumentos de preço do petróleo têm incentivado as pesquisas por fontes alternativas que possam atender as necessidades de combustível da população moderna. Vários micro-organismos e resíduos orgânicos têm sido propostos como fontes sustentáveis. Que não geram impactos ambientais para produção de biocombustíveis como hidrogênio (H₂), etanol e biodiesel (ÇAKMAK *et al.*, 2014). O uso do hidrogênio pode ser dedicado ao consumo doméstico/industrial. Sendo este biocombustível facilmente convertido em electricidade. Além de ser utilizado em motores de combustão e os veículos elétricos (BALAT, 2009).

O hidrogênio é um combustível que se destaca pelo seu alto poder calorífico. O resultado de sua combustão gera apenas vapor de água, ao invés de dióxido de carbono que contribui para o efeito estufa. Mas o hidrogênio não é encontrado na natureza, assim como os combustíveis fósseis. Algumas estratégias tecnológicas foram desenvolvidas para a sua obtenção. Sua produção dá-se através de uma série de tecnologias de conversão como a reforma a vapor que utiliza gás natural, hidrólise termoquímica, além de sistemas fotoeletroquímicos. Ainda é possível produzir hidrogênio através da gaseificação e pirólise provenientes do carvão e de biomassa, bem como fazendo uso de sistemas fotobiológicos (direto e indireto), os quais utilizam água como matéria prima. A conversão biológica pode ser verificada através da fotossíntese, fermentação escura e fotofermentação (MADAMWAR *et al.*, 2000; DAS e VEZIROGLU, 2001), sendo a produção de hidrogênio fotossintética autotrófica baseada na absorção de dióxido de carbono e água. A grande desvantagem é a necessidade de uma fonte de luz constante para fornecer ao reator (BATISTA *et al.*, 2014).

Há um interesse crescente na produção de hidrogênio biológico. Pois as formas tradicionais de obtenção deste combustível ainda são dispendiosas e exibem impacto ambiental negativo. Reforça-se que a produção biológica ganhou atenção devido ao seu potencial como uma alternativa sustentável aos métodos convencionais. Exemplos de métodos biológicos para produção de hidrogênio são os processos que utilizam micro-organismos realizadores de fotossíntese. Destacam-se neste caso as bactérias fotossintetizantes e microalgas como as cianobactérias e as algas verdes. Estes indivíduos podem produzir o H₂ a partir da incidência luminosa e com base em duas enzimas (hidrogenase e nitrogenase), segundo DAS e VEZIROGLU (2001) e BATISTA *et al.* (2014).

Ressalta-se que as bactérias fotossintetizantes e as algas verdes produzem hidrogênio essencialmente através da regulação enzimática e elétrons gerados fotossinteticamente pela

redução de H^+ . A produção deste biocombustível em cianobactérias é principalmente acoplada à fixação de nitrogênio (BENEMANN *et al.*, 1980; SMITH *et al.*, 1992). As microalgas destacam-se em virtude do seu potencial de produção de biocombustíveis e derivados (TEVATIA *et al.*, 2012), e pela capacidade em absorver a luz solar e convertê-la em lipídios e proteínas (AMIN *et al.*, 2009). Os sistemas fermentativos utilizando algas podem propiciar a síntese de inúmeros subprodutos além do H_2 . Sendo que o sobrenadante da cultura pode ser rico em ácidos orgânicos como ácido acético, butírico, lático, málico, propiônico, fórmico, dependendo da fonte de carbono utilizada conforme consta neste trabalho. Em geral, as espécies de algas produtoras de hidrogênio são *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella fusca*, *Chlorella sp.* e *C. Moewusii* (MIURA *et al.*, 1982). A alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* se destaca como produtora de hidrogênio e etanol (DAS e VEZIROGLU, 2011). Dada a sua facilidade de manutenção em laboratório, a *Chlamydomonas reinhardtii* é utilizada como modelo experimental em áreas como a genética, a biologia celular, molecular e a fisiologia. Quando em condições ambientais favoráveis, esta alga se reproduz assexuadamente em um curto período de tempo, cerca de 24 horas.

O etanol é outro combustível renovável considerado uma excelente alternativa de queima limpa. Convencionalmente, a produção de etanol deriva de fontes de glicose e amido de plantas superiores como a cana-de-açúcar. Levando em consideração a demanda pelo produto e a crescente substituição de plantações de grãos por cana-de-açúcar, tem crescido a investigação da produção de etanol a partir de biomassa de algas (CHOI *et al.*, 2010). A *Chlamydomonas reinhardtii* possui estrutura e funcionalidade semelhantes aos organismos vegetais superiores geradores de etanol e podem armazenar grandes quantidades de polissacarídeos, principalmente o amido intracelular (LIBESSART *et al.*, 1995).

Ao manter a *Chlamydomonas reinhardtii* em fermentação anaeróbica e em meio com ausência de enxofre pode-se observar que no período de luz há uma atenuação da produção de O_2 fotossintético. E no período de escuro ocorre a degradação das reservas de amido, formando como principais produtos o ácido fórmico, ácido acético e etanol, sendo o H_2 e CO_2 gases emitidos como produtos secundários (OHTA *et al.*, 1987). Os produtos resultantes da fermentação são controlados pelo nível de concentração do piruvato, assim como as condições de fermentação e a utilização de diferentes espécies de algas. Estudos de PHILIPPS *et al.* (2011) e CHEN e MELIS (2013) mostraram que a alga *Chlamydomonas reinhardtii* possui inúmeros genes correspondentes às rotas metabólicas diferentes. Assim, o entendimento aprofundado de

seu metabolismo pode propiciar a otimização do processo de síntese de biocombustíveis como hidrogênio e etanol.

Uma das formas de se obter o etanol é pré-tratar a biomassa antes da fermentação. Este procedimento corresponde a hidrólise enzimática fazendo com que os grânulos de amido que estão ligados intracelularmente dentro de paredes celulares rígidas sejam liberados. Juntamente com outros polissacarídeos como hidratos de carbono estruturais, melhorando assim a aptidão para a produção de etanol (CHOI *et al.*, 2010).

Além disso, o conhecimento de parâmetros operacionais é necessário como forma de potencializar a produção de biocombustíveis pelas algas. A idade do inóculo, concentração celular de inóculo, tempo de fermentação, luminosidade, pH e temperatura, influenciam diretamente no crescimento e desenvolvimento deste indivíduos e conseqüentemente na produção dos biocombustíveis (DAS e VEZIROGLU, 2001; HALLEMBECK e GHOSH, 2009; YANG *et al.*, 2014).

O enxofre presente no meio de cultivo é outra variável a ser investigada, já que sob sua supressão parcial ou total, a produção de hidrogênio pode ser potencializada (DAS e VEZIROGLU, 2001; KOSOUROV *et al.*, 2007; CHOCHOIS, *et al.*, 2009). Outra maneira de aumentar a produção de hidrogênio é fazer uso de fontes de carbono heterotróficas como o acetato de sódio (KOSOUROV *et al.*, 2007), citrato de sódio e permeado de soro de leite que foram utilizados neste trabalho.

De forma complementar, o uso de algas em sistemas híbridos e co-cultura com micro-organismos diversos pode ser considerado uma forma de ampliar a produção de biocombustível. Segundo LI *et al.* (2013), no sistema híbrido, utiliza-se o resíduo da fermentação da alga (*Chlamydomonas reinhardtii*) para viabilizar a fotofermentação da bactéria fotossintética (*Rhodobacter capsulatus*), visto que o meio metabolizado pelas algas é rico em ácidos orgânicos que serão empregados pela bactéria fotossintética como fonte de carbono. Já a co-cultura combina o uso de dois ou mais micro-organismos em uma mesma fermentação, de maneira a um complementar as deficiências do outro. E com isso produzir maiores quantidades dos produtos-alvo (WU *et al.*, 2012).

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo estudar a avaliação da produção de biocombustíveis (H₂ e etanol) por meio de rota biológica através do uso de algas verdes, mais especificamente a alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Dentre os objetivos específicos destacam-se a análise das variáveis a seguir para a otimização da síntese de H₂ e também de etanol.

- ✓ Idade do inóculo e da concentração celular do inóculo;
- ✓ Tempo de fermentação;
- ✓ Teor de enxofre no meio de cultivo;
- ✓ Temperatura;
- ✓ Fontes de carbono (acetato, citrato, permeado de soro de leite) heterotróficas;
- ✓ Sistema híbrido contemplando os micro-organismos *Chlamydomonas reinhardtii* e *Rhodobacter capsulatus*; e
- ✓ Co-cultura de *Chlamydomonas reinhardtii* e *Rhodobacter capsulatus* na produção de hidrogênio e etanol.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fontes de energia renovável

Inúmeras são as fontes de energia presentes na sociedade atual, sendo classificadas como primárias e secundárias. As fontes primárias (petróleo, gás natural, energia hidráulica, solar, eólica entre outras) são aquelas captadas da própria natureza. Enquanto que as secundárias são obtidas através de processos de transformação das fontes primárias (recursos naturais) como os combustíveis etanol, gasolina, hidrogênio e diesel. O petróleo é um exemplo de um recurso primário que sofre transformação para fornecer combustíveis e subprodutos. É uma fonte não renovável de energia, suas reservas são finitas e sua utilização é inversamente proporcional à sua reposição pela natureza (DAS e VEZIROGLU, 2001).

Os dados apresentados na Tabela 3.1 fornecidos pela Empresa de Pesquisa Energética (EPE, 2013) demonstram um crescimento no consumo do petróleo, gás natural e outras fontes renováveis. Observa-se que de 2008 a 2012 houve um aumento no consumo de energia proveniente de fontes não renováveis de 2,4%, enquanto que os recursos renováveis apresentaram uma redução na mesma proporção.

Tabela 3.1- Produção de energia primária no Brasil em % no período de 2008/2012.

Fonte Primária	2008	2009	2010	2011	2012
Não renovável	51,6	53,3	52,6	54,3	54,0
Petróleo	39,7	42,0	42,1	42,5	41,6
Gás Natural	9,0	8,7	9,0	9,3	9,9
Carvão Metalúrgico	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
Urânio (U ₃ O ₈)	1,7	1,7	0,7	1,6	1,5
Renováveis	48,4	46,7	47,4	45,7	46,0
Energia Hidráulica	13,4	14	13,7	14,4	13,9
Lenha	12,4	10,2	10,3	10,1	10,0
Produtos da Cana-de-açúcar	19,0	18,6	19,3	16,9	17,5
Outras Renováveis	3,6	3,9	4,1	4,4	4,6
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Fonte: EPE (2013)

A queima de certos combustíveis produz potencialmente componentes como CO_x , NO_x , SO_x , C_xH_x , além de compostos orgânicos que podem comprometer significativamente o ar, resultando na poluição atmosférica (BARBOSA *et al.*, 2001). Assim, o desenvolvimento de estratégias que propiciem a obtenção de combustíveis em que a queima não resulte em compostos tóxicos tornou-se imprescindível. Nesta categoria se incluem o biogás (representado pelo metano e hidrogênio), além do bio-etanol e biodiesel. O hidrogênio tem se destacado nos últimos anos em virtude de seu alto poder calorífico (122kJ/g) quando comparado a outros combustíveis (AMROUCHE *et al.*, 2011).

3.2 Hidrogênio

O hidrogênio, segundo a Tabela de Mendeleiev (1869), é classificado como o elemento mais leve e abundante na natureza, sendo conhecido a milhares de anos. Henry Cavendish (1784) produziu hidrogênio através de ácidos (clorídrico ou sulfúrico) em contato com metais (zinco e ferro). Mais tarde, Antoine Lavoisier (1783) nomeou o gás de Hidrogênio (SANTOS, 2005). O hidrogênio é empregado como fonte primária para a obtenção de outros produtos comerciais como amônia, além de artigos alimentícios hidrogenados (margarina, gorduras, etc.) e outros combustíveis como a gasolina, ou ainda lubrificantes e ácidos. Pode ser usado também como gás em maçaricos de solda e como combustível para foguete (SANTOS, 2005). O hidrogênio, quando submetido a temperaturas de 20,3 Kelvin, muda de estado (gás para líquido) sendo utilizado em células de energia.

3.3 Produção de hidrogênio: o uso de rotas biológicas

Além de rotas químicas (reforma a vapor), a produção de hidrogênio se dá através do uso de micro-organismos (algas, bactérias e cianobactérias), sendo identificada através da sua rota metabólica como a biofotólise da água, da qual se utilizam as algas e cianobactérias. Há também a fermentação no escuro de bactérias acetogênicas, o uso de bactérias fotossintezantes a partir do consumo de ácidos orgânicos, bem como a utilização de sistema híbrido que combina mais de uma rota metabólica. É possível ainda a produção de H_2 por co-cultura na qual se estabelece o cultivo simultâneo de dois ou mais micro-organismos (AMROUCHE *et al.*, 2011; PHILIPPS *et al.*, 2011 e CHEN e MELIS, 2013).

Biofotólise

A biofotólise da água é um processo biológico que consiste em converter energia solar em energia química armazenada a ser utilizada pela célula. Este processo ocorre quando o sistema biológico sofre intervenção da luz, causando a decomposição de um substrato (H_2O) em hidrogênio conforme a reação apresentada pela Equação (3.1). A biofotólise pode ocorrer de forma direta ou indireta.



Biofotólise direta

A biofotólise direta é um processo em que as microalgas capturam a luz e a energia recuperada é usada para unir duas moléculas de água gerando um redutor de baixo potencial. Este redutor é aplicado na enzima [FeFe]-hidrogenase que produz hidrogênio, ilustrado pela Figura 3.1, seguindo a Equação (3.1) da reação geral. O interior da alga é constituído de dois fotossistemas, fotossistema I (FSI) e fotossistema II (FSII), ambos captam energia luminosa e transformam em energia química para ser utilizado pela célula nas reações. Estes fotossistemas captam a energia luminosa em faixas diferentes, o fotossistema II utiliza uma faixa até 680 nm, enquanto que o fotossistema I utiliza intensidades de luz acima de 700 nm (GOODE e TREBST, 1980). Assim, as algas utilizam a energia luminosa para gerar elétrons que são transferidos para uma molécula de ferredoxina, tomando a sua forma reduzida. Posteriormente, a enzima [FeFe]-hidrogenase combina os prótons (H^+) do meio com elétrons, doados pela ferredoxina reduzida, para formar e liberar hidrogênio conforme Figura 3.1

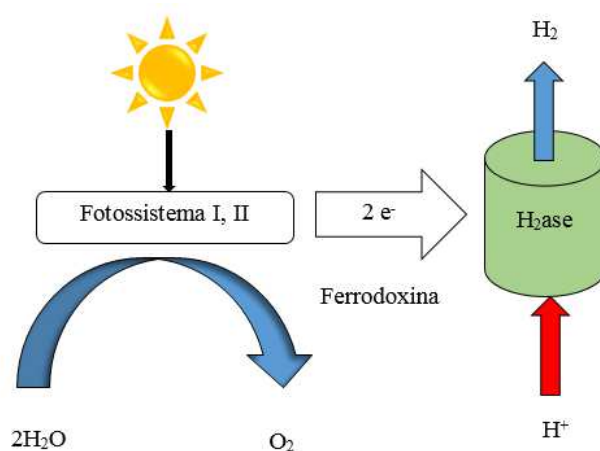


Figura 3.1 - Modelo esquemático de produção de hidrogênio via biofotólise direta. H₂ase representa a enzima [FeFe]-hidrogenase.

Fonte: Adaptado de (HALLENBECK e BENEMANN, 2002)

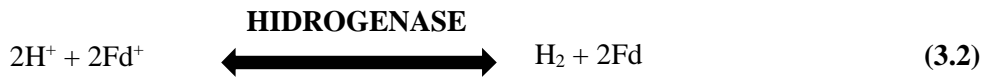
Conforme visto por HALLENBECK e BENEMANN (2002), a etapa escura é a limitante do processo, pois é nela que ocorre a geração efetiva do hidrogênio já que na etapa escura não há produção de O₂. Além do mais, a eficiência na conversão da luz solar pode ser baixa, cerca de apenas 10%, dependendo das condições operacionais do reator. A atividade enzimática da [FeFe]-hidrogenase, principal enzima relacionada à produção de hidrogênio em algas, é extremamente sensível a presença de oxigênio. O oxigênio atua como supressor da expressão do gene da [FeFe]-hidrogenase (*hydA*) (MELIS e HAPPE, 2001).

Um mecanismo para evitar que a produção de hidrogênio seja afetada pela produção de oxigênio do sistema é o de estabelecer a supressão do enxofre, por um determinado período de tempo. Reduzindo deste modo a atividade do FSII, enquanto que as taxas de respiração se mantem constantes. Deste modo, o oxigênio produzido é menor que o consumido, de maneira a não influenciar na produção do hidrogênio (MCKINLAY e HARWOOD, 2010).

As investigações de WYKOFF *et al.* (1998) mostraram que a inibição parcial do FSII pode ocasionar uma condição anaeróbica para a célula em um biorreator. Isto se deve ao fato de haver menos atividade de oxidação da água para desenvolver o oxigênio e que parte deste oxigênio está simultaneamente sendo usado para a respiração. A equipe de pesquisa de MELIS *et al.* (2000 e 2002) verificou que a privação de enxofre inibe a atividade FSII levando à condições anaeróbicas dentro de um biorreator. Os autores como GHIRARDI *et al.* (2000); HAPPE e KAMINSKI (2002), FORESTIER *et al.* (2003) e DASGUPTA *et al.* (2010) obtiveram resultados semelhantes. Estudos de CHOCHOIS *et al.* (2009) demonstraram que a ausência completa de enxofre prejudica o desempenho e crescimento da alga, afetando diretamente a produção de hidrogênio, devido ao estresse causado pela supressão de enxofre. Para que ocorra equilíbrio entre a produção de oxigênio e seu consumo, o desenvolvimento celular e a produção de hidrogênio, é necessário que um residual de enxofre seja mantido no meio (MELIS *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 2014).

Hidrogenase

A hidrogenase é uma enzima que faz com que as algas verdes sejam capazes de produzir hidrogênio a partir da água. Esta enzima [FeFe]-hidrogenase é criptografada pelo gene *hydA*, sintetizada na região intracelular (citossol) e introduzida pelo estroma do cloroplasto. Esta reação pode ser reversível como mostra a Equação (3.2).



Nas algas verdes, a hidrogenase do estroma do cloroplasto permite que os elétrons da ferredoxina (Fd) reduzida sejam transferidos para os íons de H^+ produzindo o hidrogênio (MELIS e HAPPE, 2001). Experimentos de GOODE e TREBST (1980) sugerem que os elétrons derivados sobre oxidação do substrato endógeno podem alimentar a plastoquinona e através da absorção de luz pelo FSI serem conduzidos à ferredoxina (Fd). A ferredoxina por sua vez é o doador de elétrons que irá garantir a eficiência da [FeFe]-hidrogenase, combinando eficientemente os elétrons com os prótons para gerar a molécula de H_2 .

Os elétrons são gerados através da oxidação fotoquímica da água pelo FSII, o que resulta na produção simultânea de O_2 e H_2 , ou ainda pela oxidação de um substrato endógeno. As algas verdes, mais especificamente a *Chlamydomonas reinhardtii*, ilustrada na Figura 3.2 (a) podem produzir hidrogênio utilizando o foto período (STUART e GAFFRON, 1972). A Figura 3.2 (b) apresenta o interior de uma célula de alga, que é composto por dois fotossistemas, o FSII e o FSI. Em ambos FS a energia luminosa é absorvida por meio dos pigmentos fotossintéticos sendo transformadas em energia química para serem utilizadas pela célula.

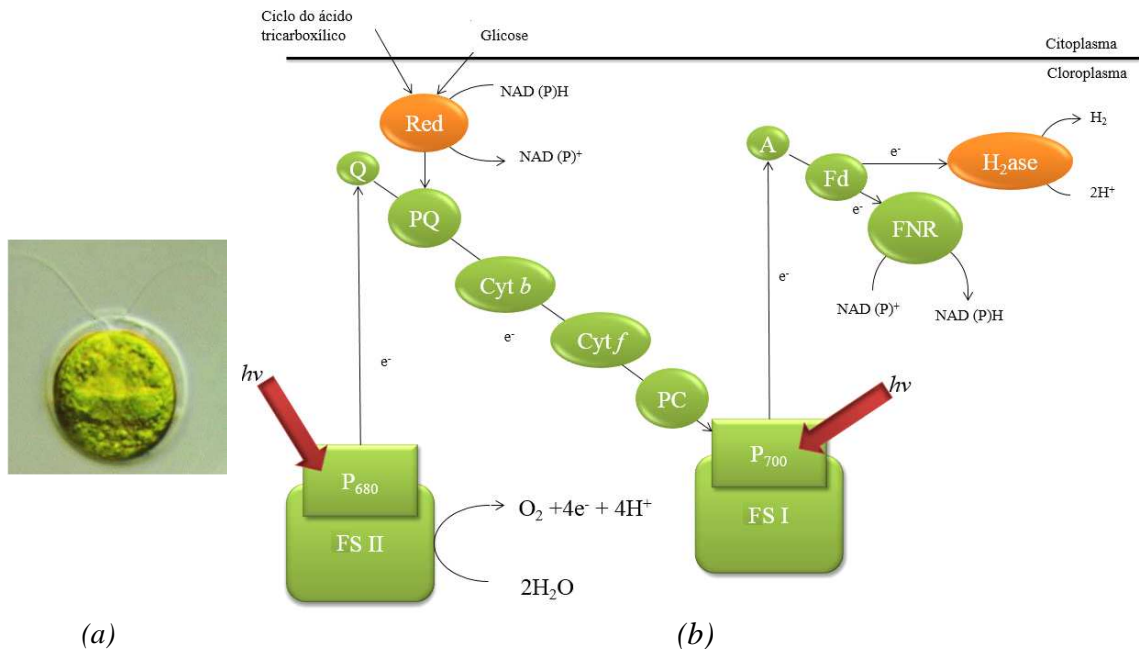


Figura 3.2 - (a) Alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* (KOTYK, 2008); (b) Vias de transporte de elétrons relacionadas à hidrogenase em algas.
Fonte: Adaptado de (MELIS e HAPPE, 2001)

O FSII utiliza essa energia para fazer a quebra de duas moléculas de H_2O em O_2 , $4e^-$ e $4H^+$, da mesma forma, essa energia promove o transporte dos elétrons resultantes dessa quebra para a quinona (Q), onde é canalizada para o plastoquinona (PQ). Dentro da plastoquinona, mais especificamente na NAD(P)H-oxidoreductase (RED), ocorre uma redução dos substratos NAD(P)H (nucleotídeos da nicotinamida) em $NAD(P)^+$ liberando uma molécula de H^+ para o cloroplasto da célula. Enquanto isso, o elétron recebido é transportado através do NAD(P)⁺ e pelos demais aceptores citocromo do complexo *b* (Cyt *b*), citocromo do complexo *f* (Cyt *f*), plastocianina (PC) até o FSI. A energia acumulada no FSI é usada para transferir o elétron para atimicina (A) que é o primeiro aceptor de elétrons do FSI enviando o mesmo para ferredoxina (Fd) que, por sua vez, distribui os elétrons para ferredoxina-NAD(P)⁺-oxidoreductase (FNR) e para enzima da hidrogenase (H_2 ase) que metaboliza $2 H^+$ em H_2 que é liberado para o meio.

Biofotólise indireta

A biofotólise indireta empenha-se em solucionar o problema da sensibilidade ao oxigênio, separando a evolução do oxigênio e do hidrogênio em dois estágios, através da fixação de CO_2 como apresentado na Figura 3.3.

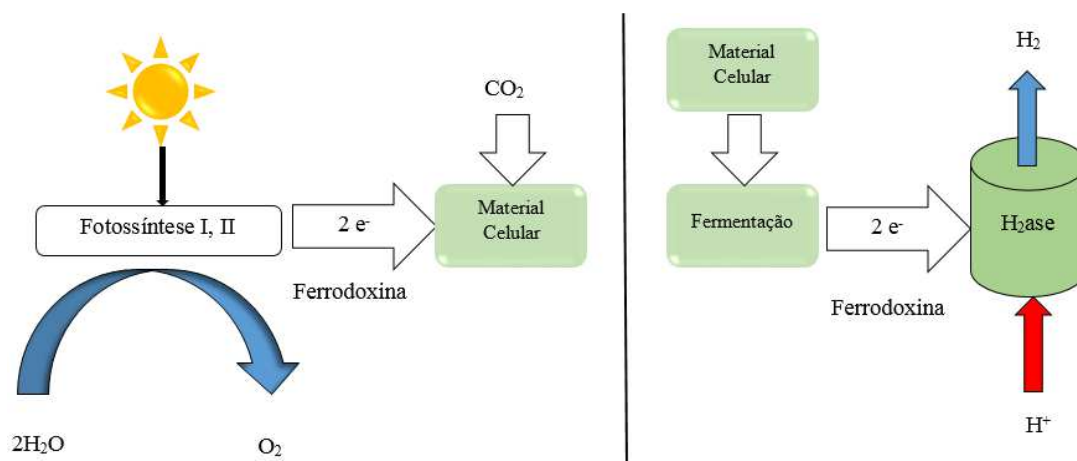


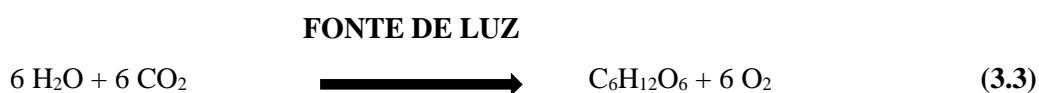
Figura 3.3- Modelo esquemático de produção de hidrogênio via biofotólise indireta.

Fonte: Adaptado de (HALLENBECK; BENEMANN, 2002)

A biofotólise indireta pode ser obtida através do processo proposto por HALLENBECK e BENEMANN (2002) que consistem em quatro passos distintos para uma melhor compreensão da biofotólise indireta: (1) A produção de alta concentração de biomassa e armazenamento de carboidratos em tanques a 10% de eficiência solar; (2) A concentração da biomassa em um tanque de decantação; (3) A fermentação escura anaeróbica para produzir 4 mol de H_2 /mol de glicose armazenada nas células das algas, mais 2 mols de acetato e (4) O uso

de um fotobiorreator no qual as células das algas converteriam os dois moles de acetato para 8 moles de H₂.

Assim o processo de biofotólise indireta engloba a separação do oxigênio e do hidrogênio em diferentes fases, conectados através da fixação/evolução de CO₂. Destaca-se que as cianobactérias são mais afins ao CO₂, como fontes de carbono do que como fonte de energia e também utilizam a luz solar (Equação 3.3). Inicialmente as células utilizam o carbono para produzir substâncias que serão utilizadas na produção do H₂ (Equação 3.4). O mecanismo global para a geração do hidrogênio através de cianobactérias está representado nas seguintes reações (DASGUPTA *et al.*, 2010):



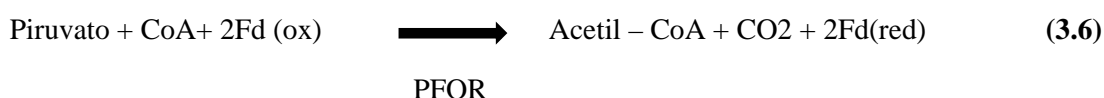
Fermentação no escuro

Bactérias anaeróbicas, cultivadas na ausência de luz podem produzir hidrogênio em meio de cultivo rico em substrato carbônico. Os micro-organismos que produzem hidrogênio são geralmente de metabolismo anaeróbico do piruvato, o qual é formado a partir do catabolismo de diferentes substratos. A distribuição do piruvato é catalisada por duas enzimas específicas, a formato liase (PFL) e a ferredoxina óxido redutase (PFOR), conforme as Equações (3.5) e (3.6) respectivamente (HALLENBECK e BENEMANN, 2002):

1. Piruvato: Formato liase (PFL)



2. Piruvato: Ferredoxina óxido redutase (PFOR)



Bactérias fotossintetizantes

As bactérias fotossintetizantes podem ser divididas em duas famílias, as verdes e as púrpuras. Podendo ambas serem classificadas em bactérias sulfurosas e não sulfurosas. As bactérias verdes, diferentes das algas que possuem FSI e FSII, possuem somente o FSI e utilizam substratos orgânicos e inorgânicos, ao invés da água para doar elétrons e ocasionar a redução da ferredoxina (Fd) para a reação que gera o hidrogênio. Como pode ser visto na Figura 3.4, utilizando o foto período luz, e no foto período escuro ocorre a fixação do CO₂.

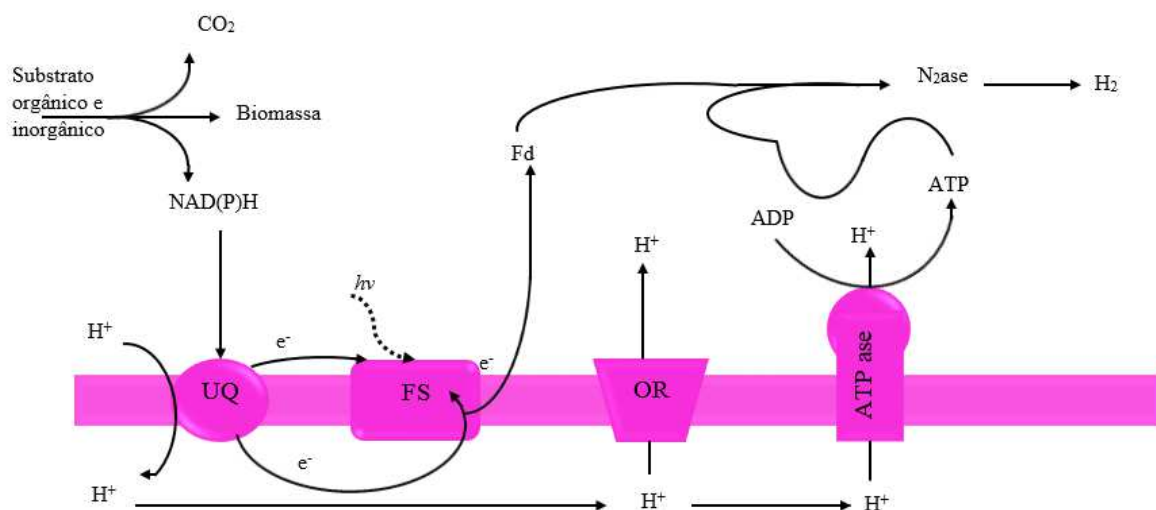
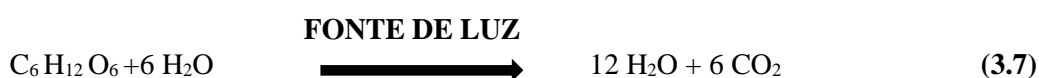


Figura 3.4 - Vias de transportes de elétrons relacionados a produção de hidrogênio através da nitrogenase.

Fonte: Adaptado de (MCKINLAY e HARWOOD, 2010)

As bactérias púrpuras possuem somente o FSII onde a ferredoxina (Fd) é reduzida através da enzima ATP-ase, caracterizando uma reação por nitrogenase. As bactérias fotossintetizantes desenvolvem o hidrogênio molecular catalisado pela nitrogenase, sob condições deficientes de N₂, utilizando como fonte de energia a luz, e compostos orgânicos (LEVIN *et al.*, 2004). Estes micro-organismos não possuem energia suficiente para efetuar a quebra da molécula de água. Porém quando submetidos a condições anaeróbicas utilizam os ácidos orgânicos (ex.: ácido acético) como fonte de elétrons, os quais são transportados para a nitrogenase. Este transporte se dá através de gasto energético (ATP).

Assim quando não há presença de nitrogênio, esta enzima reduz os prótons em gás hidrogênio com a energia extra gerada pelo ATP (AKKERMAN *et al.*, 2002; HALLENBECK e BENEMANN, 2002; DASGUPTA *et al.*, 2010). A reação global da produção de hidrogênio a partir da glicose pela fotofermentação é dada pela Equação (3.7).



O Quadro 3.1 apresenta uma comparação entre os principais processos biológicos de produção de hidrogênio.

Quadro 3.1 - Comparação entre os principais processos biológicos da produção de hidrogênio.

Processo	Tipo de Organismo	Vantagens	Desvantagens
Biofotólise direta	Algas verdes	Capaz de produzir H ₂ diariamente a partir da água e da luz solar; Maior conversão da energia a partir da água em relação as culturas de grande porte.	Requer alta intensidade de luz; O ₂ pode inibir a produção de H ₂ .
Biofotólise indireta	Cianobactérias	Pode produzir H ₂ a partir da água; Tem a capacidade de fixar N ₂ da atmosfera.	Baixa eficiência fotoquímica; O ₂ tem efeito inibitório sobre a nitrogenase.
Fotofermentação	Bactérias fotossintetizantes	Um amplo espectro de luz (energia) pode ser usado para estas bactérias; Pode utilizar diferentes substratos, como efluentes de destilaria, resíduos, etc.	Eficiência de conversão é muito baixa, apenas 1-5%; O ₂ é um inibidor da nitrogenase.
Fermentação (sem Luz)	Bactéria fermentativa	Pode produzir H ₂ durante todo o dia sem luz, Uma variedade de fontes de carbono pode ser utilizadas como substratos; Produz metabólicos com valor agregado, tais como os ácidos butírico, láctico e acético.	Produto contém mistura de gás CO ₂ , que tem que ser separado.

Fonte: Adaptado de (AMORIN, 2009)

Sistema híbrido e co-cultura

Na tentativa de aumentar a produtividade de hidrogênio em algas, é possível utilizar o sistemas híbridos e de co-cultura de algas e bactérias.

Estudos de BATISTA *et al.* (2014) demonstraram a possibilidade de utilizar resíduos produzidos por algas (ricos em ácidos orgânicos) como fonte de alimento para bactérias (*Enterobacter aerogenes* e *Clostridium butulinum*) para a produção de hidrogênio molecular. Além disso, possibilitou o reaproveitamento de resíduos orgânicos gerados pelas algas.

Pesquisas de MIURA (1995) verificaram que a produção contínua de hidrogênio com maior rendimento pode ser obtida com a combinação de sistemas de produção. O autor propôs a produção de hidrogênio através do uso de algas como a *Chlamydomonas* MGA 161 e da produção fotossintética pela bactéria *Rhodospseudomonas palustris* W-1S, em ciclos alternados. A Figura 3.5 ilustra um esquema experimental baseado em um sistema híbrido de algas e bactérias, em que o caldo resultante do processo com algas é utilizado como substrato pela *Rhodospseudomonas palustris*.

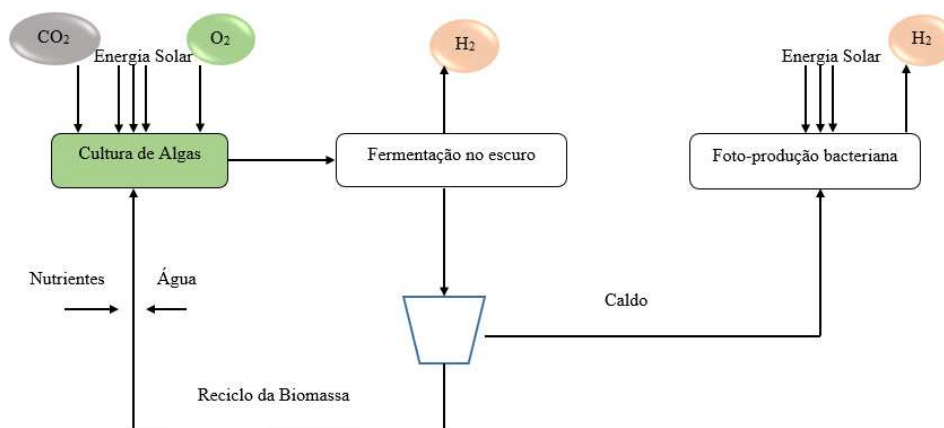


Figura 3.5- Esquema experimental da biofotólise baseado na fotossíntese por algas verdes.
Fonte: Adaptado de (MIURA, 1995).

Assim como sistema híbrido é uma alternativa para a produção de hidrogênio, a co-cultura entre algas e bactérias fotossintetizantes é uma outra possibilidade de geração de hidrogênio. A produção de hidrogênio em bactérias fotossintéticas é dada principalmente pelo sistema de nitrogenase que requer entrada de alta energia na forma de ATP (TAYGANKOV *et al.*, 1999). Enquanto que a produção de hidrogênio em algas verdes é mediada principalmente pelo sistema [FeFe]-hidrogenase na ausência de ATP e aceita a entrada de elétrons da ferredoxina (Fd) (KOSOUROV e SEIBERT, 2008). No entanto, a [FeFe]-hidrogenase e a nitrogenase são altamente sensíveis ao oxigênio que é o principal produto da fotossíntese da alga (MELIS *et al.*, 2000; KOSOUROV *et al.*, 2003).

KAWAGUCHI *et al.*, (2001) utilizou a co-cultura de algas (*Chlamydomonas reinhardtii*) e bactérias (*Rhodobium marinum* juntamente com a *Amylovours lactobacillus*) e observou o metabolismo do amido produzido pelas algas em lactato, que é o doador de eletrons para produção de hidrogênio pelas bactérias. A Figura 3.6 demonstra um sistema baseado na co-cultura citada. A fermentação ocorre utilizando o meio basal da alga, onde são adicionados ambos microorganismos (alga e bactéria).

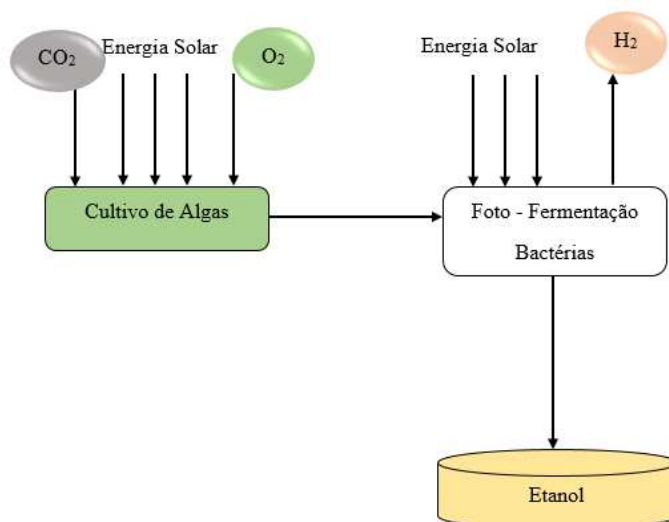


Figura 3.6 - Esquema experimental da co-cultura entre algas verdes e bactérias.

WU *et al.*, 2012 utilizou cepas de *Bradyrhizobium japonicum* com *Chlamydomonas reinhardtii* estirpe cc-849 em meio TAP isento de enxofre. Obtiveram um resultado 14 vezes maior para a produção de H₂ e uma taxa de crescimento de 26% maior que quando utilizadas *B. japonicum* e a *Chlamydomonas reinhardtii* estirpe LBA e outras estirpes de algas cultivadas isoladamente sob as mesmas condições. Um dos fatores que influíram para esta melhoria foi o aumento nas taxas de respiração ou consumo de O₂.

3.4 Etanol

O etanol não é um produto encontrado diretamente na natureza havendo a necessidade de processos complexos para sua obtenção. O processo mais comum e mais difundido é a fermentação de açúcares obtidos de plantas superiores. A Figura 3.7 demonstra como ocorre a produção de etanol na indústria sucroalcooleira que acontece juntamente com outros produtos sendo os principais o açúcar, o etanol e a eletricidade.

A demanda por este produto tem aumentado nos últimos anos e a procura por novas tecnologias que proporcionem a produção de bio-etanol estão em evidência. Dentre tantos processos de obtenção deste produto, a alga tem seu destaque.

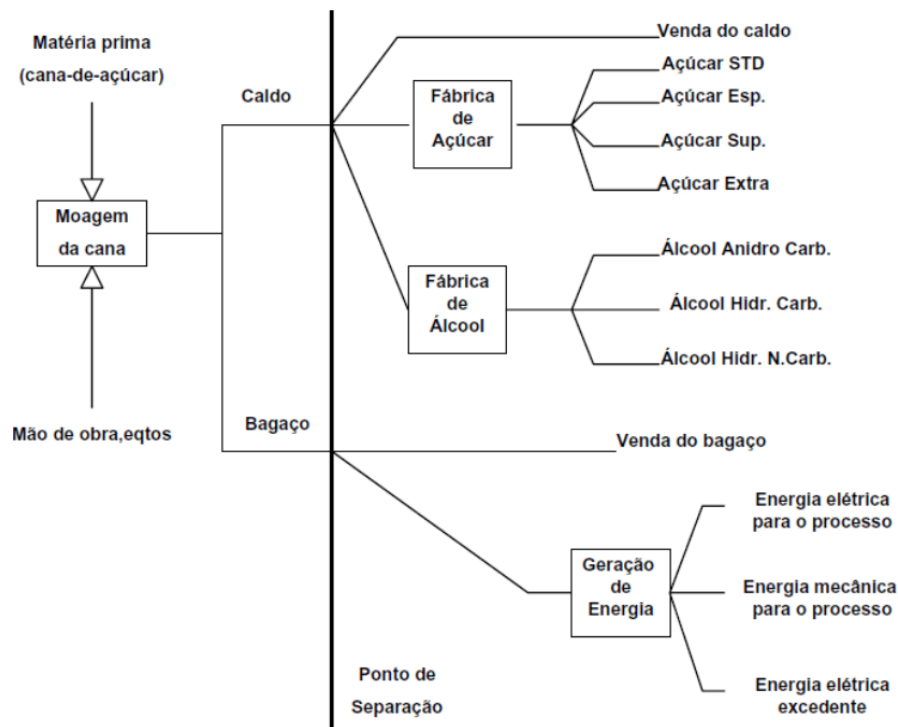


Figura 3.7 - Caracterização do processo de produção da fase industrial de uma usina com processo conjunto para obtenção de açúcar, etanol e eletricidade.
Fonte: Adaptado de (BRUNSTEIN e TOMIYA, 1995)

3.5 Produção de Etanol com algas verdes.

A alga *Chlamydomonas reinhardtii* tem sido muito utilizada para estudar a fotossíntese aeróbica, bem como a estrutura e função de organelas celulares. MERCHANT *et al.* (2006 e 2007) verificaram, através da análise da sequência do genoma da célula, que uma homologia entre plantas e animais se verificava. Tal característica pode explicar a possibilidade de síntese de produtos de fermentação tão variados, como o ácido acético, ácido fórmico, etanol, CO₂, H₂, vestígios de glicerol, D-lactato, malato e succinato. Outros estudos demonstram também a similaridade das algas com as bactérias fotossintetizantes que sob condições anaeróbicas também utilizam vias enzimáticas para a produção de ácido fórmico, etanol e H₂ (KOSOUROV *et al.*, 2003; PHILIPPS *et al.*, 2011). Outra característica da *Chlamydomonas reinhardtii* é que a estequiometria de reação dos produtos finais gerados varia de acordo com as condições de cultivo e a fermentação a qual a alga é exposta. Além disso, a *Chlamydomonas reinhardtii*

possui a capacidade de mudança de rota metabólica do piruvato formato-liase, se por algum motivo esta for prejudicada (PHILIPPS *et al.*, 2011).

Resultados de PHILIPPS *et al.* (2011) para a produção de etanol por *Chlamydomonas reinhardtii* cc-124 em meio TAP com supressão de enxofre, pH de 7,2, sendo fermentado em condições anaeróbicas foi de 7,3 a 9,6 nmol/ μ g de alga (0,336 μ g/ μ g de alga) após 4 h de fermentação, foram o mapeamento de vias fermentativas. A Figura 3.8 mostra o diagrama esquemático destas vias fermentativas, onde o piruvato, deriva da oxidação de glicose, serve como substrato para as sínteses de produtos variados, catalisados por diversas enzimas. A piruvato formato-liase (PFL1) cliva o piruvato em acetil-CoA e formiato. A acetil-CoA é convertida em ácido acético pela ação sucessiva da fosfoacetiltransferase (PTA) e da quinase de etilo (ACK), resultando na produção de ATP. Pode ocorrer também a produção de etanol por uma desidrogenase bifuncional aldeído/álcool (ADH1), resultando na oxidação de NAD(P)H. A piruvato-descarboxilase (PDC) descarboxila o piruvato originando acetaldeído, que é ainda reduzido em etanol pela álcool-desidrogenase (ADH).

Uma outra via leva à produção de d-lactato pela ação da d-lactato desidrogenase (D-LDH). Nela, a piruvato ferredoxina oxido-redutase (PFR1) descarboxila o piruvato, resultando na redução da ferredoxina (Fd), CO₂ e acetil-CoA. Esta última pode, provavelmente, ser metabolizada por PTA e ACK ou ADH1 (indicado por uma linha pontilhada). Reduzida, a Fd poderia então funcionar como um doador de elétrons para a hidrogenase (H₂ase), resultando na evolução de hidrogênio no escuro. Vias resultando na produção de malato, succinato e glicerol têm sido referidas na literatura como sendo potenciais para a formação dos produtos de fermentação da *Chlamydomonas reinhardtii* (PHILIPPS *et al.*, 2011).

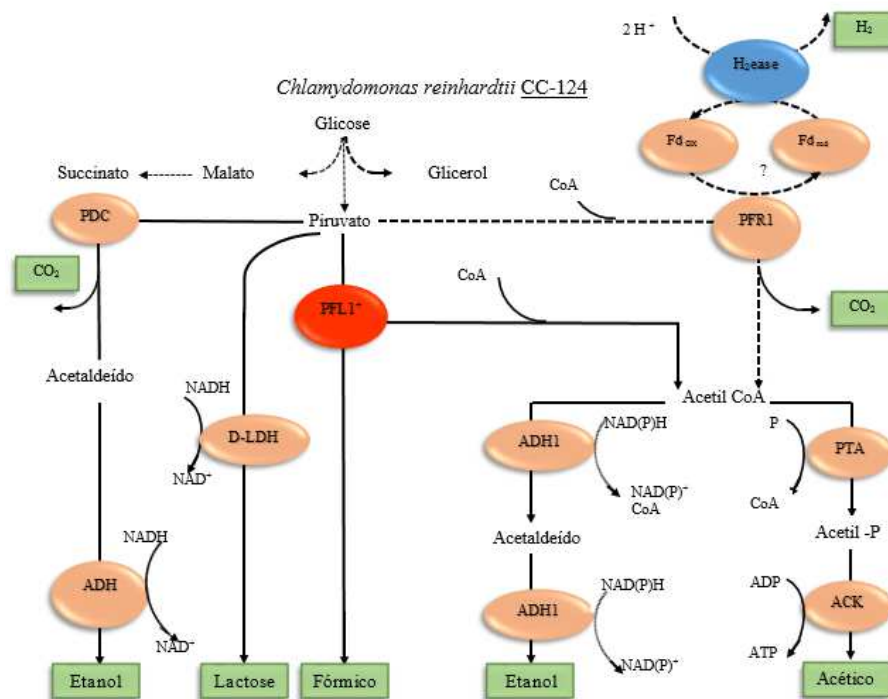


Figura 3.8-Diagrama das vias fermentativas da alga *Chlamydomonas reinhardtii*.
Fonte: Adaptado de PHILIPPS et al. (2011).

3.6 Parâmetros que influenciam na produção de biocombustíveis

A proliferação de microalgas requer luz solar, dióxido de carbono, temperatura entre 30 e 40° C e retirada do excesso de oxigênio gerado (através da purga de gás inerte como argônio). Muitas vezes o aproveitamento das algas exige a concentração e retirada das células, assim, sistemas compactos capazes de gerarem maiores concentrações celulares são importantes para a viabilidade econômica do processo. Lagoas com alta taxa de crescimento de algas (*High Rate Algal Ponds*, HRAP), fotobiorreatores, biofiltros e mesmo sistemas alternativos como soluções advindas do estudo da geoengenharia, construções geodésicas contendo algas e uso de frações do oceano como fazendas aquáticas delimitadas com barreiras para adição de nutrientes e monitoração da síntese de produtos de interesse, podem ser consideradas alternativas na produção de biomassa.

Em processos nos quais o hidrogênio é produto-alvo, o uso de fotobiorreatores controlados mostram-se adequado. Segundo JACOB-LOPES (2007), os fotobiorreatores podem ser definidos como sistemas utilizados para o desenvolvimento de reações fotossintéticas e classificados de acordo com o modo de alimentação da mistura reagente (descontínuo ou contínuo), tipo de escoamento (mistura completa ou pistonado), tipo de cultivo empregado (células livres ou imobilizadas) e através da configuração (reatores abertos ou

fechados). Embora o termo fotobiorreator tenha sido originalmente aplicado para canais abertos e lagoas de algas, esta denominação é melhor empregada para os dispositivos que permitam uma cultura asséptica que esteja totalmente isolada de um potencial ambiente contaminado (MOLINA GRIMA *et al.*, 1999).

Segundo a literatura consultada, as configurações mais empregadas em fotobiorreatores para a produção de H₂ são os reatores tubulares (coluna de bolhas e *air-lift*), reatores do tipo *flatplate* e sistemas tubulares arranjados em espiral (MOLINA GRIMA *et al.*, 1999). Os reatores tubulares são preferidos, por permitirem o cultivo de microrganismos em elevadas concentrações de nutrientes, favorecendo a taxa de crescimento (TCHOBANOGLIOUS *et al.*, 2003). Nesta disposição, o equipamento é constituído de material transparente, geralmente vidro ou plástico, de diâmetro inferior a 0,10 m para permitir que a luz penetre em toda extensão do líquido, que circula no interior dos tubos em regime turbulento para evitar o depósito de células na extensão dos mesmos. Independente da configuração dos reatores empregados, outro fator importante a ser considerado é a limpeza do gás obtido. Em geral, o maior contaminante é o oxigênio.

Além disso, verifica-se o problema da presença de umidade na mistura gasosa. Isto deve ser minimizado, caso contrário, o poder calorífico do biocombustível produzido poderá ser reduzido. Este objetivo poderá ser alcançado através da passagem da mistura por um secador ou uma unidade de refrigeração (condensação do vapor na forma de água) (TCHOBANOGLIOUS *et al.*, 2003).

Outros parâmetros que incluem pH, temperatura, tipo de reator, tempo de retenção hidráulica (TDH)¹, tipo de fonte de carbono, bem como disponibilidade de nutrientes (KOTHARI *et al.*, 2012). Outro aspecto a ser avaliado é a presença de enxofre na fermentação. DAS e VEZIROGLU (2001) verificaram que as células de alga produzem hidrogênio na ausência de enxofre. Estudos de CHOCHOIS *et al.* (2009) e YANG *et al.* (2014) demonstraram que um dos maiores desafios para a produção de hidrogênio por rota biológica é a alta sensibilidade da hidrogenase ao oxigênio. Por outro lado, existe a necessidade da observação do crescimento da biomassa para que a evolução do hidrogênio ocorra. Sabe-se também que mesmo sem manter nenhum tipo de condição especial, estas células na presença de luz, em condições anaeróbicas produzem oxigênio, inibindo eventualmente a hidrogenase (LEHR *et al.*, 2012). Para solucionar este problema, a atividade no FSII pode ser reduzida, de modo a

¹ TDH representa a o tempo médio de permanência das moléculas de água em uma unidade de tratamento, alimentada continuamente (KOTHARI *et al.*, 2012).

equilibrar o aumento do oxigênio com o consumo respiratório das células. Isto pode ser verificado quando limita-se a concentração de enxofre do meio de cultivo (MELIS *et al.*, 2000) conforme já justificado (item 3.3 - Biofotólise).

MUS *et al.* (2007) estudaram a produção de hidrogênio e etanol pela alga *Chlamydomonas reinhardtii* cultivada em meio TAP, pH de 7,2, mantidas a uma temperatura ambiente de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, sob agitação de 105 rpm, expostas a uma intensidade luminosa de $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (5920 lux). A concentração celular de inóculo foi de aproximadamente $20 \mu\text{g/mL}$ de clorofila total. Para a fermentação os pesquisadores utilizaram a biomassa ressuspensa em tampão de indução anaeróbico (AIB), contendo fosfato de potássio (50 mmol/L), com pH ajustado em 7,0 e cloreto de magnésio (3 mmol/L) conforme indicado por GHIRALDI (1997) *apud* MUS *et al.* (2007). Argônio foi purgado durante 15 min para eliminar o O_2 presente no sistema. A temperatura manteve-se a mesma durante a fermentação enquanto que a intensidade luminosa usada foi de $700 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (51800 lux). Os resultados obtidos para o hidrogênio foram de até $50 \mu\text{molH}_2/\text{mg}$ de clorofila por hora após 24 h de fermentação.

LAURINAVICHENE *et al.* (2006) utilizaram algas de *Chlamydomonas reinhardtii* Dang 137 c+, cultivadas em meio TAP, pH de 7,0, com intensidade luminosa de $100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (7400lux), utilizando como fonte de carbono o ácido acético (17 mmol/L) já presente na composição original do meio. O foto-biorreator com capacidade para 160mL, utilizando células imobilizadas, sendo a fermentação efetuada em meio TAP com supressão de enxofre e intensidade luminosa de $120 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (8880 lux). A temperatura foi mantida entre $27-29 \pm 1^\circ \text{C}$ e o sistema resultou na produção de $2.1 \text{ mL} \cdot \text{H}_2/\text{L}$ de cultura por hora.

Com o intuito de explorar a produção de H_2 e etanol por *Chlamydomonas*, seja em sistema de cultura pura ou ainda por sistema híbrido ou co-cultura com *Rhodobacter capsulatus*, este trabalho aborda o processo de síntese de H_2 através do estudo do efeito de parâmetros de residuais de enxofre, temperatura, concentração celular do inóculo, fonte de carbono.

MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão apresentados os materiais, procedimentos e variáveis de processo processos que envolveram a avaliação do uso das algas *Chlamydomonas reinhardtii* como potenciais produtoras de hidrogênio. O fluxograma do trabalho é apresentado na Figura 4.1, no qual as práticas experimentais desenvolvidas ao longo da pesquisa são apresentadas.

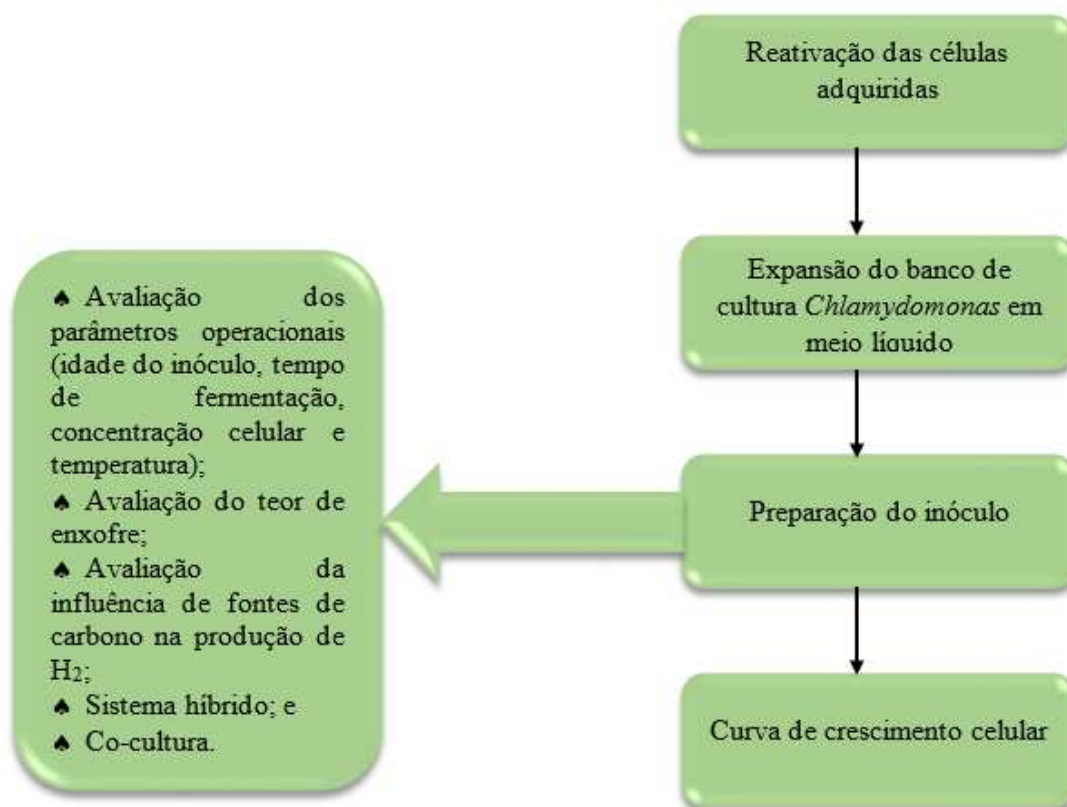


Figura 4.1 - Fluxograma experimental das etapas executadas no presente estudo.

4.1 Alga verde e meio de cultivo

As algas verdes unicelulares *Chlamydomonas reinhardtii* cc-124 foram adquiridas do banco canadense *Chlamydomonas Resource Center* e subcultivadas em meio basal *Tris Acetate Phosphate* – TAP, proposto por ANDERSEN (2005) e cuja formulação está apresentada na Tabela 4.1.

A composição do meio apresenta algumas soluções como TAP sais, solução de fosfato e traços de elementos que são combinações de substâncias que são apresentadas nas Tabelas 4.2 e 4.3. E a concentração de ácido acético é de 17,4 mmol/L presente no meio.

A reativação da alga, originalmente plaqueada e transportada em meio agar sob temperatura ambiente, foi efetuada diretamente neste meio basal. Na preparação do meio utilizou-se os reagentes apresentados na Tabela 4.1, dissolvidos em água deionizada, com pH ajustado em $7\pm 0,10$. Posteriormente, o meio foi autoclavado a uma temperatura de $121\pm 1^\circ\text{C}$, 1 atm., por 20 min.

Após esta etapa e sempre que necessário fontes de carbono foram suplementadas no meio basal para a execução dos experimentos. Para a utilização do meio TAP isento de enxofre, os sais que continham este elemento em sua composição foram substituídos por seus respectivos sais de cloreto, cujas concentrações foram devidamente ajustadas.

Tabela 4.1 - Composição do meio TAP.

Reagentes	Concentração adicionada em 1000mL
Tris-base $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$	2,42g
TAP Sais	25,00mL
Solução de fosfato	1,00mL
Traço de elementos	1,00mL
Ácido Acético	1,00mL

Tabela 4.2 - Composição da solução TAP sais.

Reagentes	Concentração (g/L)
NH_4Cl	15,00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,00
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,00

Tabela 4.3 - Composição do solução de fosfato e traços de elementos.

<i>Solução de Fosfato</i>	
Reagentes	Concentração(g/100mL)
K_2HPO_4	28,80
KH_2PO_4	14,40
<i>Traço de Elementos</i>	
Reagentes	Concentração (g/100mL)
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5,00
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,20
H_3BO_3	1,14
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,50
$\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,50
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,16
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,16
$(\text{NH}_4)_6 \cdot \text{MoO}_3$	0,11

Para se investigar a influência da depleção de enxofre, como dito anteriormente, os componentes que continham enxofre em sua composição foram substituídos por sais de cloretos. Para tal, a equivalência do número de mols foi estabelecida para não faltar íons necessários para atividade da alga. As Tabelas 4.4 e 4.5 explicitam as modificações realizadas.

Tabela 4.4 - Componentes do Sais TAP com a substituição dos sulfatos por cloreto.

Reagentes	Concentração (g/L)
NH ₄ Cl	15,00
MgCl ₂ ·6H ₂ O	3,29
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,00

Tabela 4.5 - Componentes do traço de elementos com a substituição dos sulfatos por cloreto.

<i>Traço de Elementos</i>	
Reagentes	Concentração (g/100mL)
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	5,00
ZnCl ₂ ·7H ₂ O	2,12
H ₃ BO ₃	1,14
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,5
Fe Cl ₂	0,5
<i>Traço de Elementos</i>	
Reagentes	Concentração (g/100mL)
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,16
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,11
(NH ₄) ₆ ·MoO ₃	0,11

4.2 Condições de cultura

4.2.1 Reativação da *Chlamydomonas reinhardtii*

Para a obtenção de uma concentração celular adequada para a execução dos experimentos, houve a necessidade da reativação das algas preservadas originalmente em meio agar. Toda a manipulação da alga foi realizada em câmara de fluxo laminar. Nesta etapa houve a necessidade de promover o crescimento celular, utilizando o meio TAP contendo enxofre. Com o auxílio da alça de platina, previamente aquecida em chama para promover sua esterilização, foi depositada uma pequena quantidade de células em um *erlenmeyer* contendo o meio TAP para crescimento. Após isso o *erlenmeyer* foi fechado com rolha de algodão e gaze, propiciando a troca gasosa com o meio ambiente. Os frascos foram mantidos em estufa germinadora a 22±1° C, com foto-período de 12 h e com intensidade luminosa de 1800 lux (25 μE·m⁻²·s⁻¹).

4.2.2 Cultivo do inóculo

Para garantir uma quantidade satisfatória de algas para a realização dos experimentos, repiques sucessivos foram feitos utilizando *erlenmeyers* de 500 mL. Os subcultivos foram realizados contendo 250 mL de meio TAP fresco foram adicionados à 250 mL de suspensão de algas. Testes preliminares indicaram que a idade do inóculo de 10 dias foi a mais adequada para a obtenção das células e sendo assim, os repiques para o preparo de inóculo celular passaram a serem feitos neste intervalo de tempo.

4.3 Condições para a fermentação

Baseado em dados literários, nos primeiros ensaios de fotofermentação, a concentração inicial de inóculo utilizada foi fixada em 0,10 g/L. Foi utilizado nos experimentos o meio TAP isento de enxofre, pois como comentado anteriormente, é na ausência de enxofre que a célula produz hidrogênio (DAS e VEZIROGLU, 2001). Assim o volume correspondente a 0,10 g/L de alga, foi centrifugado em uma rotação de 8000 rpm durante 15 min. Em seguida, o sedimento obtido foi por duas vezes lavados com água deionizada, sendo centrifugado novamente após cada lavagem. A biomassa foi então reativada em reatores (50 mL) com um volume útil de 37,5 mL contendo meio TAP isento de enxofre e gás argônio foi purgado no sistema durante 3 min para remover o oxigênio.

Os reatores foram devidamente selados com septo de silicone e lacrados com alumínio. Uma seringa graduada foi introduzida no septo para que o biogás produzido durante o processo de incubação fosse coletado. O procedimento acima descrito foi realizado em câmara de fluxo laminar. Os reatores foram mantidos em na estufa a $25\pm 1^\circ\text{C}$, com intensidade luminosa de 2200 lux ($30\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) durante cinco dias conforme mostra a Figura 4.2. Após esse período o gás foi coletado e o sobrenadante analisado.



Figura 4.2 - Fermentação das algas verdes *Chlamydomonas reinhardtii*.

4.4 Produção de hidrogênio molecular e bio-etanol por fotofermentação

4.4.1 Avaliação da idade do inóculo

Os ensaios iniciais tiveram como objetivo avaliar a idade do inóculo na qual a alga produz adequadamente o hidrogênio. Para tal uma concentração celular de inóculo de 0,10 g/L foi fixada e as idades de 5, 10 e 15 dias avaliadas. O procedimento descrito anteriormente no que se refere ao preparo e execução do sistema fermentativo foi adotado (ver seção 4.3). Os experimentos foram realizados em duplicatas.

4.4.2 Avaliação do tempo de fermentação

O tempo de fermentação também foi analisado. Para tal uma faixa entre 12 e 240 h de fermentação foi empregada. Neste experimento, a mesma concentração celular de inóculo foi fixada (0,1 g/L) e a idade de inóculo empregada foi de 10 dias. O mesmo procedimento descrito na seção 4.3 foi adotado para execução da fermentação.

4.4.3 Avaliação da concentração celular

Três concentrações de inóculo, 0,05, 0,10, 0,20 g/L, utilizando um inóculo com 10 dias de idade, foram avaliadas. A execução da fermentação também foi realizada conforme a seção 4.3.

4.4.4 Avaliação do teor de enxofre presente no meio

Diferentes teores de enxofre (0, 10, 25 e 50 mg de SO_4^{2-}), foram avaliados na tentativa de incrementar a síntese de hidrogênio. As concentrações de inóculo de 0,10 e 0,20 g/L, a idade de 10 dias e 5 dias de fermentação foram utilizadas. O meio basal empregado foi o TAP com residuais de enxofre. Através do cálculo do peso molecular, verificou-se que o $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ é responsável por 38,94 mg (aproximadamente 40 mg SO_4^{2-}) do enxofre presente no meio, sendo o restante oriundo de outros componentes ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) que contribuem com apenas 9,8 mg (aproximadamente 10 mg SO_4^{2-}). Desta maneira uma solução concentrada de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foi utilizada para variar o teor de enxofre. Na preparação do meio foram empregadas as quantidades de 0 (isento), 10, 25 e 50 mg (padrão) de SO_4^{2-} , sendo o pH ajustado em $7 \pm 0,10$. A biomassa foi reativada em meio fresco com seus respectivos teores de enxofre, identicamente aos ensaios anteriores.

4.4.5 Avaliação do efeito da concentração celular do inóculo, teor de enxofre e temperatura na produção de H₂ realizada através de planejamento fatorial 2³ (I)

O efeito da temperatura sob a produção de hidrogênio molecular também foi investigado. Foi executado um planejamento fatorial 2³(I) com 3 replicas no ponto central, avaliando novas faixas de teores de enxofre, a partir das conclusões do ensaio anterior. O procedimento foi executado para duas concentrações de inóculo (0,10 e 0,20 g/L), no qual a temperatura variou de 25 à 35 ± 1°C.

Os níveis estão apresentados na Tabela 4.6. Os valores de mínimo e máximo foram escolhidos visando uma maximização da produção de hidrogênio na presença de um residual de enxofre. O valor residual de enxofre empregado escolhidos foram 7mg e 16mg de SO₄²⁻. O ajuste do menor valor foi feito substituindo MgSO₄·7H₂O, FeSO₄·7H₂O; CuSO₄·5H₂O pelos seus respectivos cloretos. Os valores de concentrações celulares do inóculo foi mantido os mesmos.

Tabela 4.6 – Variáveis independentes (teor de SO₄²⁻, concentração celular de inóculo e temperatura) e seus respectivos níveis utilizados no planejamento fatorial 2³ (I).

VARIÁVEIS	NÍVEIS		
	-1(MÍNIMO)	0(MÉDIO)	1(MÁXIMO)
Teor de SO ₄ ²⁻ (mg)	7	11,5	16
Concentração celular do inóculo (g/L)	0,1	0,15	0,20
Temperatura (°C)	25	30	35

A Tabela 4.7 apresenta a matriz de planejamento com os valores codificados e reais, na qual o teor de enxofre, concentração celular e temperatura foram utilizadas como variáveis independentes do planejamento.

Tabela 4.7 - Planejamento fatorial 2³ (I) com três réplicas no ponto central para a análise das variáveis teor de SO₄²⁻, concentração celular do inóculo e temperatura (valores reais entre parênteses).

ENSAIOS	TEOR DE SO ₄ ²⁻ (mg)	CONCENTRAÇÃO (g/L)	TEMPERATURA (°C)
EXP 1	-1 (7)	-1 (0,10)	-1 (25)
EXP 2	1 (16)	-1 (0,10)	-1 (25)
EXP 3	-1 (7)	1 (0,20)	-1 (25)
EXP 4	1 (16)	1 (0,20)	-1 (25)
EXP 5	-1 (7)	-1 (0,10)	1 (35)
EXP 6	1 (16)	-1 (0,10)	1 (35)
EXP 7	-1 (7)	1 (0,20)	1 (35)
EXP 8	1 (16)	1 (0,20)	1 (35)
EXP 9	0 (11,5)	0 (0,15)	0 (30)
EXP 10	0 (11,5)	0 (0,15)	0 (30)
EXP 11	0 (11,5)	0 (0,15)	0 (30)

Os resultados foram tratados no software *Statistica 7.0*. (StatSoft ®) para verificar os principais efeitos destas variáveis na produção de H₂. O intervalo de confiança de 90% (p < 0,10) foi empregado.

4.4.6 Avaliação das fontes de carbono através do planejamento fatorial 2³(II)

As fontes de carbono são responsáveis por potencializar a produção de hidrogênio (KOSOUROV *et al.*, 2007). Neste experimento foram utilizados como fontes de carbono os reagentes: acetato e citrato de sódio e permeado de soro de leite. Os ensaios foram conduzidos conforme descrito a seguir. Foram testadas as fontes de carbono (acetato de sódio e permeado) em ensaios individuais, em duas concentrações de 0,10 e 1 g/L. Em seguida foi realizado um planejamento fatorial 2³(II) com 8 ensaios e 3 pontos centrais para as três fontes de carbono conforme a Tabela 4.8. Os valores inferior e superior foram os valores utilizados no ensaio anterior para o acetato de sódio e citrato de sódio, diferindo somente para o permeado. Os resultados foram tratados no software *Statistica 7.0*. (StatSoft ®) na tentativa de se verificar os principais efeitos destas fontes de carbono na produção de H₂.

Tabela 4.8 - Variáveis independentes (concentração de acetato, citrato e permeado) e seus respectivos níveis utilizados no planejamento fatorial 2³ (II)

VARIÁVEIS	NÍVEIS		
	-1(MÍNIMO)	0(MÉDIO)	1(MÁXIMO)
Acetato (g/L)	0,1	1	1,9
Citrato (g/L)	0,1	1	1,9
Permeado (g/L)	1	1,5	2

A Tabela 4.9 apresenta a matriz de planejamento com os valores codificados e reais, na qual o efeito das fontes de carbono foi verificado. A análise da variância foi realizada, identificando os principais efeitos das variáveis. O intervalo de confiança de 90% ($p < 0,10$) foi adotado.

Tabela 4.9 - Planejamento fatorial 2^3 (II) com três réplicas no ponto central para a análise das variáveis fontes de carbono (valores reais entre parênteses)

ENSAIOS	ACETATO (g/L)	CITRATO (g/L)	PERMEADO (g/L)
EXP 12	-1 (0,10)	-1 (0,10)	-1 (1,00)
EXP 13	1 (1,90)	-1 (0,10)	-1 (1,00)
EXP 14	-1 (0,10)	1 (1,90)	-1 (1,00)
EXP 15	1 (1,90)	1 (1,90)	-1 (1,00)
EXP 16	-1 (0,10)	-1 (0,10)	1 (2,00)
EXP 17	1 (1,90)	-1 (0,10)	1 (2,00)
EXP 18	-1 (0,10)	1 (1,90)	1 (2,00)
EXP 19	1 (1,90)	1 (1,90)	1 (2,00)
EXP 20	0 (1,00)	0 (1,00)	0 (1,50)
EXP 21	0 (1,00)	0 (1,00)	0 (1,50)
EXP 22	0 (1,00)	0 (1,00)	0 (1,50)

4.4.7 Avaliação do sistema híbrido

Esta seção explicita a avaliação do potencial produtor de hidrogênio da *Chlamydomonas reinhardtii* e a da bactéria fotossintetizante *Rhodobacter capsulatus*. O meio de cultivo celular metabolizado (sobrenadante) proveniente da cultura de algas foi utilizado como meio de fermentação para as bactérias fotossintetizantes. As características do meio, bem como as condições fermentativas são descritas no Quadro 4.1. No primeiro ensaio foi realizada uma fermentação com *Chlamydomonas* em meio TAP isento de enxofre. O produto obtido após o período de fermentação (5 dias) foi centrifugado e o sobrenadante foi suplementado com glutamato, ácido málico, permeado de soro de leite e solução de micronutrientes (OLIVEIRA, 2014) nas proporções indicadas no Quadro 4.1 e fornecido a bactéria. Em todos os casos manteve-se um ensaio controle, no qual uma fermentação com alga foi realizada em meio isento de enxofre, sem suplementação de fontes de carbono adicional, com concentração celular do inóculo de 0,10g/L. O sobrenadante resultante deste ensaio controle foi fornecido diretamente para a bactéria.

Quadro 4.1 - Condições de cultivo empregadas nas culturas de *Chlamydomonas reinhardtii* e *Rhodobacter capsulatus* para o sistema híbrido. Em ambas as fermentações a concentração inicial de inóculo foi de 0,1g/L e o tempo de fermentação de 5 dias

Ensaio 1		
<i>Condições de Cultura</i>	<i>C. reinhardtii</i>	<i>Rhodobacter capsulatus</i>
	Meio TAP isento de enxofre	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Sobrenadante obtido da <i>C. reinhardtii</i> ✓ Com suplementação (2,54 g/L de Glutamato, 4,02 g/L de Ácido Málico, 6 g/L de Permeado) e solução de micro nutrientes

O Quadro 4.2 demonstra como ocorreram o segundo e terceiro ensaio. Foi empregado meio TAP isento de enxofre com suplementação de fontes de carbono (concentrações de 0,10 e 1 g/L) na fermentação com *Chlamydomonas* e o produto obtido após 5 dias de fermentação, foi centrifugado e o sobrenadante obtido, fornecido as *Rhodobacter capsulatus*.

Quadro 4.2 - Ensaio híbridos utilizando as algas verdes *Chlamydomonas reinhardtii* e *Rhodobacter capsulatus* com diferentes fontes de carbono.

Ensaio 2		
<i>Condições de Cultura</i>	<i>C. reinhardtii</i>	<i>Rhodobacter capsulatus</i>
	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Meio TAP isento de enxofre ✓ Com fonte de carbono 0,1 g/L (acetato de sódio e permeado) 	
Ensaio 3		
<i>Condições de Cultura</i>	<i>C. reinhardtii</i>	<i>Rhodobacter capsulatus</i>
	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Meio TAP isento de enxofre ✓ Com fonte de carbono 1 g/L (acetato de sódio e permeado) 	

4.4.7 Avaliação do sistema de co-cultura

Co-culturas de *Chlamydomonas reinhardtii* e *Rhodobacter capsulatus*, sendo estas fermentadas tanto em meio basal TAP isento de enxofre, quanto em meio basal RCV. O meio de basal RCV (WEAVER *et al.*, 1975) é composto dos reagentes apresentados nas Tabelas 4.10 e a solução de micronutrientes está detalhada na Tabela 4.11. Os reagentes da Tabela 4.10 (com exceção da vitamina Tiamina) foram dissolvidos em água deionizada e o pH ajustado em $6,8 \pm 0,10$. Somente após a esterelização do meio, em temperatura ambiente, na câmara de fluxo laminar, foi feita a adição da Tiamina, pois altas temperaturas degradam as propriedades da vitamina.

Tabela 4.10 - Componentes do meio basal RCV originalmente utilizado para cultivo da *Rhodobacter capsulatus*.

REAGENTE	CONCENTRAÇÃO (g/L)
Ácido Málico	4,02
KH ₂ PO ₄	0,60
K ₂ HPO ₄	0,90
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,12
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,075
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0,02
Micronutrientes	1 mL
Tiamina	0,001
(NH ₄) ₂ SO ₄	1

Tabela 4.11 - Composições da solução de micronutrientes utilizada no meio basal RCV.

REAGENTE	CONCENTRAÇÃO (g/L)
H ₃ BO ₃	2,8
MnSO ₄ ·H ₂ O	1,59
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,75
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,24
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,075
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,05

A co-cultura entre os dois micro-organismos foi feita inicialmente com uma cultura de 100% de *Rhodobacter capsulatus* no meio RCV, e também no meio TAP isento de enxofre, sem a presença da *Chlamydomonas reinhardtii*. A quantidade de *R. capsulatus* diminui, na proporção que aumenta a quantidade de *C. reinhardtii* presente nos ensaios de acordo com a Tabela 4.12. A concentração celular usada para ambos os casos foi de 0,10 g/L, com inóculos de idade de 10 dias e tempo de fermentação de 5 dias.

Tabela 4.12 -Experimentos realizados com a co-cultura da *Chlamydomonas reinhardtii* e *R. capsulatus* nos meios de cultura RCV e TAP, respectivamente.

% de Célula no Meio RCV (Sem suplementação)		% de Célula no Meio TAP s/enxofre (Sem suplementação de fontes de carbono)	
<i>C. reinhardtii</i>	<i>R. capsulatus</i>	<i>C. reinhardtii</i>	<i>R. capsulatus</i>
0%	100%	0%	100%
10%	90%	10%	90%
30%	70%	30%	70%
50%	50%	50%	50%
70%	30%	70%	30%
90%	10%	90%	10%
100%	0%	100%	0%

Os meios foram devidamente esterilizados, utilizando autoclave a uma temperatura de $121\pm 1^\circ\text{C}$, 1 atm. por 20 min. Os reatores de 50 mL com um volume útil de 37,5 mL, foram usados, utilizando argônio para purgar o oxigênio presente no sistema. Os experimentos foram feitos em replicatas (duas), manuseados em câmara de fluxo laminar, com intensidade luminosa de 2200 lux ($30\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

4.5 Metodologia analítica

4.5.1 Determinação da concentração celular

A determinação da concentração de sólidos voláteis (SV) foi realizada através do método gravimétrico. Na construção da curva de calibração, a densidade óptica a 665 nm (OD665) foi medida em um espectrofotômetro (GENESYS) e convertida em g/L pela equação de correlação entre OD665 e g de SV/L (CLESCERI *et al.*, 1998). Primeiramente uma amostra de 30mL (V) proveniente do inóculo foi centrifugada a 8000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi retirado e o sedimento obtido foi lavado por duas vezes com água destilada e centrifugado após cada lavagem. O sedimento celular foi então transferido para as cápsulas de porcelana (cadinho), previamente calcinadas e pesadas, tendo-se P_0 (mg de massa úmida). Estas capsulas foram então levadas à estufa, mantida a $110\pm 1^\circ\text{C}$, até a obtenção de peso constante. Em seguida, as cápsulas foram colocadas em um dessecador para esfriarem e posteriormente foram pesadas novamente, obtendo-se P_1 (mg massa seca). Após este processo, a amostra celular foi calcinada em mufla a $550\pm 1^\circ\text{C}$ por 30 min e depois colocada novamente em um dessecador até esfriar completamente (40 min), sendo posteriormente pesada e determinando-se P_f (mg de sólidos fixos). As determinações dos sólidos totais (ST), voláteis (SV) e fixos (SF) em

suspensão foram feitas por diferença de peso, segundo as Equações (4.1), (4.2) e (4.3), respectivamente.

$$ST \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{(P_i - P_0)(g)}{V (L)} \quad (4.1)$$

$$SV \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{(P_f - P_i)(g)}{V (L)} \quad (4.2)$$

$$SF \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{(P_f - P_0)(g)}{V (L)} \quad (4.3)$$

Na determinação da curva de calibração, a densidade óptica a 665 nm (OD665) foi utilizada para construir a curva de crescimento celular apresentando na Figura 4.3, sendo que a Equação (4.4) descreve a relação entre a absorbância observada a 665 nm e a concentração de SV.

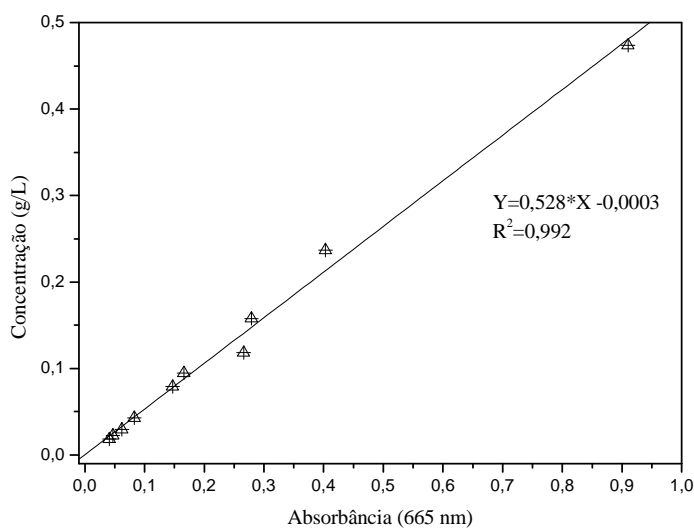


Figura 4.3 -Curva de calibração para a *C. renhardtii* com $R^2=0,992$

$$\left(g \text{ de } \frac{SV}{L} \right) = 0,528 * ABS(665) - 0,0003 \quad (4.4)$$

4.5.2 Análises cromatográficas

Determinação de ácidos orgânicos e açúcares – cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As concentrações dos ácidos foram analisadas por um HPLC (*Shimadzu* modelo LC-20A proeminência, Supelcogel, coluna C-610H), em que os componentes foram detectados por luz ultravioleta (UV). A temperatura da coluna foi mantida a 32° C e uma solução aquosa de H₃PO₄ (0,1%) foi usada para a eluição a 0,5 ml/min.

Quantificação dos gases – cromatografia à gás

O biogás produzido foi analisado em um Cromatográfico à gás GC 17A *Shimadzu*, coluna capilar Carboxen 1010 (comprimento de 30 m, diâmetro interno 0,53 mm), temperatura do injetor 230° C, temperatura da coluna 32° C e temperatura do detector 230° C. Inicialmente a coleta do gás se deu através do uso de um kit de transferência (Figura 4.4). Com isso pode-se garantir o transporte do biogás produzido para ampolas nos quais este produto foi armazenado até o momento da análise.



(a)



(b)



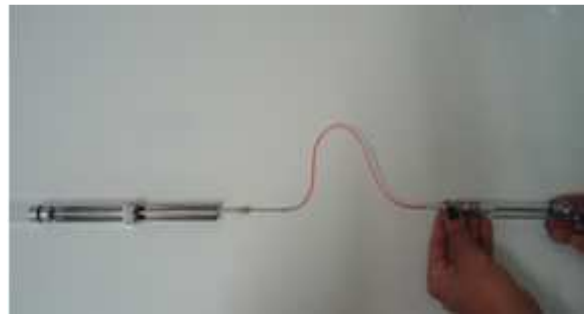
(c)

Figura 4.4 -(a) kit de transferência;(b) ampolas de armazenamento;(c) transferência do gás para as ampolas.

Posteriormente, o gás armazenado foi transferido para o cromatógrafo a gás através do uso de uma seringa própria, como pode ser observado na Figura 4.5.



(a)



(b)

Figura 4.5 - (a) seringa para uso no CG; (b) transferência do gás para a seringa do CG;

RESULTADOS E DISCURSÕES

5.1 Avaliação da idade do inóculo

Para identificar a fase logarítmica de crescimento da alga, uma concentração de 0,10g/L de células foi testada, no intervalo de tempo de 15 dias em meio TAP com supressão de enxofre. Os resultados das concentrações celulares e o volume de biogás produzido podem ser encontrados na Tabela 5.1. Em todos os casos o hidrogênio produzido não foi suficiente para a sua quantificação através do cromatógrafo a gás. KIM *et al.* (2006a) observaram que células de *Chlamydomonas reinhardtii* podem produzir hidrogênio molecular quando 7 dias de idade de inóculo são empregados. No entanto, no estudo realizado por estes pesquisadores, houve variação na composição de enxofre presente no meio, assim a intensidade de luz.

Tabela 5.1 - Concentração final de células e volume de biogás obtidos em 5 dias de fermentação. A concentração celular do inóculo utilizada foi de 0,10g/L. (1) concentração celular final (g/L), (2) produtividade de H₂, (3) produtividade de O₂, ambas em μmol/L·d e (4) volume de biogás produzido (mL).

Idade de Inóculo (d)	(1)	(2)	(3)	(4)
5	0,19	ND ⁽¹⁾	65,35	0,10
10	0,18	ND ⁽¹⁾	449,82	7,80
15	0,12	ND ⁽¹⁾	126,02	1,00

ND⁽¹⁾ - Concentração de H₂ não detectado

Ressalta-se que a privação de enxofre por longos períodos pode ocasionar alterações metabólicas importantes nas algas, como a redução das taxas fotossintéticas que acabam por resultar na diminuição do oxigênio no meio, enquanto que os níveis de respiração são mantidos, fato que torna a cultura anaeróbia. Esta estratégia envolve o uso de energia luminosa para haver a quebra da água, gerando adenosina trifosfato e hidrogênio. Além disso, a degradação do amido em ácidos fórmico, acético, málico, etanol e dióxido de carbono foi observada por TAMBURIC *et al.* (2011). Ainda na Tabela 5.1 observa-se que há uma grande produção de O₂, consequentemente há um aumento nos níveis de respiração das células, dificultando a produção de hidrogênio como explica a literatura.

As concentrações de ácidos orgânicos produzidos pelas algas em culturas propagadas a partir de diferentes idades de inóculo (5, 10 e 15 dias), foram obtidas a partir da análise do sobrenadante celular e os resultados podem ser encontrados na Tabela 5.2. Ressalta se que o meio basal (TAP) possui uma concentração de ácido de 17,4 mmol/L.

Tabela 5.2 -Concentrações de ácidos obtidas nas análises em HPLC, para uma concentração celular de 0,10 g/L, sendo as idades da cepa 5, 10, 15 dias avaliadas.

Idade do Inóculo (g/L)	Ácido Acético (mmol/L)	Ácido Propiônico (mmol/L)	Ácido Butírico (mmol/L)	Etanol (mmol/L)
5	-	-	-	-
10	30,13	0,07	-	-
15	20,79	0,01	-	-

Observando os dados da Tabela 5.2 pode-se verificar que para a idade de 5 dias não foi detectado a formação de ácido acético após 5 dias de fermentação. Isso leva à crer que a concentração de ácido acético originalmente encontrado no meio de cultivo pode ter sido totalmente utilizado para o crescimento celular, sendo o comportamento da alga caracterizado como heterotrófico. Nesta fase, houve um crescimento de 90% da célula (Tabela 5.1), com um desvio-padrão entre as replicatas de $0,4 \times 10^{-3}$ g/L. Já para a idade de 10 dias, a concentração ácido acético foi de 30,13 mmol/L, com desvio-padrão de 3,16 mmol/L observado entre as replicatas. Um crescimento celular de 80% (Tabela 5.1), com um desvio-padrão entre replicatas de $2,29 \times 10^{-2}$ g/L foi verificado. A concentração de ácido propiônico foi de 0,07 mmol/L, com um desvio de $1,37 \times 10^{-2}$ mmol/L. No último experimento de idade de 15 dias, um crescimento celular de apenas 20% foi identificado (Tabela 5.1), com desvio-padrão entre as replicatas de 0,01 g/L. A concentração de ácido acético encontrada em relação a idade anterior foi 31% menor (20,79 mmol/L), sendo o desvio-padrão entre as replicatas de 0,02 mmol/L. Para a concentração de ácido propiônico (0,01 mmol/L) o desvio-padrão foi de $5,06 \times 10^{-5}$ mmol/L.

Diante dos resultados, verificou-se que a idade do inóculo mais adequada para a síntese do produto-alvo, dentro dos procedimentos adotados, foi de 10 dias. Uma vez que para esta idade um crescimento celular acentuado foi observado, além da observação da produção de ácidos orgânicos, que apresentam elevado valor agregado associado. Em vista disso, adotou-se esta idade nos experimentos subsequentes.

5.2 Avaliação do tempo de fermentação

Para identificar o tempo de fermentação mais adequado para a síntese do produto de interesse, intervalos de 12h a 240 h de cultivo foram avaliados, conforme mostram as Tabelas 5.3 e 5.4. O crescimento celular, as concentrações de ácidos orgânicos e a quantidade de biogás no período foram monitorados neste período.

Nos experimentos iniciais de produção de H₂ o tempo de fermentação adotado foi de 5 dias.

Tabela 5.3 - Avaliação do tempo de fermentação na produção de células e de biogás, com concentração celular do inóculo de 0,10g/L.

Tempo de Fermentação (h)	Concentração Final de Células (g/L)	Quantidade de Biogás Produzido (mL)
12	0,13	2,00
24	0,15	0,80
36	0,16	1,00
48	0,16	9,00
72	0,18	1,00
120	0,18	2,00
168	0,16	2,40
240	0,09	2,50

Os resultados mostraram que somente para um tempo de fermentação de 120h (5 dias) houve produção de hidrogênio de 1,59 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{d}$ (Tabela 5.4). Nos demais tempos de fermentação investigados não se verificou uma produção suficiente do produto para que sua detecção no GC 17A *Shimadzu*. Uma análise das concentrações de ácidos orgânicos revelou uma tendência de aumento na concentração de ácido acético (Tabela 5.4) nas primeiras 36 h, sendo observada uma queda brusca em 48 h após o início da fermentação. Constatou um aumento na concentração deste ácido entre 48 e 168 h. Após este período houve uma diminuição da concentração do ácido acético no meio, sendo o desvio-padrão para o experimento de 5×10^{-3} mmol/L. Já a concentração de ácido propiônico apresentou um pico de produção nas primeiras horas de fermentação (12 h). Contudo, no restante do período analisado, sua produção foi baixa, sendo o desvio-padrão observado de $0,7 \times 10^{-3}$ mmol/L.

A produção de etanol foi observada somente no experimento correspondente a 72 h de fermentação, sendo o desvio-padrão para o experimento de $0,6 \times 10^{-3}$ mmol/L e não se observou concentração de ácido butírico. Já a produção de hidrogênio ocorreu somente após 120 h de fermentação (5 dias), com desvio-padrão de 0,12 $\mu\text{mol/L}$.

Tabela 5.4 - Avaliação do tempo de fermentação na evolução de ácidos orgânicos, etanol e hidrogênio. A concentração inicial de inóculo de 0,10g/L foi utilizada. (1) ácido acético, (2) ácido propiônico, (3) ácido butírico todos em mmol/L, (4) etanol em mmol/L, (5) produtividade de H₂ e (6) produtividade de O₂, ambos em μmol/L·d.

Tempo de Fermentação (h)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
12	-	1,57	-	-	ND ⁽¹⁾	201,18
24	27,74	-	-	-	ND ⁽¹⁾	64,74
36	50,72	0,06	-	-	ND ⁽¹⁾	101,22
48	-	0,05	-	-	ND ⁽¹⁾	557,98
72	33,73	0,12	-	16,09	ND ⁽¹⁾	133,32
120	74,43	0,05	-	-	1,59	356,92
168	58,32	0,07	-	-	ND ⁽¹⁾	279,33
240	31,71	-	-	-	ND ⁽¹⁾	278,65

ND⁽¹⁾ - Concentração de H₂ não detectado

Neste sentido, este período de fermentação foi adotado nos ensaios subsequentes. Por fim, a produção de oxigênio continuou elevada no sistema, o que possivelmente pode ter resultado na inibição da enzima hidrogenase e na não produção de hidrogênio.

5.3 Avaliação da concentração celular do inóculo

Visando a potencialização da produção de hidrogênio, foi realizada a avaliação do efeito da concentração inicial de células. Foram testadas as concentrações de 0,05, 0,10 e 0,20 g/L de algas *Chlamydomonas reinhardtii*, em reatores lacrados com um mesmo tempo de fermentação (5 dias), utilizando células com idade de 10 dias. Observa-se que durante estes ensaios houve produção de biogás, que ao ser analisado, não revelou concentrações de H₂. Pode ser observado nas Tabelas 5.5 e 5.6 os principais produtos do metabolismo sintetizados e as quantidades de biogás produzido nas condições avaliadas.

Tabela 5.5- Concentrações de ácidos orgânicos e etanol obtidas após 5 dias de fermentação em culturas com idade de inóculo foi de 10 dias.

Concentração celular do Inóculo (g/L)	Ácido Acético (mmol/L)	Ácido Propiônico (mmol/L)	Ácido Butírico (mmol/L)	Etanol (mmol/L)
0,05	53,70	0,01	-	418,10
0,10	30,13	0,07	-	-
0,20	58,82	0,09	-	299,3

Conforme apresentado na Tabela 5.5 para a concentração celular de inóculo de 0,05 g/L, a concentração de ácido acético produzido foi de 53,70 mmol/L, tendo desvio-padrão entre as replicatas de $3,31 \times 10^{-3}$ mmol/L.

Esta amostra continha além de concentrações de ácido acético, o ácido propiônico (0,01 mmol/L) e o etanol (19,25 g/L), onde o desvio-padrão entre as replicatas para o propiônico foi praticamente zero ($8,43 \times 10^{-5}$ mmol/L) e para o etanol de $6,39 \times 10^{-2}$ g/L, respectivamente. Na concentração celular de inóculo de 0,10 g/L observou-se uma concentração de ácido acético de 30,13 mmol/L. Este valor é 43,89% menor que a concentração obtida anteriormente, sendo o desvio-padrão de $0,74 \times 10^{-3}$ mmol/L. Este caso também apresentou uma concentração de ácido propiônico (0,07 mmol/L), sendo o desvio-padrão entre as replicatas de $0,2 \times 10^{-3}$ mmol/L. No último experimento com concentração de 0,20 g/L, detectou-se uma concentração de ácido acético de 58,82 mmol/L, com desvio-padrão de $0,96 \times 10^{-3}$ mmol/L. Concentrações de ácido propiônico (0,09 mmol/L) e etanol (13,78 g/L) foram também identificados na amostra, com desvio-padrão de $2,66 \times 10^{-5}$ mmol/L e $5,9 \times 10^{-2}$ g/L entre as replicatas, respectivamente.

As concentrações finais de célula podem ser observadas na Tabela 5.6, sendo que um crescimento acentuado ocorreu com o uso de uma concentração celular de inóculo de 0,10 g/L (75%). Enquanto que para a concentração celular de inóculo de 0,05 g/L houve um crescimento de 14%. Já para a última concentração celular de inóculo avaliada (0,20 g/L), houve uma redução no número de células de 22,5%. Os resultados mostraram também que as concentrações celulares de 0,05 e 0,20 g/L apresentaram desempenhos similares quanto aos metabólicos produzidos. No ensaio contendo uma concentração celular de inóculo de 0,05 g/L houve uma concentração maior de etanol no meio basal isento de enxofre em relação ao ensaio contendo uma concentração celular de inóculo de 0,20 g/L. O oxigênio aparece com altas taxas de produtividade, principalmente para concentração celular do inóculo de 0,10 g/L. Assim, estes ensaios não revelaram informações que pudessem afirmar qual a concentração celular de inóculo deveria ser usada nos experimentos futuros, havendo a necessidade de novos testes.

Tabela 5.6 - Concentração final de células e volume de biogás obtidos em 5 dias de fermentação, variando a concentração inicial. (1) Concentração Celular Final (g/L), (2) produtividade de H₂, (3) produtividade de O₂ ambas em μmol/L·d e (4) biogás produzido em mL.

Concentração celular de inóculo (g/L)	(1)	(2)	(3)	(4)
0,05	0,057	ND ⁽¹⁾	118,49	1,50
0,10	0,175	ND ⁽¹⁾	998,11	7,80
0,20	0,155	ND ⁽¹⁾	180,22	2,00

ND⁽¹⁾ - Concentração de H₂ não detectado

É sabido que a alga *Chlamydomonas reinhardtii* produz etanol além de hidrogênio. No trabalho desenvolvido por MUS *et al.* (2007), relatou-se que a formação de etanol ocorre durante a fotofermentação por *Chlamydomonas reinhardtii*, a partir da redução da acetil-CoA, resultando na oxidação de duas moléculas de NADH. Os autores enfatizaram que incrementos nos níveis de ADH1 mRNA ocorrem durante o período de anoxia. Assim, o piruvato pode ser também convertido a etanol via PDC1 (piruvato decarboxilase) e na rota da enzima álcool desidrogenase (ADH), verifica-se a produção de etanol e também a oxidação de um NADH.

5.4 Avaliação do teor de enxofre presente no meio

Trabalhos CHOCHOIS *et al.* (2009) e LEHR *et al.* (2012) demonstraram que um dos maiores desafios para a produção de H₂ por rota biológica é a sensibilidade da hidrogenase à presença de O₂. Para solucionar este problema, a atividade no FSII da alga deve ser reduzida, de modo a equilibrar o aumento do O₂ com o consumo respiratório das células. Isso ocorre quando o teor de enxofre é limitado no meio de cultivo (MELIS *et al.*, 2000). De modo a confirmar este fato, ensaios nos quais o teor de enxofre foi variado (0, 10, 25 e 50 mg SO₄²⁻) foram executados sendo apresentados na Tabela 5.7.

Vale lembrar que o meio basal TAP em sua composição original possui aproximadamente 50 mg de SO₄²⁻, e as variações se deram como explicado anteriormente (ver seção 4.4.4). Ao final, observou-se que as quantidades de biogás produzido foram maiores quando comparadas as situações supracitadas. Como pode ser visualizado na Tabela 5.7, na presença de um residual de enxofre a produção de H₂ é significativamente maior.

Tabela 5.7–Investigação do efeito do enxofre residual na produção de H₂. A idade de inóculo de 10 dias foi fixada sendo as concentrações de inóculo de 0,10 e 0,20 g/L avaliadas.

		Concentração de Células Finais (g/L)		Produtividade H ₂ (μmol/L·d)		Ácido Acético (mmol/L)		Ácido Propiônico (mmol/L)	
		0,10 (g/L)	0,20 (g/L)	0,10 (g/L)	0,20 (g/L)	0,10 (g/L)	0,20 (g/L)	0,10 (g/L)	0,20 (g/L)
Teor de SO ₄ ²⁻ (mg)	Isento	0,09	0,30	0,06	0,47	27,21	21,90	-	0,21
	10	0,08	0,31	2,09	1,42	21,61	19,94	0,04	0,02
	25	0,09	0,46	ND ⁽¹⁾	2,14	28,62	27,59	0,04	0,19
	50	0,10	0,39	ND ⁽¹⁾	ND ⁽¹⁾	18,02	28,19	-	0,03

ND⁽¹⁾ - Concentração de H₂ não detectado

No meio completamente isento de enxofre houve uma pequena produtividade de hidrogênio (0,06 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{d}$), enquanto que a concentração de ácido acético produzido pelas algas nesta condição atingiu 27,21 mmol/L. Uma maior produtividade de hidrogênio foi observada quando o teor de enxofre no meio foi de até 10 mg de SO_4^{2-} , para uma concentração celular de inóculo de 0,10 g/L. Nesta condição, a concentração de ácido acético no meio foi de 21,61 mmol/L. Para esta mesma condição, a concentração de ácido propiônico foi de apenas 0,02 mmol/L. E alterando a concentração celular de inóculo para 0,20g /L, as algas produziram o produto alvo de forma menos intensa (1,42 $\mu\text{mol}\cdot\text{H}_2/\text{L}\cdot\text{d}$) enquanto que a concentração de ácido acético detectada foi de até 19,94 mmol/L. Já a concentração de ácido propiônico continuou baixa e os demais produtos do metabolismo também monitorados não foram sintetizados.

Ao se analisar o experimento com uma condição máxima de concentração (0,20 g/L), um teor de enxofre de 25 mg SO_4^{2-} , resultou em uma maior produtividade de hidrogênio do que a condição de 10 mg SO_4^{2-} . Assim, foi possível afirmar que uma maior concentração celular de inóculo foi capaz de resultar em maior produtividade do H_2 , quando uma quantidade residual maior de enxofre está presente no meio. A Tabela 5.8 traz um comparativo entre os trabalhos de TSYGANKOV *et al.* (2006) e LEHR *et al.* (2012) com o presente estudo.

Estudos de TSYGANKOV *et al.* (2006) para a produção de hidrogênio mostraram que a alga (*Chlamydomonas reinhardtii* stm-6) produziram hidrogênio a partir de meio basal TAP suprimido de enxofre, com pH ajustado em $6,8\pm 0,20$. O reator utilizado apresentava capacidade de 20 L, sendo o conteúdo do reator misturado com uma bomba submersível (12 mL/min) durante 15 min em intervalos de duas horas. Variando o foto período (2, 3 e 4 h, consistindo de 3 ciclos diários) obtiveram produções elevadas de hidrogênio foram observadas. Para um foto período de 2 h os autores observaram 32 ± 4 mL/h com um teor de 47% de hidrogênio. Já o foto período de 3 h resultou em uma geração de 63 ± 7 mL/h de biogás com um teor total de 82% de gás hidrogênio. Para um foto período de 4 h observou-se um volume total de biogás de 52 ± 5 mL/h, com uma concentração de 86% de hidrogênio, como ilustrado na Tabela 5.8. Ainda neste estudo TSYGANKOV *et al.* (2006) observou ao comparar os foto-períodos, que a razão de menores concentrações de hidrogênio presentes no biogás produzido foi devido ao aumento na taxa de respiração e conseqüente aumento do oxigênio presente no sistema. MELIS e HAPPE (2001) descreveram em seus estudos que é possível a produção de no máximo 10 mol· $\text{H}_2/\text{L}\cdot\text{m}^2\cdot\text{d}$ de cultura por dia, sendo este valor influenciado pelos parâmetros de fermentação, já descritos anteriormente.

LEHR *et al.* (2012) avaliou a presença do residual de enxofre na produção de H₂, variando a concentração de sulfato (5 a 75 mg/L). Para tal, a temperatura de 25° C em um reator de vidro cilíndrico (diâmetro 100 mm, altura 300 mm, volume útil de 2 L), mantido sob agitação, utilizando uma cepa de *Chlamydomonas reinhardtii* mutantes stm6 e concentração de biomassa de 0,2 g/L foram investigados. A radiação luminosa (80, 280 e 720 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; 5,9, 20,8 e 53,3 klux, respectivamente) também foi variada. Os autores determinaram que teores de enxofre abaixo de 20 mg SO₄²⁻/L são suficientes para proporcionar um bom crescimento da biomassa e também a produção de biogás. Sendo assim LEHR *et al.* (2012) utilizaram em seus ensaios um teor enxofre de 11mg SO₄²⁻/L, que resultou em uma melhor produção de hidrogênio (650 mL·H₂/g biomassa·h). Tal observação foi obtida após 535 h de fermentação, combinado uma radiação luminosa de 280 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (20,8 klux).

Como foi verificado que os resultados dos trabalhos descritos na literatura (Tabela 5.8) são maiores do que os encontrados neste estudo, optou-se por explorar outros parâmetros e o efeito sinérgico entre eles conforme serão listados nos tópicos seguintes.

Tabela 5.8 -Comparação da produtividade de H₂ a partir de uma fermentação em meio isento de enxofre.

COMPARAÇÃO DA PRODUTIVIDADE DE H ₂ COM A LITERATURA				
Espécie	Condições de Fermentação	Foto período	Produtividade de H ₂	Referência
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> estirpe Dang 137C (mt+)	Reator de 20 L, pH monitorado e mantido em 6,8±0,20 concentração inóculo de 0,5 L, meio TAP com supressão de enxofre, 120 μE·m ⁻² ·s ⁻¹	2 h	±33,46 (μmol/L·h)	TSYGANKOV <i>et al.</i> (2006)
		3 h	±11,49 (μmol/L·h)	
		4 h	±99,49 (μmol/L·h)	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-124	Reator de 37,5 mL, meio TAP com supressão de enxofre, pH ajustado em 7, concentração celular de inóculo de 0,10 g/L e 30 μE·m ⁻² ·s ⁻¹ .	12 h	0,06 (μmol/L·h)	Presente estudo
	Reator de 37,5 mL, meio TAP com supressão de enxofre, pH ajustado em 7, concentração celular de inóculo de 0,20 g/L, e 30 μE·m ⁻² ·s ⁻¹ .	12 h	0,47 (μmol/L·h)	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> mutantes stm6	Reator de vidro cilíndrico (diâmetro 100 mm, altura 300 mm, volume útil de 2 L), concentração celular de inóculo de 0,20 g/L, em um meio com teor de enxofre de 11 mg SO ₄ ²⁻ /L	12 h (80 μE·m ⁻² ·s ⁻¹)	26,69 (μmol/g _{biomassa} ·h)	LERH <i>et al.</i> (2012)
		12 h (280 μE·m ⁻² ·s ⁻¹)	106,78 (μmol/ g _{biomassa} ·h)	
		12 h (720 μE·m ⁻² ·s ⁻¹)	28.921,78 (μmol/ g _{biomassa} ·h)	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-124	Reator de 37,5mL, meio TAP com teor de enxofre 10mg SO ₄ ²⁻ , pH ajustado em 7, concentração celular de inóculo de 0,10g/L e 30 μE·m ⁻² ·s ⁻¹ .	12 h	0,04 (μmol/ g _{biomassa} ·h)	Presente estudo
	Reator de 37, 5mL, meio TAP com teor de enxofre 25 mg SO ₄ ²⁻ , pH ajustado em 7, concentração celular de inóculo de 0,20 g/L e 30 μE·m ⁻² ·s ⁻¹	12 h	0,03 (μmol/ g _{biomassa} ·h)	

5.5 Avaliação da concentração celular do inóculo, teor de enxofre e temperatura na produção de H₂

Assim como os parâmetros idade e concentração celular de inóculo, tempo de fermentação e teor de enxofre no meio, a temperatura também é um parâmetro que necessita ser avaliado para a produção de hidrogênio. Conforme a literatura (KOSOUROV *et al.*, 2003; MELIS, 2007; TAMBURIC *et al.*, 2011; LEHR *et al.*, 2012), uma temperatura de 25° C se mostrou adequada para a manutenção das algas e também na potencialização da síntese de H₂. No entanto, DASGUPTA *et al.* (2010) em seus trabalhos mostrou que a faixa requerida para algas produzirem H₂ situa-se entre 25 e 35° C. Em vista disso, o planejamento fatorial 2³ (I) com 3 réplicas no ponto central, variando o teor de enxofre presente no meio basal, a concentração de células (biomassa de alga) e a temperatura foi executado. A matriz do planejamento, bem como as variáveis independentes avaliadas e as variáveis respostas monitoradas estão ilustradas na Tabela 5.9.

Em geral, a partir de uma análise qualitativa, o aumento gradual da temperatura não potencializou a produção de H₂ pelas algas. Por outro lado, o aumento na concentração celular de inóculo incrementou os valores da produtividade de H₂, comparando-se os experimentos 2 e 3 (29,68 e 22,25 µmol/L.d respectivamente). Já o uso do nível superior (experimento 8) das variáveis independentes investigadas não resultou no aumento da síntese de hidrogênio, uma vez que a produção de biogás foi insuficiente para promover a detecção do hidrogênio pelo cromatógrafo à gás. O oxigênio ainda esteve presente em altas concentrações. Observa-se que houve concentrações de ácido acético em todas as condições estudadas.

Tabela 5.9- Produtividade de H₂ e concentrações de ácidos obtidos no planejamento fatorial 2³(I). (1) produtividade de H₂, (2) produtividade de O₂ ambas em µmol/L.d, (3) ácido acético, (4) ácido propiônico, (5) etanol em mmol/L.

Ensaio	Planejamento			(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
	Teor de SO ₄ ²⁻	C.C.	T					
1	-1 (7)	-1 (0,10)	-1 (25)	5,88	94,69	26,00	0,01	-
2	1 (16)	-1 (0,10)	-1 (25)	29,68	854,36	27,09	0,05	-
3	-1 (7)	1 (0,20)	-1 (25)	22,25	125,26	26,39	-	-
4	1 (16)	1 (0,20)	-1 (25)	4,68	84,47	25,09	-	-
5	-1 (7)	-1 (0,10)	1 (35)	0,26	87,88	22,92	-	-
6	1 (16)	-1 (0,10)	1 (35)	0,02	116,60	24,09	-	-
7	-1 (7)	1 (0,20)	1 (35)	0,28	106,74	24,61	-	-
8	1 (16)	1 (0,20)	1 (35)	ND ⁽¹⁾	113,37	21,32	-	-
9	0 (11,5)	0 (0,15)	0 (30)	9,03	333,00	37,16	0,12	-
10	0 (11,5)	0 (0,15)	0 (30)	7,86	514,71	37,61	0,16	-
11	0 (11,5)	0 (0,15)	0 (30)	2,20	271,94	31,71	0,12	-

ND⁽¹⁾ - Concentração de H₂ não detectado, C.C. – Concentração celular de inóculo, T – Temperatura.

O gráfico da normal, conforme apresentado na Figura 5.1, mostra que os efeitos mais relevantes são os efeitos principais (teor de SO_4^{2-} e temperatura) e os secundários (concentração celular do inóculo com temperatura e teor de enxofre com concentração celular do inóculo). Os valores que estão mais próximos do zero (teor de enxofre com temperatura e concentração do inóculo) são da mesma ordem de medida do erro, ou seja, não trazem efeitos significativos no experimento.

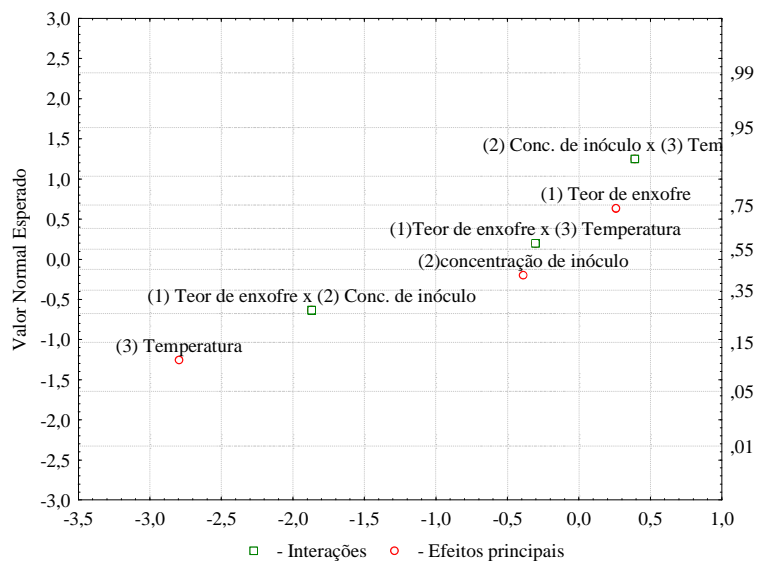


Figura 5.1 - Análise dos efeitos (meio, concentração celular de inóculo, temperatura e suas interações) para a produção de H_2 .

Utilizando a análise de efeitos de um planejamento fatorial para determinar quais efeitos principais e secundários (obtidos da análise da Figura 5.1) influenciam realmente na produção de hidrogênio. A Tabela 5.10 apresenta a avaliação dos efeitos das variáveis investigadas para um intervalo de confiança de 90% ($p < 0,10$). Nesta condição somente a temperatura apresentou efeito significativo. Segundo a análise estatística, o aumento desta variável resulta na diminuição dos valores obtidos para a variável resposta produtividade de hidrogênio.

Tabela 5.10 - Estimativa dos efeitos (meio, concentração celular e temperatura) na produtividade de H₂ (μM·H₂/L·d) por *Chlamydomonas reinhardtii*.

VARIÁVEIS	EFEITOS	ERRO	T(4)	p-VALOR
Média	7,46	2,36	3,16	0,03
(1) Teor de SO₄²⁻	1,42	5,53	0,25	0,80
(2) C.C.	-2,15	5,53	-0,38	0,71
(3) T^(*)	-5,48	5,53	-2,79	0,04
(1) x (2)	-10,35	5,53	-1,86	0,13
(1) x (3)	-1,68	5,53	-0,30	0,77
(2) x (3)	2,15	5,53	0,38	0,71

^(*) Efeitos significativos ($p < 0,10$) para um intervalo de confiança de 90%. $R^2=0,74$

Verificou-se também que apesar do R^2 ser baixo (74%), a seguinte tendência foi observada: para uma concentração celular de inóculo de nível inferior (0,10 g/L), maiores quantidades de hidrogênio a uma temperatura de nível inferior de 25° C (ambos os efeitos na Tabela 5.10 são negativos, mostrando que os níveis inferiores são condições melhores) foram observadas. Além disso, uma produção de 29,68 μmol·H₂/L·d foi verificada, levando em consideração uma quantidade superior de enxofre (16 mg de SO₄²⁻). Nota-se que para o intervalo entre o experimento 5 ao 8, no qual a temperatura teve seu nível superior (35° C), a produção de hidrogênio foi baixa. Enquanto que mantendo uma temperatura em nível médio (30° C), uma melhor produção foi observada não ultrapassando o valor de 10 μmol·H₂/L·d. Demonstrando que a temperatura tem efeito direto nas demais variáveis. Neste experimento não foi observado concentrações de etanol nas amostras.

5.6 Avaliação de fontes de carbono

Para as algas com privação de enxofre no meio basal, o efeito do acetato sobre a produção de H₂ é de difícil entendimento. Investigações prévias mostraram que as algas *Chlamydomonas reinhardtii* captam o acetato apenas durante as fases de consumo aeróbio, mas sugerem que células não utilizam este acetato durante a fase de produção de hidrogênio (MELIS *et al.*, 2000; TSYGANKOV *et al.*, 2002; KOSOUROV *et al.*, 2003; KOSOUROV *et al.*, 2007). Apesar desta observação, KOSOUROV *et al.* 2007 não concluíram a respeito da quantidade ideal de acetato a ser utilizado para uma maximização da produção do hidrogênio. Desta forma, este trabalho utilizou duas concentrações para verificar qual influenciaria na produtividade de hidrogênio.

Assim, alguns ensaios pontuais foram feitos para avaliar a potencialidade da produção do hidrogênio, a partir de suplementação com fontes de carbono adicionais como acetato de sódio e permeado, ambos utilizados isoladamente. Através desses ensaios percebeu-se que as fontes de carbono suplementadas no meio TAP isento de enxofre², quando a 1 g/L, têm pouca influência na produção de hidrogênio, assim como a 0,1 g/L, como mostra a Tabela 5.11. A concentração de ácido acético foi maior na presença das fontes de carbono, no entanto, constatou-se também a produção acentuada de etanol.

Tabela 5.11 - Avaliação do efeito das fontes de carbono (0,10 e 1 g/L) na produção de H₂. A concentração celular de inóculo da alga foi de 0,10 g/L. Na qual, (1) ácido acético, (2) ácido propiônico, (3) ácido fórmico, (4) etanol em mmol/L e (5) produtividade de H₂ em μmol/L·d.

<i>Fontes de Carbono (0,10g/L)</i>	<i>Meio TAP isento de SO₄</i>				
	<i>(1)</i>	<i>(2)</i>	<i>(3)</i>	<i>(4)</i>	<i>(5)</i>
Controle	29,86	0,02	-	-	0,89
Acetato	36,84	0,07	-	209,29	ND ⁽¹⁾
Permeado	50,67	0,06	19,73	284,58	ND ⁽¹⁾
Acetato + Permeado	58,28	0,12	33,46	324,44	ND ⁽¹⁾
<i>Fontes de Carbono (1g/L)</i>	<i>Meio TAP isento de SO₄</i>				
	<i>(1)</i>	<i>(2)</i>	<i>(3)</i>	<i>(4)</i>	<i>(5)</i>
Controle	31,30	0,02	-	-	1,20
Acetato de sódio	34,75	0,05	-	-	ND ⁽¹⁾
Permeado	31,63	0,04	24,31	-	ND ⁽¹⁾

ND⁽¹⁾ - Concentração de H₂ não detectado

Isto ocorreu pelo fato de que a *Chlamydomonas reinhardtii* na fase anóxia do período escuro da fotofermentação, acumula vários produtos como o ácido acético, propiônico e etanol inibindo a produção de hidrogênio (MUS *et al.*, 2007). Ressalta-se que quando o permeado é adicionado ao meio de fermentação, observa-se a formação de um novo ácido orgânico, o fórmico.

Segundo KHATTAK *et al.* (2014) ao ser utilizando levedo com adição de glicose obteve-se produção de etanol. Já no caso da *Chlamydomonas reinhardtii* a produção do etanol ocorre de maneira espontânea, uma vez que a alga já tem uma predisposição para produzir este produto. A Tabela 5.12 ilustra esta produção a partir de células de levedo comparadas a produção de etanol pelas algas neste estudo.

² Estes ensaios foram realizados simultaneamente com os do item 5.4, por este motivo o uso do meio TAP com supressão de enxofre.

Tabela 5.12 -Comparação da produção de etanol a partir de diferentes sistemas fermentativos.

ETANOL PRODUZIDO A PARTIR DE CULTURAS DE LEVEDURAS				
<i>Condições de Fermentação</i>	<i>Concentração Glicose Inicial (g/L)</i>	<i>Glicose Final (g/L)</i>	<i>Bio-Etanol Produzido (g/L)</i>	<i>Referência</i>
Lêvedo	10	0 ± 0,01	3,83 ± 0,11	KHATTAK <i>et al.</i> (2014)
	20	8,76 ± 0,26	4,04 ± 0,12	
	30	16,2 ± 0,39	4,19 ± 0,12	
	40	23,40 ± 0,74	4,45 ± 0,13	
	50	33,56 ± 1,20	4,56 ± 0,13	
ETANOL PRODUZIDO A PARTIR DE ALGAS VERDES <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>.				
<i>Condições de Fermentação</i>	<i>Concentração de Substratos (g/L)</i>		<i>Etanol Produzido (g/L)</i>	<i>Referência</i>
	<i>Acetato de sódio</i>	<i>Permeado</i>		
Meio isento de enxofre, concentração celular de 0,10 g/L	0,10	-	9,61	Presente trabalho
	-	0,10	13,11	
	0,10	0,10	14,94	
<i>Condições de Fermentação</i>	<i>Concentração celular de inóculo (g/L)</i>		<i>Etanol Produzido (g/L)</i>	
Meio isento de SO ₄	0,05		19,26	
	0,20		13,78	

Conforme observado na Tabela 5.12, as algas verdes originalmente empregadas neste estudo para a produção de hidrogênio mostraram-se aptas em sintetizar também etanol em concentrações de até 19 g/L. É importante ressaltar que este valor quando comparado à produção através do uso de leveduras foi pelo menos 3,8 vezes maior. Isto indica que a suplementação do meio com uma fonte de carbono como o permeado de soro de leite, rico em lactose, estimulou o metabolismo da *Chlamydomonas reinhardtii* em produzir este subproduto do metabolismo.

Dando sequência ao estudo, investigou-se então a combinação das fontes de carbono (acetato, citrato e permeado) em meio TAP contendo um teor de enxofre de 10 mg de SO₄²⁻, para uma concentração celular de inóculo de 0,10 g/L. Para tal, um novo planejamento fatorial 2³ (II) foi executado.

Os dados de cada combinação e os resultados obtidos em relação à produtividade de H₂ e O₂, concentração celular final das algas estão apresentados na Tabela 5.13. Observa-se que a maior produção de hidrogênio (1975 μM·H₂/L·d) foi obtida no ensaio 18, quando as variáveis do planejamento estavam em seu nível superior para citrato de sódio e permeado de soro de leite e em seu nível inferior para acetato de sódio. No entanto, o ensaio 19, em que a variável independente acetato também estava em seu nível superior, assim como as demais variáveis independentes avaliadas, também apresentou uma produção elevada de hidrogênio (974,61

$\mu\text{mol}\cdot\text{H}_2/\text{L}\cdot\text{d}$). Observou-se que os maiores valores de produtividade de H_2 foram obtidos quando reduzidos valores de produtividade de O_2 foram verificados. Conclui-se então que a taxa de respiração no sistema estava elevada, fazendo com que um consumo acentuado de oxigênio se verificasse, aumentando assim o desempenho da hidrogenase para a produção de H_2 . A Tabela 5.13 apresenta os resultados do planejamento fatorial em relação a produtividade de hidrogênio, oxigênio e concentração celular final.

Tabela 5.13–Planejamento fatorial 2^3 (II) com 3 réplicas no ponto central, As variáveis independentes foram a concentração de acetato, citrato e permeado. A concentração celular de inóculo foi de 0,10 g/L e o teor de enxofre de 10 mg SO_4^{2-} . (1) produtividade de H_2 , (2) produtividade de O_2 ambas em $\mu\text{mol}/\text{L}\cdot\text{d}$, (3) concentração celular final (g/L).

Ensaio	Planejamento			(1)	(2)	(3)
	Acetato	Citrato	Permeado			
12	-1 (0,10)	-1 (0,10)	-1 (1,00)	1,21	100,25	0,10
13	1 (1,90)	-1 (0,10)	-1 (1,00)	0,03	100,47	0,13
14	-1 (0,10)	1 (1,90)	-1 (1,00)	274,34	881,32	0,09
15	1 (1,90)	1 (1,90)	-1 (1,00)	133,20	1117,70	0,13
16	-1 (0,10)	-1 (0,10)	1 (2,00)	9,66	401,16	0,20
17	1 (1,90)	-1 (0,10)	1 (2,00)	32,12	479,13	0,12
18	-1 (0,10)	1 (1,90)	1 (2,00)	1975,10	1131,77	0,11
19	1 (1,90)	1 (1,90)	1 (2,00)	974,61	1397,17	0,14
20	0 (1,00)	0 (1,00)	0 (1,50)	1011,46	476,58	0,08
21	0 (1,00)	0 (1,00)	0 (1,50)	651,84	669,02	0,15
22	0 (1,00)	0 (1,00)	0 (1,50)	397,18	1318,01	0,12

Uma análise suplementar foi realizada em função do metabolismo das algas considerando-se as variáveis independentes investigadas e os metabólicos formados. A Tabela 5.14 apresenta os resultados. Em geral, a produção dos ácidos málico, láctico e fórmico foi observada. Os traços de lactose foram observados no meio, uma vez que permeado foi utilizado como fonte de carbono e é rico neste açúcar. Por outro lado, etanol não foi produzido nesta condição. Observou uma concentração baixa de ácido fórmico que está presente sempre quando há presença do permeado.

Tabela 5.14 - Comparação entre os dados de síntese metabólica para o planejamento fatorial supracitado, (1) Ácido Lático, (2) Ácido Acético, (3) Ácido Propiônico, (4) Ácido Málico, (5) Lactose, (6) Ácido Fórmico, todos em mmol/L.

Ensaio	Planejamento			(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
	Acetato	Citrato	Permeado						
12	-1 (0,10)	-1 (0,10)	-1 (1,00)	5,77	13,45	26,04	0,33	0,21	0,53
13	1 (1,90)	-1 (0,10)	-1 (1,00)	4,48	11,16	46,32	0,34	0,88	0,04
14	-1 (0,10)	1 (1,90)	-1 (1,00)	2,88	83,17	36,23	0,19	1,72	0,23
15	1 (1,90)	1 (1,90)	-1 (1,00)	4,44	11,09	62,27	0,29	8,04	0,25
16	-1 (0,10)	-1 (0,10)	1 (2,00)	5,94	13,74	29,01	0,69	3,53	0,21
17	1 (1,90)	-1 (0,10)	1 (2,00)	3,50	9,42	49,72	0,33	3,73	0,05
18	-1 (0,10)	1 (1,90)	1 (2,00)	5,63	13,18	31,96	0,37	2,21	0,05
19	1 (1,90)	1 (1,90)	1 (2,00)	7,12	15,83	45,42	0,29	1,95	0,21
20	0 (1,00)	0 (1,00)	0 (1,50)	3,92	10,17	37,69	0,67	2,52	0,09
21	0 (1,00)	0 (1,00)	0 (1,50)	1,78	6,37	36,23	0,32	1,35	0,10
22	0 (1,00)	0 (1,00)	0 (1,50)	4,49	11,17	39,86	0,15	1,15	0,14

Destaca-se também que a concentração de ácido acético foi alta quando a produção de hidrogênio foi baixa. Contudo, quando o inverso ocorreu, a concentração de ácido acético não ultrapassou o valor de 50 mmol/L. Este fato se verificou tanto para o meio suplementado com fontes de carbono quando para o meio isento de suplementação com fontes de carbono. Assim, um estudo mais aprofundado da evolução deste ácido neste sistema fermentativo deve ser estudado para que um maior entendimento sobre o metabolismo das algas possa ser alcançado. Já a análise estatística destes dados demonstrou que nenhuma fonte de carbono é confundida com a outra. O gráfico da normal revela que os efeitos relevantes são os principais (citrato e permeado) e o secundário (acetato com citrato) conforme a Figura 5.2. Como já dito anteriormente, os valores que estão mais próximos do zero (citrato com permeado, acetato com permeado e acetato) são da mesma ordem de medida do erro, ou seja, não trazem efeitos significativos no experimento.

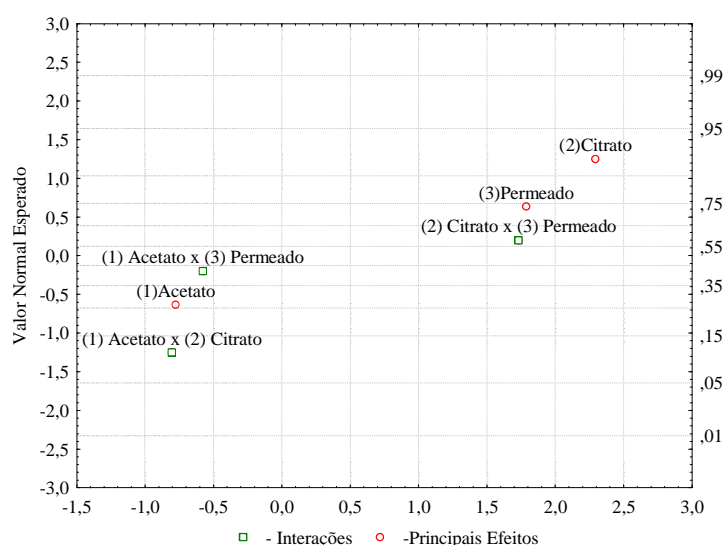


Figura 5.2- Análise dos efeitos (acetato, citrato, permeado e suas interações) para a produção de H₂.

Utilizando a análise de efeitos de um planejamento fatorial para determinar quais efeitos principais e secundários, obtidos da análise da Figura 5.2, influenciam realmente na produção de hidrogênio. A Tabela 5.15, apresentam-se as fontes de carbono analisadas que tiveram efeito significativo ($p < 0,10$) na produtividade de hidrogênio empregando a alga *Chlamydomonas reinhardtii*. No entanto, o acetato e suas interações com as demais variáveis apresentaram efeitos negativos, ou seja, concentrações maiores de acetato de sódio desfavorecem a produção de H₂. Assim foi obtida uma produtividade elevada quando a concentração de acetato correspondeu ao nível (-1). Isto confirma as afirmações de KOSOUROV *et al.* 2007, quanto a influência do acetato na produção de hidrogênio, porém este estudo demonstra que em pequenas quantidades e combinadas com outras fontes, há um aumento significativo na produtividade deste gás.

Tabela 5.15 -Estimativa dos efeitos na produtividade de H₂ por *Chlamydomonas reinhardtii*.

VARIÁVEIS	EFEITOS	ERRO	T(4)	P-VALOR
Média	496,43	97,68	4,97	0,007
(1) Acetato	-280,08	233,85	-1,19	0,297
(2) Citrato^(*)	828,55	233,85	3,54	0,023
(3) Permeado^(*)	645,67	233,85	2,76	0,050
(1) x (2)	-290,72	233,85	-1,24	0,281
(1) x (3)	-208,92	233,85	-0,89	0,422
(2) x (3)^(*)	625,40	233,85	2,67	0,055

^(*)Efeitos significativos ($p < 0,10$) para um nível de significância de 90%. $R^2=0,88$

Após realizar a análise dos efeitos, verificou-se através da Tabela 5.15 que os efeitos importantes são o citrato e permeado (principais) e citrato com permeado (secundário). Mesmo com não observância de reprodutibilidade entre as replicatas (pontos centrais do planejamento) em relação à produção de H₂, o que impossibilitou uma análise estatística mais elaborada, observou-se uma tendência em relação ao efeito do acetato, que sua presença em baixas quantidades é positiva. Ao passo que, quando a concentração das fontes de carbono (permeado e citrato) aumentou, sob uma baixa concentração de acetato, maiores produções de hidrogênio foram observadas.

5.7 Sistema híbrido

Tendo em vista a possibilidade de reaproveitar os resíduos provenientes da fermentação por algas, como o sobrenadante celular (rico em ácidos orgânicos), nas culturas de bactérias fotossintetizantes também produtoras de hidrogênio (BATISTA *et al.*, 2014), o sistema híbrido se torna, do ponto de vista econômico, um processo atrativo e viável.

5.7.1 Ensaio 1

Visto que os ensaios fornecendo o meio basal metabolizado das algas (sobrenadante) para as bactérias fotossintetizantes resultaram em uma pequena quantidade de hidrogênio e também de etanol, optou-se pela fortificação deste sobrenadante com ácido málico (30 mmol/L), permeado (6 g/L) e o glutamato (2,54 g/L), além dos nutrientes do meio RCV (ver Tabela 4.11), na tentativa de propiciar uma melhora no ambiente de fermentação da bactéria (OLIVEIRA, 2014).

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.16. Quando o sobrenadante fornecido pelas algas é suplementado com ácido málico, permeado, glutamato e os micronutrientes, uma melhora significativa na produção de hidrogênio (536,84 mmol/L) e também de etanol (395,46 mmol/L) é verificada. Como visto anteriormente, o meio basal com supressão total de enxofre, não resultou em quantidades significativas de hidrogênio a partir do uso de uma concentração celular de inóculo de 0,10 g/L.

Tabela 5.16 - Resultados do sistema híbrido para a concentração celular de inóculo de alga e bactéria de 0,10g/L e tempo de fermentação de 5 dias. No qual, (1) Ácido Lático; (2) Ácido Fórmico, (3) Ácido Acético; (4) Ácido Propiônico; (5) Ácido Butírico; (6) Etanol em mmol/L e (7) H₂ em μmol/L·d.

	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ⁽²⁾						
	(3)	(4)	(6)	(7)			
Controle	29,60	0,02	-	0,89			
Controle 1	30,65	0,01	-	ND ⁽¹⁾			
	<i>Sistema híbrido</i> ⁽³⁾ - <i>Rhodobacter capsulatus</i>						
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
Controle	1,83	0,22	42,95	10,76	-	273,70	5,03
Suplementado	66,08	4,48	72,89	74,53	26,97	395,46	536,84

ND⁽¹⁾ - Concentração de H₂ não detectado; *Chlamydomonas reinhardtii*⁽²⁾ - produtos do metabolismo das algas; Sistema híbrido⁽³⁾ - produtos do metabolismo das bactérias obtidos a partir do sobrenadante das algas.

KIM *et al.* (2006 b) também avaliaram a produção de hidrogênio por algas (*Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90) e bactérias (*Rhodobacter Sphaeroides* KD131) na qual as algas foram cultivadas em meio basal TAP isento de enxofre. No entanto os ácidos orgânicos provenientes deste efluente da fermentação das algas ainda tiveram suas concentrações ajustadas para 30 mmol/L isoladamente. Só então foram fornecidos para a *R. sphaeroides* KD131, a uma concentração celular de inóculo de 0,20 g/L. Os autores observaram a maior produção de hidrogênio (2,79 – 2,94 mL de H₂/mL de caldo) quando ácido láctico na concentração de 30 mmol/L foi adicionado ao meio de fermentação. Já o aumento da concentração de ácido acético (30 mmol/L) no meio fermentativo reduziu a produção do H₂. Os demais ácidos, como o butírico e o málico, nas concentrações ajustadas (30 mmol/L), propiciaram elevada produção de hidrogênio (1,94 e 2,41 mL de H₂/mL de caldo, respectivamente), conforme ilustrado no Tabela 5.17.

Tabela 5.17 -Comparação da produção de hidrogênio e etanol a partir de diferentes sistemas fermentativos.

COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DO SISTEMA HÍBRIDO OBTIDOS COM A LITERATURA						
Algas e Condições de cultivo		Componentes do meio de cultivo	Bactéria e Condições de cultivo	Produtividade de H₂ (mmol·H₂/L·h)	Etanol (g/L)	Referência
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> UTEX 90 em meio basal isento de enxofre		Ácido Lático (30 mmol/L); Ácido acético (30 mmol/L); Ácido Málico (30 mmol/L); Ácido Butírico (30 mmol/L)	<i>R. sphaeroides</i> KD131, concentração celular de inóculo de 0,20 g/L, 48 h de fermentação e 8 Klux (108 μEm ⁻² ·s ⁻¹)	320,14 – 337,35 146,87 – 164,08 276,54 222,61	- - - -	KIM <i>et al.</i> (2006 b)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> cc-124emmeio basal isento de enxofre		Ácido acético (31,30 mmol/L); Ácido propiônico (0,02 mmol/L)	<i>R. capsulatus</i> concentração, de inóculo de 0,10 g/L, 120 h de fermentação e 2,2 Klux (30 μEm ⁻² ·s ⁻¹)	5,38x10 ⁻³	12,57	Presente estudo
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> cc-124emmeio basal isento de enxofre	Acetato (1,21 mmol/L)	Ácido acético (36,84 mmol/L); Ácido propiônico (0,07 mmol/L); Etanol (324,44 mmol/L)	<i>R. capsulatus</i> concentração, de inóculo de 0,10 g/L, 120 h de fermentação e 2,2 Klux (30 μEm ⁻² ·s ⁻¹)	1,25 x10 ⁻³	16,13	
	Permeado (0,29 mmol/L)	Ácido acético (50,67 mmol/L); Ácido propiônico (0,06 mmol/L); Etanol (284,58 mmol/L)		2,47 x10 ⁻³	19,93	
	Acetato (1,21 mmol/L) e Permeado (0,29 mmol/L)	Ácido acético (58,28 mmol/L); Ácido propiônico (0,12 mmol/L); Etanol (324,44 mmol/L)		30,65 x10 ⁻³	17,17	

5.7.2 Ensaio 2

Ao se observar que as concentrações das fontes de carbono avaliadas anteriormente poderiam estar elevadas, novos experimentos foram executados, contudo para uma concentração máxima de acetato e permeado de 0,10 g/L.

O controle em meio TAP isento de enxofre como base de comparação foi também executado neste ensaio. Foi avaliado o desempenho de uma formulação em que o acetato de sódio e permeado de soro de leite estavam presentes no meio em termos da produção de H₂. Após o tempo de fermentação de 5 dias os ensaios foram encerrados e o sobrenadante resultante foi fornecido como meio para a bactéria, com as concentrações de ácidos orgânicos apresentados na Tabela 5.18.

Tabela 5.18 - Resultados do sistema híbrido com fontes de carbono (0,1g/L), concentração celular de alga e bactéria de 0,10g/L e fermentação de 5 dias. Onde (1) ácido acético, (2) ácido propiônico, (3) ácido fórmico, (4) etanol em mmol/L e (5) produtividade de H₂ em μmol/L·d.

<i>Fontes de Carbono</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ⁽²⁾				
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Controle	29,86	0,02	-	0,00	0,89
AC	36,84	0,07	-	209,29	ND ^(*)
PER	50,67	0,06	19,73	284,58	ND ^(*)
AC+PER	58,28	0,12	33,46	324,44	ND ^(*)
<i>Fontes de Carbono</i>	<i>Sistema híbrido</i> ⁽³⁾ - <i>Rhodobacter capsulatus</i>				
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Controle	38,70	4,87	-	222,73	3,38
AC	53,22	0,11	-	350,20	1,25
PER	67,88	0,64	1,01	432,80	2,47
AC+PER	48,26	0,44	0,05	372,75	30,65

ND⁽¹⁾ - Concentração de H₂ não detectado; *Chlamydomonas reinhardtii*⁽²⁾ - produtos do metabolismo das algas; Sistema híbrido⁽³⁾ - produtos do metabolismo das bactérias obtidos a partir do sobrenadante das algas.

Percebe-se que menores concentrações de fontes da carbono favoreceram a produção de etanol pelas algas, assim como para as batérias que passaram a produzir dois biocombustíveis, o etanol e o hidrogênio. Em relação aos ácidos orgânicos finais produzidos pela bactéria suas concentrações foram maiores que os fornecidos pelo sobrenadante da fermentação de algas, com exceção da combinação de acetato e permeado, na qual houve uma redução da concentração de ácido acetico (de 58,28 mmol/L para 48,26 mmol/L) fornecido. Além disso, o aumento da concentração de ácido propiônico (de 0,12 mmol/L para 0,44 mmol/L) e uma produção de hidrogênio significativa em relação aos ensaios híbridos anteriores (30,65 μmol·H₂/L·d) foram observados. Quanto ao etanol produzido, uma parte veio fornecido

pelas algas, e a bactéria contribuiu para o seu aumento. Para o controle (meio isento de enxofre sem suplementação) percebeu-se uma produção de etanol somente por parte da bactéria, haja visto, que o sobrenadante fornecido neste caso não continha etanol.

Por fim, uma investigação mais detalhada deve ser feita para que se possa determinar o real efeito do residual de enxofre no meio, além da influência de fontes adicionais de carbono para a intensificação da síntese de produtos como hidrogênio e etanol.

5.7.3 Ensaio 3

Inicialmente foram testadas duas fontes de carbono, o acetato de sódio e o permeado (rico em lactose) em uma concentração de 1 g/L. O meio basal empregado foi o TAP com supressão de enxofre. Em paralelo, manteve-se um controle somente em meio TAP isento de enxofre. Após passado o tempo de fermentação os ensaios foram encerrados e o sobrenadante foi fornecido como meio de cultivo para a *Rhodobacter capsulatus*. As concentrações dos produtos do metabolismo estão apresentadas na Tabela 5.19. De forma complementar, os produtos do metabolismo das bactérias obtidos a partir do sobrenadante das algas também estão apresentados.

Tabela 5.19 – Produtos obtidos a partir do uso de fontes de carbono (1g/L) suplementares. A concentração celular de 0,10 g/L para ambos micro-organismos (*Chlamydomonas reinhardtii* e *Rhodobacter capsulatus*).

<i>Fontes de Carbono</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ⁽²⁾			
	Ácido Acético (mmol/L)	Ácido Propiônico (mmol/L)	Etanol (mmol/L)	H ₂ (μmol/L·d)
Controle	31,30	0,02	-	1,20
Acetato de sódio	34,75	0,05	-	ND ⁽¹⁾
Permeado	31,63	0,04	-	ND ⁽¹⁾
<i>Fontes de Carbono</i>	<i>Sistema híbrido</i> ⁽³⁾ - <i>Rhodobacter capsulatus</i>			
	Ácido Acético (mmol/L)	Ácido Propiônico (mmol/L)	Etanol (mmol/L)	H ₂ (μmol/L·d)
Controle	68,04	0,02	272,89	5,38
Acetato de sódio	18,01	0,41	-	ND ⁽¹⁾
Permeado	15,86	0,25	-	ND ⁽¹⁾

ND⁽¹⁾ - Concentração de H₂ não detectado; *Chlamydomonas reinhardtii*⁽²⁾ - produtos do metabolismo das algas; Sistema híbrido⁽³⁾ - produtos do metabolismo das bactérias obtidos a partir do sobrenadante das algas.

Observa-se que o meio fornecido à bactéria continha concentrações de ácido acético e ácido propiônico, provenientes da primeira fermentação com as algas. Somente o controle (meio isento de enxofre sem suplementação) gerou hidrogênio, enquanto que nos demais não

foi possível a detecção deste produto. Nota-se que para o ensaio controle a bactéria produziu etanol e hidrogênio. Contudo, para os demais ensaios isso não se verificou, visto que a *Rhodobacter capsulatus* pode ter utilizado o ácido acético fornecido para o crescimento celular. Em contra partida, uma maior concentração final de ácido propiônico foi gerada, demonstrando que há uma necessidade de suplementação do sobrenadante fornecido.

Referências bibliográficas utilizando sistema híbrido com a alga *Chlamydomonas reinhardtii* e a bactéria *Rhodobacter capsulatus* para um sistema similar ao deste estudo não foram encontradas. As referências pesquisadas utilizaram outros sistemas com a alga *Chlamydomonas reinhardtii* e outros micro-organismos. Este trabalho enfatiza a potencialidade da alga produzir etanol na presença de baixas concentrações de fontes de carbono adicionais. Assim como a bactéria quando lhe fornecida sobrenadante do controle. Pois os testes preliminares resultaram na produção de etanol em quantidades consideráveis quando comparadas a produtividade com lêvedo.

5.8 Co-cultura de *Chlamydomonas reinhardtii* e a *Rhodobacter capsulatus*

Para se estabelecer a co-cultura das algas e bactérias, os meios basais TAP com supressão de enxofre e RCV foram empregados. Inicialmente os experimentos foram executados utilizando o meio RCV (meio basal das bactérias purpuras não sulfurosas). A concentração celular de inóculo utilizada para ambos os indivíduos micro-organismos foi de 0,10 g/L, sendo a idade de inóculo de 10 dias e o tempo de fermentação de 5 dias. As proporções entre algas e bactérias na co-cultura estão mostrados na Tabela 5.20.

Analisando os resultados desta Tabela, à medida que a concentração de bactérias diminui, visualiza-se uma redução na produção de hidrogênio. É importante destacar que a alga em meio RCV gerou quantidades de hidrogênio maiores que no meio basal TAP com supressão de enxofre, mostrado nos ensaios anteriores. Ao manter a co-cultura em fermentação no meio RCV, observa-se a concentração de outro ácido orgânico, o ácido lático. A produção deste ácido por parte das algas no meio TAP só ocorreu quando houve a adição de produtos ricos em lactose.

A concentração de ácido acético, em geral, apresentou uma redução do seu teor no meio quando se observou a produção de hidrogênio pelas algas. Isso se verificou também na condição de a co-cultura, porém com menores teores. As concentrações de ácido propiônico e etanol apresentaram níveis altos, quando as culturas isoladas foram executadas [*C.* (0%) e *R.* (100%); *C.* (100%) e *R.* (0%)]. Não detectou concentrações de ácido butírico nas condições

avaliadas. Surpreendentemente, mantendo-se a alga em meio RCV, a produção de hidrogênio e etanol foi observada simultaneamente.

Tabela 5.20- Produtos do metabolismo da co-cultura mantida em meio RCV, onde (1) Produtividade H₂ (μmol/L·d), (2) Ácido Lático, (3) Ácido Acético, (4) Ácido Propiônico, (5) Ácido Butírico, (6) Etanol em mmol/L.

Experimento Meio RCV	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
C. (0%) R. (100%)	26,14	6,36	9,59	7,28	-	195,31
C. (10%) R. (90%)	-	1,67	24,54	2,73	-	-
C. (30%) R. (70%)	12,92	0,83	7,64	-	-	17,11
C. (50%) R. (50%)	0,00	3,47	5,41	-	-	-
C. (70%) R. (30%)	3,52	4,52	6,11	-	-	-
C. (90%) R. (10%)	-	8,71	15,50	4,39	-	-
C. (100%) R. (0%)	7,41	2,99	42,96	12,35	-	273,69

A mesma análise foi realizada para a co-cultura mantida em meio TAP isento de enxofre (meio basal das algas). Os resultados estão apresentados na Tabela 5.21. Não houve uma boa receptividade por parte da bactéria quando cultivada em meio TAP. Para o hidrogênio, na condição de C. (0%) e R. (100%) a bactéria atingiu uma produtividade de até 0,10 μmol·H₂/L d. Por outro lado, há um aumento na produção de H₂ na condição de C. (10%) e R. (90%). Isto sugere uma contribuição mútua dos indivíduos na síntese do produto-alvo (1,09 μmol·H₂/L·d). Na condição de C. (90%) e R. (10%), há uma melhora significativa na produção de H₂ (3,40 μmol/L·d). Já é sabido, contudo que para esta concentração celular (0,10 g/L) de *Chlamydomonas reinhardtii* em meio basal isento de enxofre a produção é muito reduzida, sendo quase nula. Entretanto, uma combinação de uma pequena quantidade de bactérias (10%) para um maior percentual de algas (90%) incrementou a produção de hidrogênio, fato que precisa ser melhor investigado.

Tabela 5.21 - Produtos do metabolismo da co-cultura mantida em meio TAP. Na qual (1) Produtividade H₂ (μmol/L·d), (2) Ácido Lático, (3) Ácido Acético, (4) Ácido Propiônico, (5) Ácido Butírico, (6) Etanol em mmol/L.

Experimento Meio TAP	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
C. (0%) R. (100%)	0,10	-	57,51	-	-	-
C. (10%) R. (90%)	1,09	0,10	56,88	0,15	-	1,75
C. (30%) R. (70%)	-	-	82,28	0,60	-	5,48
C. (50%) R. (50%)	0,69	2,99	62,09	12,35	-	4,82
C. (70%) R. (30%)	-	-	60,59	0,33	-	-
C. (90%) R. (10%)	3,40	2,93	39,52	0,09	-	2,67
C. (100%) R. (0%)	-	-	51,47	0,02	-	1,95

Com relação aos ácidos orgânicos, observou-se que a concentração de ácido láctico foi verificada somente para as condições de co-cultura *C.* (10%) *R.* (90%) 0,10 mmol/L, *C.* (50%) *R.* (50%) 2,99 mmol/L e *C.* (90%) *R.* (10%) 2,93 mmol/L. Entretanto, tal desempenho não apresentou uma relação coerente. No caso da concentração de ácido acético, quando algas e bactérias estavam presentes, a produção deste metabólito foi alta, com exceção da combinação *C.* (90%) *R.* (10%). Isto sugere que uma contribuição maior por parte da bactéria na síntese deste ácido. Já a concentração de ácido propiônico teve um pico considerável quando a proporção de micro-organismos permaneceu constante. Contudo, manteve-se baixas concentrações no meio, porém mais altas do que as observadas quando somente as algas estavam presentes. Novamente, a concentração de ácido butírico não foi observada e o etanol apareceu em pequenas quantidades em todos os casos avaliados.

Assim como o sistema híbrido, este tema ainda é pouco debatido. Há necessidade de maiores estudos sobre o assunto. Este trabalho ressalta a importância de investigar a co-cultura assim como o sistema híbrido. Já que a co-cultura apresentou resultados significativos na produção de ambos os produtos de forma simultânea.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados analisados conclui-se que a idade de inóculo de 10 dias e a concentração celular de inóculo de 0,20 g/L, a partir do uso de meio com supressão de enxofre, potencializaram a produção de hidrogênio. Quanto ao tempo de fermentação, a execução dos experimentos mostrou que 5 dias favorecem a síntese deste biocombustível. Nestas condições a maior produtividade obtida foi de 1,59 $\mu\text{mol}\cdot\text{H}_2/\text{L}\cdot\text{d}$. De forma complementar, a maior produção de etanol (418,10 mmol/L) foi observada para uma concentração celular de inóculo de 0,05 g/L.

No que diz respeito ao teor de enxofre presente no meio basal, identificou-se que ambas as concentrações de inóculo (0,10 e 0,20 g/L) favoreceram a produção de hidrogênio. Para uma concentração celular de inóculo de 0,10 g/L, o teor residual de enxofre que proporcionou uma maior produção de H_2 (2,09 $\mu\text{mol}/\text{L}\cdot\text{d}$) foi a de 10 mg de SO_4^{2-} . Enquanto que para uma concentração celular de inóculo de 0,20 g/L o teor que resultou em maior produção foi o de 25 mg de SO_4^{2-} (2,14 $\mu\text{mol}\cdot\text{H}_2/\text{L}\cdot\text{d}$). Portanto pode-se comprovar que para um meio totalmente ausente de enxofre houve a necessidade de uma concentração celular maior nos experimentos.

Com relação à temperatura, concluiu-se que o aumento deste parâmetro afetou o processo de forma negativa. Nesta etapa do trabalho verificou-se ainda que uma produção expressiva de etanol podem ocorrer quando uma concentração celular de inóculo de 0,10 g/L, em um meio com 16 mg de SO_4^{2-} à uma temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$ (29,68 $\mu\text{mol}/\text{L}\cdot\text{d}$) é empregada.

Já a análise da influência das fontes de carbono no sistema mostrou que o aumento destas variáveis isoladamente não incrementou a produção de hidrogênio. Entretanto aumentou a produção de etanol em até 324 mmol/L, observadas baixas concentrações de acetato de sódio e permeado foram de 0,10 g/L.

O planejamento fatorial (II), mostrou que o citrato e o permeado influenciam de forma direta a produção de hidrogênio (1975,10 $\mu\text{mol}/\text{L}\cdot\text{d}$), principalmente quando o acetato apareceu em menores concentrações (0,10 g/L). Em altas concentrações (1,9 g/L), o acetato influenciou de forma negativa.

Em relação ao sistema híbrido, concluiu-se que as fontes de carbono (1 g/L) adicionadas isoladamente não influenciaram diretamente na produção de hidrogênio. Contudo, as fontes de carbono em pequenas quantidades (0,10 g/L), fizeram com que a alga produzisse mais etanol. Por outro lado, no sistema híbrido as bactérias produziram acentuadamente

hidrogênio e etanol, sendo respectivamente $30,65 \mu\text{mol}\cdot\text{H}_2/\text{L}\cdot\text{d}$ e $432,80 \text{ mmol/L}$. Além disso, observou-se que o controle produziu somente hidrogênio, nas algas, e quando analisadas as culturas de bactérias, o controle produziu alta concentração final de etanol. Já quando o sobrenadante suplementado com ácido málico (30 mmol/L), permeado (6 g/L) e o glutamato ($2,54 \text{ g/L}$) foi fornecido às bactérias, obteve-se uma maior produção de hidrogênio ($536,84 \mu\text{mol/L}\cdot\text{d}$), simultaneamente, com uma alta produção de etanol ($395,46 \text{ mmol/L}$).

Por fim, na co-cultura observou-se que no meio RCV a alga apresentou um bom desempenho para a produção de etanol ($273,69 \text{ mmol/L}$) simultaneamente a síntese de hidrogênio ($7,41 \mu\text{mol/L}\cdot\text{d}$). Ainda nesta condição, a maior produtividade em H_2 observada foi de $12,92 \mu\text{mol/L}\cdot\text{d}$, em meio RCV sem suplementação. Já a co-cultura, fazendo uso do meio basal TAP, não resultou em produção relevante dos biocombustíveis em questão.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se inicialmente como trabalho futuro uma análise mais aprofundada do efeito da influência do pH na produção dos biocombustíveis. Usualmente utiliza-se um pH médio de $7 \pm 0,10$, mas há relatos na literatura de que outras algas verdes unicelulares como a *Chlorella* e *Spirulina* requerem pH alcalinos, em torno de 10, para que haja o crescimento da biomassa (KOTHARI *et al.*, 2012). Neste contexto, a identificação de uma faixa de pH pode ser investigada em relação a produção de H_2 . Além de fornecer outras informações com relação ao comportamento metabólico das algas para a síntese de inúmeros produtos do metabolismo.

A avaliação do efeito de nutrientes como fosfato e traços de metais para a produção de H_2 é recomendada. Alguns poucos estudos mostraram que o fosfato influencia positivamente na produção de hidrogênio (SUALI e SARBATLY, 2012). Enquanto que os traços de metais (ver Tabela 3.3) podem influenciar diretamente na atividade da enzima responsável pela evolução do hidrogênio através do sistema fermentativo no qual algas verdes são utilizadas. Uma vez que é sabido que alguns destes metais, como o ferro, tem a função de cofator na ativação de enzimas ([FeFe]-hidrogenase).

Reavaliar o sistema híbrido e co-cultura utilizado meio de fermentação com concentrações de enxofre de 10 mg de SO_4^{2-} e os melhores resultados do planejamento fatorial 2^3 com fontes de carbono.

Por fim, sugere-se ainda como atividade futura a avaliação da adição de outras fontes de carbono que possam potencializar a síntese isolada ou simultânea dos biocombustíveis avaliados neste estudo. Além da investigação de outras configurações de sistemas fermentativos como reatores de coluna de bolhas ou tanque agitado.

REFERÊNCIAS

- AKKERMAN, I.; JANSSEN, M.; ROCHA, J.; WIJFFELS, R. H. Photo biological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. *International Journal Hydrogen Energy*, v. 27, p. 1195-1208, 2002.
- AMIN, S. Review on biofuel and gas production process from microalgae. *Energy Conversion an Mangement, Indonesia*, p. 1834-1840, 2009.
- AMORIN, E. L. Efeito na concentração de glicose e da alcalinidade na produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leito fluidificado, *Dissertação de Doutorado, São Carlos*, 2009, 135 p.
- AMROUCHE, D. A., ABDI, N., LOUNICI, H.; MAMERI, N. Effect of physic-chemical parameters on biohydrogen production and growth characteristics by batch culture of *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6. *Applied Energy*, v. 88, p. 2013-2135, 2011.
- ANDERSEN, R. A., *Algal culturing techniques* (Ed), London Elsevier Academic Press, 2005, 578 p.
- BALAT, M. Possible methods for hydrogen production. *Energy Source*, v. 21, p. 39-50, 2009.
- BARBOSA, M. J.; ROCHA, J. M.; TRAMPER, J.; WIJFFELS, R. H. Acetate as a Carbon Source for Hydrogen Production by Photosynthetic Bacteria. *Journal of Biotechnology*, v. 85, p. 25–33, 2001.
- BATISTA, A. P.; MOURA, P.; MARQUES, P. A.; ORTIGUEIRA, J.; ALVES, L.; GOUVEIA, L. *Scenedesmus obliquus* as feedstock for biohydrogen production by *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. *Fuel*, v. 117, p.537-543, 2014.
- BENEMANN, J. R.; MIYAMOTO, K.; HALLENBECK, P. C. Bioengineering aspects of biophotolysis. *Enzyme Microbial Technology*, v. 2, p. 103–111, 1980.
- BRUNSTEIN, I.; TOMIYA, E. H.; *Modelo econômico de empresa sucroalcooleira*, Scielo Brasil, v. 2, 1995.
- ÇAKMAK, Z. E.; ÖLMEZ, T. T.; ÇAKMAK, T.; MENEMEM, Y.; TEKINAY, T. Induction of triacylglycerol production in *Chlamydomonas reinhardtii*: Comparative analysis of different element regimes. *Bioresour Technol*, v. 155, p. 379-387, 2014.
- CHEN, H.; MELIS, A. Marker-free genetic engineering of the chloroplast in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnology Journal*, v. 11, p. 818-828, 2013.
- CHEN, H.; NEWTON, A.; MELIS, A. Role of SulP, a nuclear-encoded chloroplast sulfate permease, in sulfate transport and H₂ evolution in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthese*, v. 4, p. 289–296, 2005.
- CHOCHOIS, V.; DAUVILLE, D.; BEYLY, A.; TOLLEER, D.; CUINE, S.; TIMPANO, H.; PELTRIER, G. Hydrogen production in *Chlamydomonas*: photosystem II-dependent and-

independent pathways differ in their requirement for starch metabolism. *Plant Physiology*, v. 151, p. 631-640, 2009.

CHOI, S. P.; NGUYEN, M. T.; SIM, S. J. Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. *Bioresource Technology*. v. 101, p. 5330-5336, 2010.

CLESCERI, L. S.; EATON, A. D.; GREENBERG, A. E. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. ed. 20th. American Public Health Association, D.C, 1998, 1220 p.

DAS, D.; VEZIROGLU, N. T. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal Hydrogen Energy*, v. 26, p. 13-28, 2001.

DASGUPTA, C. N.; GILBERT, J. J.; LIMDBLAD, P.; HEIDORN, T.; BORGVANG, S. A.; SKJANES, K.; DAS, D. Recent trends on the development of photo biological processes and photo bioreactors for the improvement of hydrogen production. *Internacional Jornal of Hydrogen Energy*, v. 35, p.10218-10238, 2010.

ETE, EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA, Balanço Energético Nacional 2013: Ano base 2012. Rio de Janeiro-RJ: EPE, 2013.

GHIRARDI, M.; ZHANG, L.; LEE, J. W.; FLYNN, T.; SEIBERT, M.; GREENBAUM, E. Microalgae: a green source of renewable hydrogen. *Trends Biotechnology*, v. 18, p. 506-511, 2000.

GODDE, D.; TREBST, A. NADH as electron donor for the photosynthetic membrane of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Arch Microbiology Journal*, v. 127, p. 245-252, 1980.

HALLEMBECK, P. C.; GHOSH, D. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends Biotechnology Journal*, v. 27, p. 287-297, 2009.

HALLENBECK, P.; BENEMANN, J. R. Biological hydrogen production, fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 27, p. 1185-1193, 2002.

HAPPE, T.; KAMINSKI, A. Differential regulation of the Fe-hydrogenase during anaerobic adaptation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *European Biochemical Journal*, v. 269, p. 1022-1032, 2002.

JACOBS-LOPES, E. Sequestro de dióxido de carbono em fotobiorreatores. Campinas, 2007.

KAWAGUCHI, H.; HASHIMOTO, K.; HIRATA, K.; MIYAMOTO, K. Hydrogen production from algal biomass by a mixed culture of *Rhodobium marinum* A-501 and *Lactobacillus amylovorus*. *Journal Bioscience Bioengineering*, v. 91, p. 277-282, 2001.

KHATTAK, W. A.; UI-ISLAM, M.; ULLAH, M. W.; YU, B. KHAN, S.; PARK, J. K. Yeast cell-free enzyme system for bio-ethanol production at elevated temperatures. *Process Biochemistry*. v. 49, p. 357-364, 2014.

KIM, J. P.; KANG, C. D.; PARK, T. H.; KIM, M. S.; SIM, S. J.. Enhanced hydrogen production by controlling light intensity in the sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* culture. International Journal of Hydrogen Energy, v. 31, p. 1585-1590, 2006 a.

KIM, M.S.; BAEK, J. S.; YUN, Y. S.; SIM, S. J.; PARK, S. KIM, S. C.. Hydrogen production from *Chlamydomonas reinhardtii* biomass using a two-step conversion process: Anaerobic conversion and photosynthetic fermentation. International Journal of Hydrogen Energy, v. 31, p. 812-816, 2006 b.

KOSOUROV, S.; PATRUSHEVA, E.; GHIRARDI, M. L.; SEIBERT, M.; TSYGANKOV, A. A comparison of hydrogen photo production by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under different growth conditions. Journal of Biotechnology, v. 128, p. 776-787, 2007.

KOSOUROV, S.; SEIBERT, M. Hydrogen production by nutrient-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells immobilized within thin alginate films under aerobic and anaerobic conditions. Biotechnology Bioengineering, v. 102, p. 50–58, 2008.

KOSOUROV, S.; SEIBET, M.; GHIRARDI, M. L. Effects of extra cellular pH on the metabolic pathways in the sulfur-deprived H₂ producing *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. Plants Cell Physiology, v. 44, p. 146-155, 2003.

KOTHARI, R.; SINGH, D.; TYAGI, V. V.; TYAGI, S. K. Fermentative hydrogen production –An alternative clean energy source. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 16, p. 2337-2346, 2012.

KOTYK, Anorst. Zrak získany z ras. 2008, Disponível em: <<http://www.veda.cz/aeticle.do?articleId=26215>>. Acesso em: 24 de Maio de 2014.

LAURINAVICHENE, T. V.; FEDOROV, A. S.; GHIRARDI, M. L.; SEIBERT, M.; TSYGANKOV, A. A. Demonstration of sustained hydrogen photo production by immobilized, sulfur –deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells. International Journal of Hydrogen Energy, v. 31, p. 659-667, 2006.

LEHR, F.; MORWEISER, M.; SASTRE, R. R.; KRUSE, O.; POSTEN, C. Process development for hydrogen production with *Chlamydomonas renhardtii* based on growth and product formation kinetics. Journal of Biotechnology, v. 162, p. 89-96, 2012.

LEVIN, D. B.; PITT, L.; LOVE, M. Bio hydrogen production: prospects and limitations to practical application. International Journal Energy, v. 29, p. 173-185, 2004.

LI, X.; HUANG, S.; YU, J.; WANG, Q.; WU, S. Improvement of hydrogen of *Chlamydomonas reinhardtii* by co-cultivation with isolated bacteria. International Journal of Hydrogen Energy. v. 38, p. 10779-10787, 2013.

LIBESSART, N; MADDELEIN, M. L.; KOORNHUYSE, N.; DECQ, A.; DELRUE, B.; MOUILLE, G.; D'HULST, C.; BALL. S. Storage, photosynthesis and growth: the conditional nature of mutations affecting starch synthesis and structure in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Cell, v. 7, p. 1117-1127, 1995.

MADAMWAR, D.; GARG, N.; SHAH, V. Cyanobacterial hydrogen production. *World Journal Microbial Biotechnology*, v.16, p. 757-767, 2000.

MCKINLAY, J. B.; HARWOOD, C. S. Photo biological production of hydrogen gas as a biofuel. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 21, p. 244-251, 2010.

MELIS, A. Green alga hydrogen production: progress, challenges and prospects. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 27, p. 1217-1228, 2002.

MELIS, A. Photosynthetic H₂ metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant*, v. 226, p. 1075-1086, 2007.

MELIS, A.; HAPPE, T. Hydrogen production. *Green Algae as a source of energy*. *Plant Physiology*, v. 127, p. 3740-3748, 2001.

MELIS, A.; XHANG, L. P.; FORESTIER, M.; GHIRARLDI, M. L.; SEIBERT, M. Sustained photo biological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant physiology*, v. 122, p. 127-135, 2000.

MERCHANT, S. S.; PROCHNIK, S. E.; VALLON, O. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, v. 318, p. 245-250, 2007.

MERCHANT, S.; ALLEN, M. D.; KROPAT, J.; MOSELEY, J. L.; LONG, J. C.; TOTTEY, S.; TERAUCHI, A. M. Between a rock and a hard place: trace element nutrition in *Chlamydomonas*. *Atca Biochemical et Biophysical*, v. 1763, p. 578-594, 2006.

MIURA, Y. Hydrogen production by bio photolysis based on microalgae photosynthesis. *Process Biochemistry*, v. 30, p. 1-7, 1995.

MOLINA GRIMA, E.; ACIEN FERNANDEZ, F. G. C.; CHISTI, Y. Photo bioreactors: light regime, mass transfer, and scale up. *Journal of biotechnology*, v. 70, p. 231-247, 1999.

MUS, F.; DUBINI, A.; SEIBERT, M.; POSEWITZ, M. C.; GROSSMAN, A. R. Anaerobic Acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*: anoxic gene expression, hydrogenase induction, and metabolic pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 282, p. 25475-25486, 2007.

OHTA, S.; MIYAMOTO, K.; MUIRA, Y. Hydrogen evolution as a consumption mode of reducing equivalents in green algal fermentation. *Plant Physiology*. v. 83, p. 1022-1026. 1987.

OLIVEIRA, T. V. Avaliação da produção de hidrogênio empregando bactérias fotossintetizantes. 2014. 92 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2014.

PHILIPPS, G.; KRAWIETZ, D.; HEMSCHMEIER, A.; HAPPE, T. A pyruvate formate lyase-deficient *Chlamydomonas reinhardtii* strain provides evidence for a link between fermentation and hydrogen production in green algae. *The Plant Journal*, v. 66, p. 330-340, 2011.

SANTOS, F. M. O combustível "Hidrogênio". *Revista Milênio*, v. 31, p. 252-270, 2005.

SMITH, G. D.; EWART, G. D.; TUCKER, W. Hydrogen production by cyanobacteria. *International Journal Hydrogen Energy*, v. 17, p. 695–708, 1992.

STUART, T.; GAFFRON, H. The mechanism of hydrogen photo production by several algae: II. The contribution of photosystem II. *Plant*, v. 106, p. 101-112, 1972.

SUALI, E.; SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, p. 4316-4342, 2012.

TAMBURIC, B.; ZEMICHAEL, F. W.; MAITLAND, G. C.; HELLGARDT, K. Parameters affecting the growth and hydrogen production of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal Hydrogen Energy*, v. 36, p. 7872-7876, 2011.

TAYGANKOV, A. A.; BORODIN, V. B.; RAO, K. K.; HALL, D. H photo production by batch culture of *Anabaena* variables ATCC 28413 and its mutant PK84 in a photo bioreactor. *Biotechnology Bioengineering*, v. 64, p. 709-715, 1999.

TCHOBANOGLIOUS, G.; BURTON, F. L.; METCALF, D. H.; EDDY, A. *Wastewater Engineering: Treatment and reuse*. McGraw Hill. 2003.

TEVATIA, R.; DEMIREL, Y.; BLUM, P. Kinetic modeling of photoautotrophic growth and neutral lipid accumulation in terms of ammonium concentration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bioresource Technology*, p. 419-424, 2012.

TSYGANKOV, A. A.; KOSOUROV, N. S.; TOLSTYGINA, I. V.; GHIRARDI, M. L.; SEIBERT, M.. Hydrogen production by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under photoautotrophic conditions, v. 31, p. 1574 – 1584, 2006.

TSYGANKOV, A.; KOSOUROV, S.; SEIBERT, M.; GHIRARDI, M. L. Hydrogen photo production under continue illumination by sulfur-deprived, *synchronous Chlamydomonas reinhardtii* cultures. *International Journal Hydrogen Energy*, v. 27, p. 1239-1244, 2002.

WEAVER, P. F.; WALL, J. D.; GEST, H. Characterization of *Rhodospseudomonas capsulate*. *Archives of Microbiology*, v. 105, p. 207-216, 1975.

WU, S.; LI, X.; YU, J.; WANG, Q. Increased hydrogen production in co-culture of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Bradyrhizobium japonicum*. *Bioresource Technology*, v. 123, p.184-188, 2012.

WYKOFF, D.; DAVIES, J. P.; GROSSMAN, A. R. The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, v. 117, p. 129-139, 1998.

YANG, D.; ZHANG, Y.; BARUPAL, D. K.; FAN, X.; GUSTAFSON, R.; GUO, R.; FIEHN, O.. Metabolomics of photo biological hydrogen production induced by CCCP in *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of hydrogen Energy*, v. 39, p. 150-158, 2014.