



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



Produção de biohidrogênio por *Rhodobacter capsulatus* utilizando como substrato o efluente da fermentação escura



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



Produção de biohidrogênio por *Rhodobacter capsulatus* utilizando como substrato o efluente da fermentação escura

Felipe Thalles Moreira Silva

Orientadora: **Profª. Drª. Vicelma Luiz Cardoso**

Dissertação submetida 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.

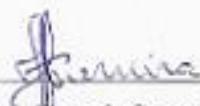
Uberlândia – MG
2015

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 24 DE FEVEREIRO DE 2015.

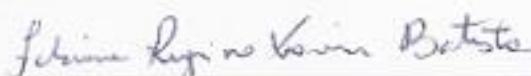
BANCA EXAMINADORA



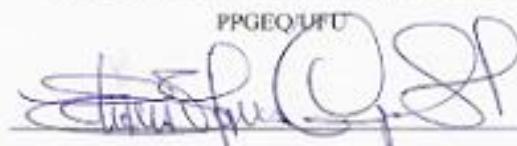
Prof. Dr^a. Vicelma Luiz Cardoso
Orientador (PPGEQ/UFU)



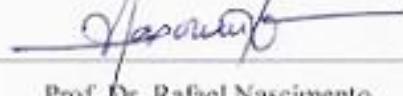
Prof. Dr^a. Juliana de Souza Ferreira
PPGEQ/UFU



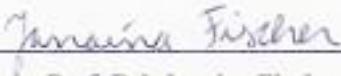
Prof. Dr^a. Fabiana Regina Xavier Batista



Prof. Dr^a. Eliana Flávia Camporese Sérvelo
EQ/UFRJ



Prof. Dr. Rafael Nascimento
INGEB/UFU



Prof. Dr^a. Janaina Fischer
UFU

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade e por ter me abençoado a vencer mais uma batalha. Agradeço a Deus mais ainda pelas pessoas tão importantes que ele colocou no meu caminho durante esta trajetória.

Aos meus pais Anísio e Claudia por serem meus pilares, minha vida, pela confiança, paciência, amor e incentivo incondicional. Por me proporcionarem meios de permanência nesta estrada. Ao Vítor e Isabella, meus irmãos, que tanto amo, pela compreensão e carinho!

Aos meus familiares e amigos, pela paciência, compreensão e por inúmeras vezes ter me ausentado.

A minha orientadora, Vicelma Luiz Cardoso, pela confiança, pela disposição, paciência, dedicação, exemplo de humanismo, ensinamentos transmitidos, por estar sempre presente e disposta a me ajudar. O meu muito obrigado!

Gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos a Profª. Juliana de Souza Ferreira pelo apoio, disponibilidade, dedicação, ensinamento e acima de tudo uma enorme paciência.

À Profª. Fabiana Regina Xavier Batista pela ajuda, apoio e incentivo.

A Doutora Betânia Romão a qual possuo grande admiração. Obrigado por todos os ensinamentos, pela paciência, amizade, por estar sempre disposta a me ajudar.

Aos meus colegas de laboratório pela ajuda, companheirismo e agradável convívio que me proporcionaram grandes amizades, que nunca serão esquecidos. Em especial, Mariana, Janaína, Natália, Carla, Marcela, Magno, Bruna, Maria Inês, Taciana, Verônica, Wesley.

Em especial gostaria de agradecer pela amizade tão sincera, aos conselhos e companheirismo, ao Paulo Augusto e Davi Junior que são meus irmãos e que abriram as portas para que eu pudesse vir a Uberlândia.

Aos meus amigos de estudos, farras, de momentos únicos em minha vida, grandes irmãos que foram essenciais durante essa jornada, a Mariana, Fernando e Fabíola.

Ao órgão de fomento CNPq pelo apoio financeiro.

À Vale S.A. pela concessão de recursos financeiros proporcionando meios de realizar um trabalho tão interessante.

Enfim, a todos que colaboraram para o bom desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	V
LISTA DE QUADROS	VI
SIMBOLOGIA E ABREVIATURAS.....	VII
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2	3
OBJETIVOS.....	3
2. OBJETIVO GERAL.....	3
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
CAPÍTULO 3	4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3 Panorama Energético Mundial	4
3.1 Consequências da queima de combustíveis fósseis	6
3.2 Nova perspectiva: Hidrogênio	6
3.3 Produção biológica do gás hidrogênio	8
3.3.1 Processos Fotossintéticos	10
3.3.1.1 Biofotólisedireta da água	10
3.3.1.2 Biofotólise indireta	11
3.3.2 Produção de hidrogênio por bactérias fotossintetizantes.....	12
3.3.2.1 Parâmetros que influenciam a produção de H ₂ por fotofermentação	14
3.3.2.2 Relação Carbono/Nitrogênio (C/N).....	16
3.3.3 Produção de hidrogênio a partir da fermentação escura	17
3.3.3.1 Parâmetros operacionais relevantes para a produção H ₂ por fermentação escura.....	19
3.3.3.1.1 Influência do pH	19
3.3.3.1.2 Influência da temperatura	20
3.3.3.1.3 Influência do inóculo (culturas puras ou mistas).....	20
3.3.3.1.4 Influência da composição do meio de fermentação.....	21
3.4 Enzimas envolvidas na produção biológica de H ₂	22
3.4.1 Nitrogenases.....	22
3.4.2 Hydrogenases.....	23
3.5 Processo Híbrido	23
CAPÍTULO 4	26
MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Materiais.....	26
4.1.1 Micro-organismos.....	26

4.2 Meios de cultura	27
4.3 Condição dos ensaios preliminares da fotofermentação.....	28
4.4 Condição dos ensaios no biorreator.....	31
4.5 Metodologia Analítica	34
4.5.1 Determinação da concentração celular	34
4.5.2 Análises cromatográficas.....	35
4.5.2.1 Determinação de Ácidos Orgânicos e Açúcares – Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	35
4.5.2.2 Determinação do Gás Hidrogênio - Cromatografia Gasosa (GC).....	36
4.5.3 Carbono Orgânico Total – TOC e Nitrogênio Total - NT	36
CAPÍTULO 5	37
RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Ensaios em Escala Reduzida: Biorreator de 50 mL	37
5.2 Ensaios em Escala Ampliada: Biorreator de 1,5 L.....	44
CAPÍTULO 6	86
CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	86
6.1 CONCLUSÕES	86
6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	87
CAPÍTULO 7	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
Apêndice A	96
Curva de calibração para quantificação celular	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 Oferta Interna de Energia no Brasil – OIE (%).....	5
Figura 3.2 Esquema da Biofotólise direta	11
Figura 3.3 Esquema da biofotólise indireta realizada pelas cianobactérias	12
Figura 3.4 Esquema da Fotodecomposição	13
Figura 3.5 Células de <i>R. capsulatus</i> , em vista microscópica.....	15
Figura 3.6 - Esquema de produção de hidrogênio	18
Figura 3.7 Esquema do processo combinando fermentação escura e fotofermentação	25
Figura 4.1 Inóculo em meio líquido da cepa <i>R. capsulatus</i>	27
Figura 4.2 Fermentações em batelada utilizando seringas para a cepa	29
Figura 4.3 Fluxograma da produção de H ₂ por fotofermentação em escala reduzida.....	30
Figura 4.4 Diferentes vistas do biorreator com fotoperíodo usado nos ensaios de fotofermentação por <i>Rhodobacter capsulatus</i>	32
Figura 4.5 Biorreator utilizado para fotofermentação	32
Figura 4.6 Fluxograma da produção de H ₂ por fotofermentação em escala ampliada.....	34
Figura 5.1 Hidrogênio acumulado (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> . Concentração inicial de lactose de 10 g/L, temperatura de 35 ± 3 °C.	45
Figura 5.2 Perfil da concentração celular (■), volume de biogás (◊), produtividade volumétrica (○) e específica (Δ) e consumo de lactose (*), em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> . Concentração inicial de lactose de 10 g/L, temperatura de 35 ± 3 °C.	46
Figura 5.3 Perfil da concentração de ácido fórmico (●), etanol (►), ácido acético (Δ), ácido propionico (*), ácido butírico (◊) e ácido láctico (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> . Concentração inicial de lactose de 10 g/L, temperatura de 38 ± 2 °C.	47
Figura 5.4 Perfil da razão C/N (○) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> . Concentração inicial de lactose de 10 g/L, temperatura de 38 ± 2 °C.	47
Figura 5.5 Hidrogênio acumulado (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> . Concentração inicial de lactose de 10 g/L, com adição de 5,95 g/L de lactose às 31h de fermentação, temperatura de 35 ± 3°C.....	49
Figura 5.6 Perfil da concentração celular (■), volume de biogás (◊), produtividade volumetria (○) e específica (Δ) e consumo de lactose (*) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> . Concentração inicial de lactose de 10 g/L, com adição de 5,95 g/L de lactose às 31h de fermentação, temperatura de 35 ± 3°C.	50
Figura 5.7 Perfil da concentração de ácido fórmico (●), etanol (►), ácido acético (Δ), ácido propiônico (*), ácido butírico (◊) e ácido láctico (■) em função de tempo no ensaio de	

fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> . Concentração inicial de lactose de 10 g/L, com adição de 5,95 g/L de lactose às 31h de fermentação, temperatura de 35 ± 3°C.....	51
Figura 5.8 Variação da razão C/N (○) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> . Concentração inicial de lactose de 10 g/L, com adição de 5,95 g/L de lactose às 31h de fermentação, temperatura de 35 ± 3°C.....	51
Figura 5.9 Hidrogênio acumulado (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> . Concentração inicial de lactose de 10 g/L, com adição de 7,35 g/L de glicose às 19 h de fermentação, temperatura de 35 ± 3°C.....	53
Figura 5.10 Perfil da concentração celular (■), volume de biogás (◊), produtividade volumetria (○) e específica (Δ) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> . Concentração inicial de lactose de 10 g/L, com adição de 7,35 g/L de glicose às 19 h de fermentação, temperatura de 35 ± 3°C.	54
Figura 5.11 Perfil da concentração dos açúcares lactose (■) e glicose (○) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> . Concentração inicial de lactose de 10 g/L, com adição de 7,35 g/L de glicose às 19 h de fermentação, temperatura de 35 ± 3°C.	54
Figura 5.12 Perfil da concentração de de ácido fórmico (●), etanol (►), ácido acético (Δ), ácido propionico (*), ácido butírico (◊) e ácido láctico (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> . Concentração inicial de lactose de 10 g/L, com adição de 7,35 g/L de glicose às 19 h de fermentação, Temperatura de 35 ± 3°C.	55
Figura 5.13 Perfil da razão C/N (○) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> . Concentração inicial de lactose de 10 g/L, com adição de 7,35 g/L de glicose às 19 h de fermentação, temperatura de 35 ± 3°C.....	56
Figura 5.14 Hidrogênio acumulado(■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> , utilizando efluente da fermentação escura sem suplementação de lactose como substrato.....	58
Figura 5.15 Perfil da concentração celular (■), volume de biogás (◊), produtividade volumetria (○) e específica (Δ) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> , utilizando efluente da fermentação escura sem suplementação de lactose como substrato.	59
Figura 5.16 Perfil da concentração de ácido fórmico (●), etanol (►), ácido acético (Δ), ácido propiônico (*), ácido butírico (◊) e ácido láctico (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> , utilizando efluente da fermentação escura sem suplementação de lactose como substrato.	59
Figura 5.17 Perfil da razão C/N (○) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> , utilizando efluente da fermentação escura sem suplementação de lactose como substrato.....	60
Figura 5.18 Biorreator no decorrer da fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> , utilizando efluente da fermentação escura sem suplementação de lactose como substrato.....	60
Figura 5.19 Hidrogênio acumulado (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> , utilizando somente lactose (14,54 g/L) como substrato.....	62

Figura 5.20 Perfil da concentração celular (■), lactose (*), volume de biogás (◊), produtividade volumetria (○) e específica (Δ) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> , utilizando somente lactose (14,54 g/L) como substrato.....	62
Figura 5.21 Perfil da concentração de concentração de ácido fórmico (●), etanol (►), ácido acético (Δ), ácido propiônico (*), ácido málico (○) e ácido láctico (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> , utilizando somente lactose (14,54 g/L) como substrato.....	63
Figura 5.22 Perfil da razão C/N (○) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> , utilizando somente lactose (14,54 g/L) como substrato.....	63
Figura 5.24 Hidrogênio acumulado (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> . Concentração inicial de glicose de 10 g/L, com adição de 7,35 g/L de glicose às 25 h e 7,73 g/L as 60 h de fermentação, temperatura de 35 ± 3°C.....	66
Figura 5.25 Perfil da concentração celular (■),volume de biogás (◊), produtividade volumetria (○) e específica (Δ) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> . Concentração inicial de glicose de 10 g/L, com ajuste para 7,35 g/L de glicose às 25 h e 7,73 g/L as 60 h de fermentação, temperatura de 35 ± 3 °C.....	66
Figura 5.26 Perfil da concentração dos açúcares lactose (○) e glicose (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> , concentração inicial de glicose de 10 g/L, com ajuste para 7,35 g/L de glicose às 25 h e 7,73 g/L as 60 h de fermentação, temperatura de 35 ± 3 °C.....	67
Figura 5.27 Perfil da concentração de ácido fórmico (●), etanol (►), ácido acético (Δ), ácido propiônico (*), ácido butírico (◊) e ácido láctico (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> . Concentração inicial de glicose de 10 g/L, com ajuste para 7,35 g/L de glicose às 25 h e 7,73 g/L as 60 h de fermentação, temperatura de 35 ± 3 °C.....	68
Figura 5.28 Perfil da razão C/N (○) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> . Concentração inicial de glicose de 10 g/L, com ajuste para 7,35 g/L de glicose às 25 h e 7,73 g/L as 60 h de fermentação, temperatura de 35 ± 3 °C.....	68
Figura 5.29 Hidrogênio acumulado (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> . Concentração inicial de glicose de 10 g/L, com adição de 9,12 g/L de glicose às 28 h e 10,40 g/L as 70 h de fermentação, temperatura de 35 ± 3°C.....	71
Figura 5.30 Perfil da concentração celular (■), volume de biogás (◊), produtividade volumetria (○) e específica (Δ) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> . Concentração inicial de glicose de 10 g/L, com adição de 9,12 g/L de glicose às 28 h e 10,40 g/L as 70 h de fermentação, temperatura de 35 ± 3 °C.....	71
Figura 5.31 Perfil da concentração de glicose (○) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> . Concentração inicial de glicose de 10,49 g/L, com ajuste para 9,12 g/L de glicose às 28 h e 10,40 g/L às 70 h de fermentação, temperatura de 35 ± 3 °C.....	72
Figura 3.32 Perfil da concentração de ácido fórmico (●), etanol (►), ácido acético (Δ), ácido propiônico (*), ácido butírico (◊) e ácido láctico (■) em função de tempo no ensaio de	

fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> . Concentração inicial de glicose de 10,49 g/L, com ajuste para 9,12 g/L de glicose às 28 h e 10,40 g/L às de fermentação, temperatura de 35 ± 3 °C.	73
Figura 5.33 Perfil da razão C/N (○) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> . Concentração inicial de glicose 10,49g/L, com ajuste para 9,12 g/L de glicose às 28 h e 10,40 g/L às de fermentação, temperatura de 35 ± 3 °C.	74
Figura 5.34 Hidrogênio acumulado (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> . Revezamento de lactose e glicose temperatura de 35 ± 3°C.	78
Figura 5.35 Perfil da concentração celular (■), volume de biogás (◊), produtividade volumétrica (○) e específica (Δ) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> , com alteração do tipo de açúcar (lactose e glicose) alimentado periodicamente ao meio, temperatura de 35 ± 3°C.	78
Figura 5.36 Perfil da concentração de substrato em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> , com alteração do tipo de açúcar, lactose (■) e glicose (○), alimentado periodicamente ao meio, temperatura de 35 ± 3°C.	79
Figura 5.37 Perfil da concentração de ácido fórmico (●), etanol (►), ácido acético (Δ), ácido propiônico (*), ácido butírico (◊) e ácido láctico (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> , com alteração do tipo de açúcar (lactose e glicose) alimentado periodicamente ao meio, temperatura de 35 ± 3°C.	80
Figura 5.38 Perfil da razão C/N (○) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> , com alteração do tipo de açúcar (lactose e glicose) alimentado periodicamente ao meio, temperatura de 35 ± 3°C.	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 3. 1 Poder calorífico de diferentes combustíveis	7
Tabela 4.1 Composição do Meio RCV.....	26
Tabela 4.2 Composição da solução de micronutrientes utilizada no meio RCV	26
Tabela 4.3 Composição do meio fermentativo.....	29
Tabela 4.4 Composições dos meios fermentativos.....	30
Tabela 5.1 Produtividade de hidrogênio e composição de metabólitos nos ensaios de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> em biorreatore de 50 mL sem e com adição de soro permeado de leite	38
Tabela 5.2 Produtividade de hidrogênio e composição de metabólitos nos ensaios de fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> em biorreatore de 50 mL	40
Tabela 5.3 Produtividade de hidrogênio e comparação da composição de metabólitos antes e após fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> em biorreatore de 50 mL.....	43
Tabela 5.4 Produtividade específica de hidrogênio, razão de C/N e concentração de biomassa antes e após fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> em biorreatore de 50 mL. (Concentração celular inicial = 0,58 g _{sv} /L).....	43
Tabela 5.5 Dados da produção de H ₂ por fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> . Concentração inicial de lactose de 10 g/L, temperatura de 35 ± 3 °C	45
Tabela 5.6 Dados da produção de H ₂ por fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> . Concentração inicial de lactose de 10 g/L, com adição de 5,95 g/L de lactose às 31h de fermentação, Temperatura de 35 ± 3°C.....	49
Tabela 5.7 Dados da produção de H ₂ por fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> , concentração inicial de lactose de 10 g/L, com adição de 7,35 g/L de glicose às 19 h de fermentação, temperatura de 35 ± 3°C.....	52
Tabela 5.8 Dados da produção de H ₂ por fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> , utilizando efluente da fermentação escura sem suplementação de lactose como substrato.....	57
Tabela 5.9 Dados da produção de H ₂ por fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> , utilizando somente lactose (14,54 g/L) como substrato.....	61
Tabela 5.10 Dados da produção de H ₂ por fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> . Concentração inicial de glicose de 10 g/L, com ajuste para 7,78 g/L de glicose às 25 h e 7,73 g/L as 60 h de fermentação, temperatura de 35 ± 3°C	65
Tabela 5.11 Dados da produção de H ₂ por fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> . Concentração inicial de glicose de 10 g/L, com adição de 9,12 g/L de glicose às 28 h e 10,40 g/L as 70 h de fermentação, temperatura de 35 ± 3°C	70
Tabela 5.12 Dados da produção de H ₂ por fotofermentação por <i>R. capsulatus</i> , com alteração do tipo de açúcar (lactose e glicose) alimentado periodicamente ao meio. Temperatura de 35 ± 3 °C	76

LISTA DE QUADROS

- Quadro 3.1 Métodos de produção de hidrogênio a partir de três principais matérias-primas.... 8
Quadro 3.2 Vantagens, desvantagens e principais micro-organismos para produção de H₂..... 9

SIMBOLOGIA E ABREVIATURAS

Adenosina trifosfato – ATP
Dióxido de carbono – CO₂
Fotossistema I – FSI
Fotossistema II – FSII
Ferredoxina – Fd
Ferro – Fe
Hidrogênio – H₂
Magnésio – Mg
Mili mol - mM
Molibdênio – Mo
Níquel – Ni
Oxigênio – O₂
Pressão - P
Púrpuras não sulfurosas – PNS
Potencial hidrogeniônico – pH
RCV – *Rhodobacter capsulatus* V minimal medium
Selênio – Se
Sólidos Totais – ST
Sólidos Voláteis – SV
Sólidos Fixos – SF
Temperatura – T
UASB – Reator anaeróbio de fluxo ascendente
Vanádio – V

RESUMO

O emprego do sistema híbrido tem sido visto como um portador de energia do futuro para a produção de biohidrogênio devido a suas vantagens. Neste sistema, o efluente resultante na primeira etapa de fermentação escura, rico em ácidos orgânicos, é usado como substrato por bactérias púrpuras não-sulfuroosas na etapa de fotofermentação. Este processo tem caráter de sustentabilidade devido ao uso de recursos renováveis, com produção simultânea de produto de valor agregado e remoção de resíduos. Neste trabalho estudou-se a produção de biohidrogênio em processo batelada pela bactéria púrpura não-sulfurosa, *Rhodobacter capsulatus*. O substrato utilizado foi o efluente resultante da fermentação escura do permeado de soro de leite por consórcio microbiano. Este efluente foi centrifugado para a separação das células fermentativas e o sobrenadante foi corrigido segundo à composição do meio RCV, sem adição de sulfato de amônia e de ácido málico. O pH inicial foi ajustado para 6,8. Em uma primeira etapa, os experimentos foram realizados em frascos de penicilina de 50 mL para verificar a influência da composição do efluente da fermentação escura em termos de metabólitos e lactose não convertida. Os resultados destes ensaios preliminares comprovaram a necessidade de fornecer uma fonte de açúcar para a *R. capsulatus*, visto que na ausência de lactose a produção de H₂ foi desprezível. Os melhores resultados foram obtidos na presença de lactose e ácido láctico em concentrações na faixa de 4,4 a 8,0 e 4,6 a 14,2 g/L, respectivamente, favorecendo a produção de hidrogênio e apresentando uma produtividade máxima de 37,14 mmol H₂/L.dia. Em seguida, ensaios de fotofermentação com ampliação de escala (reator de 1,5 L) foram realizados para verificar o comportamento da produção durante o tempo. Desta forma, avaliou-se a adição de fontes de carbono no decorrer do processo. Os açúcares testados foram lactose e glicose e o efeito da adição alternada destes açúcares também foi verificado. Os resultados deste trabalho possibilitaram concluir que há um sinergismo entre os metabólitos do efluente da fermentação escura e o açúcar, havendo a necessidade de suplementar o efluente com uma segunda fonte de carbono. O inóculo apresentou maior potencial de síntese de hidrogênio ao se iniciar o processo na presença de lactose. A maior produtividade foi encontrada ao realizar o processo contendo 9,3 g/L de lactose e, posteriormente, corrigindo a concentração de açúcar para 6,0 g/L, adicionando de forma alternada lactose e glicose. Nesta condição, a produtividade máxima foi de 208,4 mmol H₂/L.dia e pôde-se manter a cultura ativa para produção de hidrogênio por fotofermentação por até 787 h.

Palavras-chave: biohidrogênio, fotofermentação, efluente da fermentação escura, *Rhodobacter capsulatus*.

ABSTRACT

The use of the hybrid system has been seen as an energy carrier of the future for the biohydrogen production due to its advantages. In this system, the resulting effluent from the first stage, that is the dark fermentation and rich in organic acids, is used as a substrate by non-sulfur purple bacteria in photo-fermentation step. This process has sustainability character due to the use of renewable resources, with simultaneous production of value-added product and waste removal. In this work, the production of biohydrogen in a batch process by non-sulfur purple bacteria, *Rhodobacter capsulatus*. The substrate used was the effluent from dark fermentation of whey permeate by microbial consortium. This effluent was centrifuged in order to separate the cells and the supernatant was adjusted according to the composition of the RCV medium without addition of ammonium sulphate and malic acid. The initial pH was adjusted to 6.8. In a first step, the experiments were performed in 50 mL penicillin bottles to verify the influence of effluent composition of dark fermentation in terms of metabolites and not converted lactose. The results of these preliminary tests have shown the necessity of providing a source of sugar for the *R. capsulatus*, as in the absence of lactose the H₂ production was negligible. The best results were obtained in the presence of lactose and lactic acid in the concentration range of 4.4 to 8.0 and 4.6 to 14.2 g/L, respectively, favoring the production of hydrogen, with a maximum yield of 37.14 mmol H₂/L.dia. Afterwards, photo-fermentation trials with scale-up (1.5 L reactor) were conducted to test the behavior of production over time. Thus, the addition of carbon sources in the process was evaluated. The sugars tested were lactose and glucose and the effect of the alternating addition of these sugars was checked as well. These results permit to conclude that there is a synergism between the effluent metabolites of dark fermentation and sugar, with the need to supplement the effluent with a second carbon source. The inoculum potential to hydrogen synthesis was higher when the process began in the presence of lactose. The highest productivity was attained by performing the process containing 9.3 g/L lactose and, subsequently, correcting the sugar concentration to 6.0 g/L by adding, alternately, lactose and glucose. In this condition, the maximum productivity was 208.4 mmol H₂/L.dia and the culture could be maintained activate to hydrogen production by photo-fermentation for up to 787 h.

Key words: bio-hydrogen; photofermentation; effluent from dark fermentation; *Rhodobacter capsulatus*

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A acelerada industrialização e urbanização em todo o mundo, bem como o aumento no consumo de combustíveis fósseis levaram a preocupações, principalmente, a poluição do meio ambiente. Assim, atualmente a atenção é dada a fontes de energias renováveis, com o intuito de minimizar a dependência de combustíveis que emitem gases poluentes à atmosfera. Neste contexto, tecnologias de produção de gás hidrogênio ganharam atenção especial durante os últimos cinquenta anos, por ser uma alternativa de energia limpa e com alto poder calorífico (122 kJ/g) (DAS; VEZIROGLU, 2008; KARGI; OZMIHCI; 2010).

A aplicação deste combustível baseia-se na utilização em células de combustível de hidrogênio ou na queima direta em motores de combustão interna. Na indústria química, o hidrogênio é usado para a síntese de amoníaco, álcoois, aldeídos, cloreto de hidrogênio e para a hidrogenação de óleos pesados e para remoção da presença de oxigênio de modo a evitar a oxidação de metais (SIKORA et al., 2013).

Atualmente, o H₂ é produzido por processos físico-químicos como reforma a vapor de gás natural, oxidação parcial de hidrocarbonetos pesados, gaseificação do carvão e eletroquímicos, tais como eletrólise da água. Estes processos são dispendiosos e exigem alta demanda energética e, por isso, não são sustentáveis. O hidrogênio também pode ser produzido através de processos biológicos, sendo promissores devido ao baixo impacto ambiental e à possibilidade de utilização de resíduos orgânicos como substrato para a produção de H₂ (BIANCHI et al., 2010).

A produção de biohidrogênio por via biológica pode ser classificada segundo três rotas metabólicas: a biofotólise da água por microalgas ou cianobactérias, que possui como vantagens a utilização de água que é um substrato abundante e a formação de produtos simples como H₂ e dióxido de carbono (CO₂), a fermentação de resíduos orgânicos por micro-organismos anaeróbios ou facultativos, denominada como fermentação escura e a decomposição de compostos orgânicos por bactérias fotossintéticas, denominada fotofermentação (HALLENBECK; GHOSH, 2009; DAS; VEZIROGLU, 2008).

Em virtude dos benefícios que as rotas biológicas proporcionam para um desenvolvimento sustentável da síntese de H₂, é de suma importância o estudo destes processos no intuito de viabilizar sua produção. No entanto, as rotas empregadas de forma isoladas apresentam a limitação de baixas conversões, por isso, ainda não é uma tecnologia competitiva às rotas termoquímicas. Por conseguinte, uma proposta de superar estes

empecilhos é a possibilidade da utilização de um sistema biológico que combine o uso de micro-organismos distintos visando o aumento da produção de H₂, sendo este processo conhecido como sistema híbrido. Uma combinação deste tipo de sistema e que vem sendo amplamente estudada é representada pelo uso de bactérias fermentativas e fotossintéticas, em uma operação sequencial de fermentação escura e fotofermentação, em que as bactérias fermentativas na ausência de luz utilizam como substrato uma diversidade de hidratos de carbono gerando H₂ e ácidos orgânicos. Os ácidos orgânicos resultantes são, por sua vez, a fonte para a produção de H₂ pelas bactérias fotossintéticas (DAS; VEZIROGLU, 2001). Portanto, esta degradação de ácidos orgânicos pelas bactérias fotossintéticas, por exemplo, a rota do ácido acético, promove um maior rendimento teórico de 4 mol H₂/mol de glicose empregando somente fermentação escura para 12 mol H₂/mol de glicose, no sistema híbrido (MIYAKE; MAO; KAWAMURA, 1984).

Estudos experimentais recentes sobre produção de biohidrogênio em sistema híbrido têm sido estudados por diferentes autores. Com o intuito de identificar um modo de operação econômico e simples e condições adequadas para resultar numa maior produtividade de H₂ e proporcionar benefícios ambientais sustentáveis. Com relação aos projetos de produção biológica de hidrogênio, os resultados têm sido promissores e os estudos têm conferido experiência suficiente aos pesquisadores do NUCBIO da FEQ/UFU, para permitir a plena execução desta proposta. A rota de fermentação escura por cultura mista, que se encontra em estágio mais avançado, tem sido estudada utilizando soro de queijo e melaço de cana-de-açúcar como substrato e já foram obtidas as melhores condições entre as variáveis: concentração de inóculo e de açúcar e condições de meio (pH inicial, sulfato de ferro e de amônia), incluindo avaliação da cinética da fermentação. Na rota de fotofermentação já foi determinada a influência de diversos ácidos orgânicos (málico, láctico, propiônico, butírico e acético) na composição do meio para as cepas (*Rhodobacter capsulatus* e *Rhodopseudomonas palustris*). Diante desse contexto, a proposta deste trabalho foi avaliar a produção de biohidrogênio por fotofermentação pela bactéria púrpura não sulfurosa (PNS), *Rhodobacter capsulatus*, utilizando efluente da fermentação escura, rico em metabólitos (ácidos orgânicos e álcool), suplementado com açúcares (lactose e glicose) como fonte de carbono. A produtividade de hidrogênio foi avaliada com base na análise de influência da concentração e do tipo de fonte de carbono, em diferentes escalas de biorreatores.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção biológica de hidrogênio por fotofermentação em batelada, utilizando bactéria fotossintetizante púrpura não sulfurosa e empregando como substrato o efluente resultante da fermentação escura por consórcio microbiano.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste estudo podem ser summarizados em:

- ✓ Avaliar o potencial da cepa *Rhodobacter capsulatus* na produção de H₂ por fotofermentação;
- ✓ Verificar o efeito do tipo de açúcar a ser suplementado ao meio;
- ✓ Estudar a produção de hidrogênio ao longo do tempo por meio da alimentação alternada da fonte de carbono.
- ✓ Investigar a influência de diferentes condições de fotofermentação em termo da composição do meio fermentativo: dos metabólitos e do tipo de açúcar não consumido provenientes do meio da fermentação escura e seu enriquecimento com açúcares (lactose e glicose);
- ✓ Avaliar a influência do tipo de açúcar a ser usada na fermentação escura.

CAPÍTULO 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3 PANORAMA ENERGÉTICO MUNDIAL

O consumo de energia no mundo baseia-se sobre dois tipos de fontes de energia: os combustíveis fósseis e as energias renováveis. As principais fontes de energia utilizadas atualmente são o petróleo, o gás natural e o carvão. O desempenho das economias emergentes, lideradas pela China e pela Índia proporciona elevadas taxas de crescimento do consumo destes insumos. Assim, a alta demanda, associada à instabilidade política nas regiões produtoras de petróleo e gás natural e os impactos negativos para o meio ambiente produzidos pela queima desses combustíveis, traz preocupações sobre o equacionamento da oferta de energia e seu impacto nos preços (CNI, 2007).

A partir desse cenário, a apostar na utilização de micro-organismos para melhorar a produção de biocombustíveis apresenta-se como uma realidade e alternativa cada vez mais significativa e em franco desenvolvimento. Atualmente os únicos biocombustíveis produzidos em grande escala são o etanol e o biodiesel, porém, diferentes classes de moléculas possuem propriedades desejáveis para este fim e algumas são passíveis de produção por via microbiana (COSTA, 2011). Tendo como exemplo, a produção de butanol pelo micro-organismo *Clostridium acetobutylicum*. O Brasil está bem posicionado no setor energético, alguns fatores que o torna atraente para investimentos externos são: participação relevante de fontes renováveis, integração dos setores energéticos e segurança energética e integração regional. O aproveitamento destas oportunidades é um trabalho complexo, no qual desafios importantes nas áreas da política energética, desenvolvimento institucional e política ambiental devem ser superados (CNI, 2007).

Segundo Brasil (2013), a Oferta Interna de Energia (OIE), a qual presume o somatório da produção interna com as importações de energia, menos as exportações e perdas de todas as fontes disponíveis no país, reportou que o Brasil teve aproximadamente 41% da sua oferta interna de energia proveniente de fontes renováveis, contra apenas 13,4% no mundo e 9,4% nos países industrializados. Esse perfil resulta em uma dependência menor da energia importada. A Figura 3.1 ilustra esses dados resumidamente da oferta interna de energia no Brasil

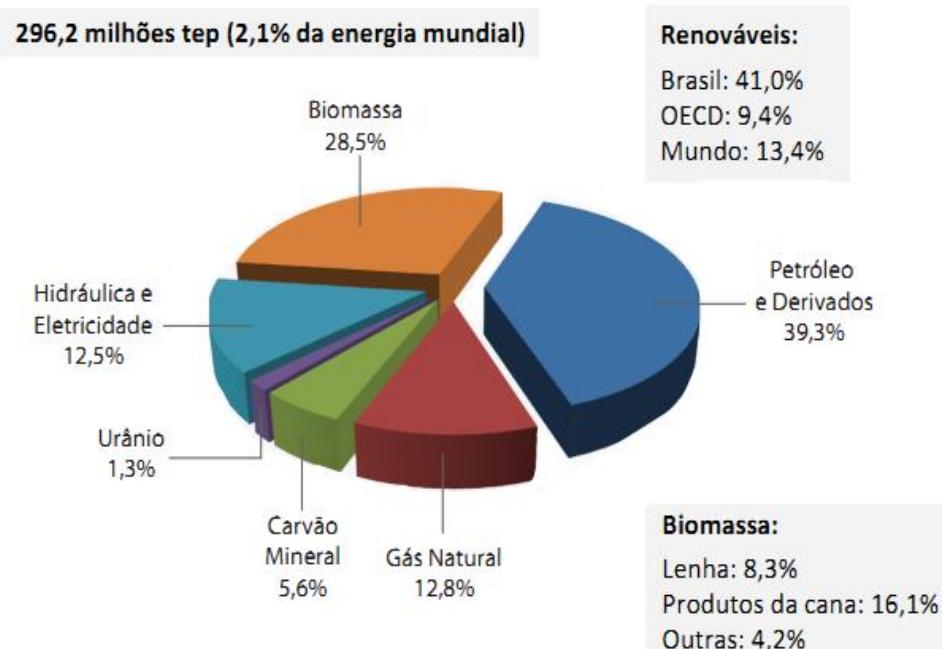


Figura 3.1 Oferta Interna de Energia no Brasil – OIE (%)

Fonte - BRASIL, 2013

De acordo com a Empresa de Pesquisa Energética (EPE) em 2013, houve uma queda da participação dos combustíveis renováveis na oferta de energia do país para 41%, contra os 42,3% registrados em 2012. Pesquisas que vêm sendo desenvolvidos pelo grupo de estudos do setor elétrico GESEL-UFRJ desde 2014 explicam esse “déficit” em razão da crise hidrológica, que ficou abaixo da média em 2013, levando o governo a usar mais fonte de energias térmicas para poupar água nos reservatórios. Outra justificativa refere-se ao consumo do setor de transporte, que pelo segundo ano consecutivo apresentou um crescimento considerável. Com a grande expansão da frota de automóveis, o consumo de energia cresceu em 5,2% com relação ao ano anterior neste segmento (CASTRO, 2014).

Apesar do crescimento das vendas de etanol, devido ao aumento da porcentagem da mistura na gasolina, o segmento de transportes é também o maior poluidor do país, responsável por 46,9% das emissões de gás carbônico provocadas pela ação do homem, ou 215,3 milhões de toneladas de dióxido de carbono (CO₂) (PAMPLONA, 2014).

Dentro deste contexto, reduzir a grande dependência dos combustíveis fósseis e investir em uma economia baseada em fontes de energia sustentáveis se mostram necessários para promover cada vez mais uma evolução econômica e ambiental do planeta. Considerando este aspecto, a produção de hidrogênio por via biológica demonstra ser uma alternativa promissora na área, devido a sua alta conversão e pureza, potencial de reciclagem e natureza não poluente.

3.1 Consequências da queima de combustíveis fósseis

A quantidade de catástrofes naturais, assim como as modificações climáticas, despertará na sociedade a preocupação com o futuro do planeta. Fortes indícios atribuem às ações humanas a responsabilidade por essas mudanças, de forma que a atividade industrial, o tráfego urbano, queimadas, desmatamento, entre outras, provocaram o aumento da concentração de poluentes na atmosfera levando também à maior incidência do efeito estufa. A utilização dos combustíveis fósseis causa contaminações tanto no solo, água ou atmosfera independente de seu estado físico (VALDEZ; VAZQUEZ; POGGI-VARALDO, 2008). As consequências provocadas pela intensa utilização de combustíveis fósseis na geração de energia são evidentes. A liberação de gases na combustão destes combustíveis, em suma, óxidos de carbono, nitrogênio e enxofre, são responsáveis para o aquecimento global, chuva ácida, diminuição da camada de ozônio os quais afetam o clima, a vegetação e o ecossistema aquático do planeta. Uma alternativa para reduzir o consumo de combustíveis fósseis seria modificar a matriz energética atual e neste sentido implementar políticas públicas de incentivo a energias renováveis e limpas, como hidrelétrica, solar, eólica, geotérmica e bioenergia (LEITE, 2010).

3.2 Nova perspectiva: Hidrogênio

O hidrogênio (H_2) é o elemento químico mais leve e mais abundante do universo, apresenta massa molecular de 1,0079 g/mol e uma densidade de 0,09 g/cm³. Em condições normais de pressão e temperatura (T = 0°C, P = 1atm), o hidrogênio molecular apresenta-se no estado gasoso (MIRA, 2012). É incolor, inodoro, atóxico e aproximadamente quatorze vezes mais leve que o ar, além de poder ser armazenado em forma líquida ou gasosa (SILVA et al. 2009). Devido a sua baixa densidade, sua armazenagem se torna um problema, na forma de gás, necessita de um sistema de armazenamento de grande volume e pressão, e quando no estado líquido, precisa que o seu armazenamento utilize sistemas criogênicos, ou seja, em baixíssima temperatura (- 253°C) (NAVARRO, 2013).

O hidrogênio é o combustível mais promissor para a substituição dos combustíveis de origem fóssil no médio para longo prazo. É encontrado combinado com outros elementos, devido sua instabilidade e por consequência, é considerado bastante reativo. Na atmosfera é encontrado no estado livre em fração ínfima (NASCIMBENI, 2013). É importante ressaltar que a combustão de hidrocarbonetos (gasolina, gasóleo, metano, propano, dentre outros) emite gases nocivos os quais são muito prejudiciais ao meio ambiente, além disso, possuem conteúdo energético por unidade de massa muito inferior comparado com a do hidrogênio. A Tabela 3.1

evidencia estes dados e mostra este aspecto comparativamente a outros combustíveis (VARGAS, 2013).

Tabela 3. 1 Poder calorífico de diferentes combustíveis

Combustível	Valor do Poder Calorífico Superior (a 25°C e 1atm)	Valor do Poder Calorífico Inferior (a 25°C e 1atm)
Hidrogênio	141,86 KJ/g	119,93 KJ/g
Metano	55,53 KJ/g	50,02 KJ/g
Propano	50,36 KJ/g	45,6 KJ/g
Gasolina	47,5 KJ/g	44,5 KJ/g
Gasóleo	44,8 KJ/g	42,5 KJ/g
Metanol	19,96 KJ/g	18,05 KJ/g

Fonte - (BEJAN, 1988).

O manuseio do hidrogênio gasoso apresenta maior segurança do que o do gás natural, sendo reconhecido mundialmente como um combustível ambientalmente correto, por ser renovável é uma alternativa ideal para os combustíveis fósseis, pois não contribui para o efeito estufa. Ao entrar em combustão, produz somente água, podendo ser usado diretamente em motores a combustão interna, ou em células de combustível para gerar energia elétrica. A aplicação do H₂ molecular se estende também a fabricação de amônia, hidrogenação de gorduras vegetais, gás de maçarico para solda de altas temperaturas, produção de ácido sulfúrico e produção de ácido clorídrico e investigações criogênicas (LONGO; LAZZARIN; MIGUEZ, 2009). No entanto, os maiores usuários de H₂ são as indústrias de petróleo e de fertilizantes, que consomem 37% e 50% da produção mundial total, respectivamente (MOMIRLAN; VEZIROGLU, 2002).

Dentre os processos de produção de hidrogênio a reforma a vapor do gás natural, gasificação do carvão e a eletrólise da água são alguns dos mais utilizados. No entanto, estes processos são bastante energéticos, ou seja, necessitam de um gasto muito elevado de energia, e, em sua maioria, são nocivos ao meio ambiente devido à emissão de gases de efeito estufa. Sob este panorama, os processos biológicos ganham maior importância enquanto energias alternativas (CORREIA, 2009). Os processos biológicos possuem a vantagem de serem operados a temperaturas e pressões ambientais e, portanto, são menos intensivos quanto ao gasto de energia. Embora a quantidade de H₂ produzida seja menor, a condição operacional é mais branda. Além disso, a tecnologia de obtenção do gás vem evoluindo gradativamente de forma que, no futuro, a produção poderá ser viável sob o ponto de vista econômico. O Quadro 3.1

apresenta as principais matérias-primas e métodos que são utilizados para produção de hidrogênio.

Quadro 3.1 Métodos de produção de hidrogênio a partir de três principais matérias-primas

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

Fonte – SOUZA, (2009).

3.3 Produção biológica do gás hidrogênio

A produção biológica de hidrogênio pode ser classificada como aquela que ocorre por vias fotossintéticas ou que acontece por mecanismos fermentativos. Ressalta-se que existem sistemas, denominados sistemas híbridos, que consistem na combinação de processos fotossintéticos e fermentativos e que possuem a vantagem de aumentar os rendimentos totais, em relação à produção de hidrogênio, uma vez que a sinergia do processo proporciona à maior utilização de substrato, reduzindo limitações biológicas (NEVES, 2009). Além disso, possui inúmeras vantagens comparadas com os métodos químicos de obtenção de hidrogênio. No Quadro 3.2 está apresentado o resumo dos processos biológicos, assim como algumas vantagens e desvantagens para a produção de biohidrogênio.

Quadro 3.2 Vantagens, desvantagens e principais micro-organismos para produção de H₂

Processos biológicos	Vantagens	Desvantagens	Micro-organismos
Biofotólise direta	Produção de H ₂ a partir da água; Não necessita de ATP;	Necessita de iluminação constante; Inibição das hidrogenases pelo O ₂ ; Biorreatores modificados para maximizar a utilização da energia solar.	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Platymonas subcordiformis</i>
Biofotólise indireta	Produção de H ₂ a partir de água; Habilidade de fixação de N ₂ e produção de H ₂ pelas nitrogenase; Separação espacial do O ₂ e H ₂ nas células diferenciadas (heterocistos);	Necessita de iluminação constante; Necessidade de ATP pelas nitrogenase; Síntese e manutenção dos heterocistos; CO ₂ presente no gás;	<i>Plectonemaboryanum</i> <i>Anabaenasiemensis</i> <i>Anabaenavariabilis</i> <i>Synechocystis</i> sp. <i>Cyanothece</i> sp. <i>Nostoc</i> sp.
Fotofermentação	Utilização de diferentes resíduos e efluentes como substrato; Utilização de amplo espectro de luz pelas bactérias fotossintéticas	Necessita de iluminação; Biorreatores modificados para maximizar a utilização da energia solar; CO ₂ no biogás;	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> <i>Rhodobacter</i> sp. <i>Rhodobacter sphaeroides</i> <i>Rhodobacter capsulatus</i>
Fermentação Anaeróbia	Ampla variedade de fontes de carbono como substrato; Não necessita de iluminação; Produção de metabólitos intermediários de grande valor agregado; Não há limitações com relação as O ₂ ;	Tratamento do efluente após a fermentação; CO ₂ presente no gás;	<i>Clostridium</i> sp. <i>Clostridium butyricum</i> <i>Clostridium beijerinckii</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>

Fonte – (VASCONCELOS DE SÁ, CAMMAROTA e LEITÃO, 2014).

3.3.1 Processos Fotossintéticos

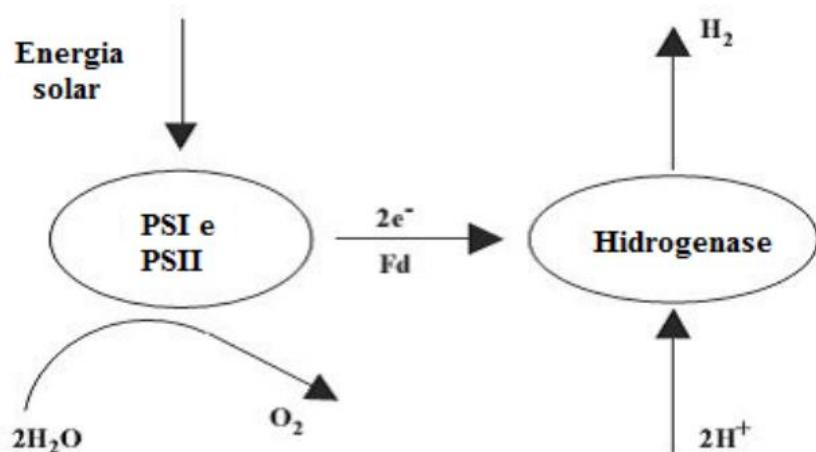
A produção de biohidrogênio por processos fotossintéticos utiliza micro-organismos que são dependentes da luz como fonte primária de energia. Este tipo de produção pode ser realizado por bactérias fotossintéticas, cianobactérias e microalgas. A radiação luminosa é utilizada para converter água, compostos de enxofre ou compostos orgânicos, em hidrogênio. As algas verdes e as cianobactérias produzem H₂ pelo processo de biofotólise da água, direta e indireta, respectivamente. Já as bactérias fotossintetizantes o fazem a partir da fotodecomposição de compostos orgânicos (LONGO, LAZZARIN e MIGUEZ, 2009).

3.3.1.1 Biofotólise direta da água

Segundo Hallenbeck e Benemann (2002), a produção de H₂ por biofotólise direta da água é realizada por microalgas verdes que por sua vez capturam luz e a energia recuperada é usada para juntar duas moléculas de água para a geração de um redutor de baixo potencial, que pode ser usado para reduzir uma enzima hidrogenase à produzir H₂ e O₂, de acordo com a Equação 1.



O fotossistema II (PSII) é responsável pela quebra da água com liberação de O₂ atmosférico e elétrons. Os elétrons liberados são captados pelo fotossistema I (PSI) com o auxílio da enzima Ferredoxina (Fd). Durante esse ciclo observa-se a fixação do CO₂ como carboidrato após a doação dos elétrons pela Fd. No entanto, em anaerobiose, os elétrons da Fd reduzida podem também ser utilizados para reduzir prótons H⁺ e então produzir H₂. Esta reação é catalisada pela hidrogenase e não possui a necessidade ATP como forma de energia extra (DASGUPTA et al., 2010). Este processo apresenta algumas limitações como a inibição da enzima hidrogenase. Na presença do oxigênio se faz necessária a manutenção da concentração de O₂ em um nível inferior a 0,1% (HALLENBECK; BENEMANN, 2002). A biofotólise pode ser considerada economicamente viável e sustentável uma vez que utiliza água como fonte renovável e pode levar ao consumo de CO₂, dado que este é um dos principais poluentes atmosféricos. Na Figura 3.2 está apresentado um esquema da biofotólise direta, onde a enzima hidrogenase favorece a síntese de hidrogênio.

**Figura 3.2** Esquema da Biofotólise direta

Fonte – HALLENBECK; BENEMAMM (2002)

3.3.1.2 Biofotólise indireta

As cianobactérias possuem a capacidade de realizar fotossíntese com liberação de oxigênio com características tipicamente procarióticas. As cianobactérias são consideradas boas produtoras de hidrogênio por apresentarem requisitos nutricionais simples. A partir da energia solar e da água, elas formam hidrogênio e oxigênio, sem desprendimento de CO₂. Utilizam o N₂ e CO₂ atmosféricos como fontes de nitrogênio e carbono, água como fonte de elétrons e poder redutor, e a luz como fonte de energia. Elas são o único grupo de procariotos conhecidos que realiza a fotossíntese com liberação de oxigênio como produto secundário. O seu processo fotossintético é análogo ao das algas e plantas (LONGO; LAZZARIN; MIGUEZ, 2009).

Assim como nas algas verdes a geração de H₂ também é inibida pela presença de O₂ e como consequência dessa inibição os processos de oxidação da água e de fixação do nitrogênio atmosférico são separados. Algumas cianobactérias separam estes processos temporalmente: a fotossíntese ocorre somente na presença de energia luminosa, ou seja, durante o dia, e a fixação de nitrogênio é feita durante a noite, na ausência de luz (DASGUPTA et al., 2010).

As cianobactérias são os organismos mais estudados na biofotólise indireta. Existem três tipos de enzimas envolvidas no metabolismo do hidrogênio: (i) a nitrogenase que catalisa a redução de N₂ a NH₄⁺ com liberação obrigatória de H₂; (ii) a hidrogenase de assimilação que recicla o H₂ libertado pela nitrogenase; e (iii) a hidrogenase bidirecional que pode funcionar no sentido da produção ou do consumo de H₂ (SACRAMENTO; LIMA; CARVALHO, 2006).

De acordo com Das e Veziroglu (2001), dentre as opções da biofotólise, as algas verdes são mais viáveis por obter uma produção de H₂ sustentada, pois as cianobactérias necessitam de um recurso energético mais intensivo, pois necessitam de ATP. Aliás, ao contrário das algas verdes em que as reações são catalisadas somente por uma enzima, a hidrogenase, as cianobactérias tem suas reações catalisadas pela nitrogenase e hidrogenase.

A rota de produção de H₂ catalisada pela nitrogenase e hidrogenase, em cianobactérias, está representada na Figura 3.3.

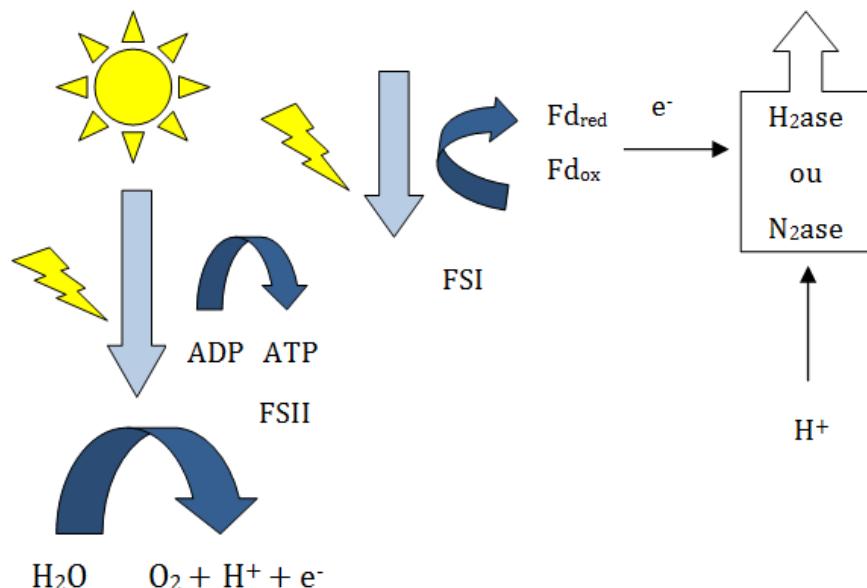


Figura 3.3 Esquema da biofotólise indireta realizada pelas cianobactérias
Fonte - adaptado de HALLENBECK e GHOSH, (2009)

3.3.2 Produção de hidrogênio por bactérias fotossintetizantes

As bactérias fotossintetizantes podem ser classificadas quanto ao consumo do substrato, sendo que as sulfuroosas consomem compostos à base de enxofre enquanto que as bactérias não sulfuroosas consomem compostos à base de carbono. Algumas bactérias fotossintetizantes existentes são: *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sulidophilus*, *Rhodopseudomonas sphaeroides*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodopseudomonas capsulate*, *Rhodospirillum rubrum*, *Chromatium sp. Miami PSB1071*, *Chlorobium limicola*, *Thiocapsa roseopersicina* e *Halabacterium halobium* (LONGO; LAZZARIN; MIGUEZ, 2009).

Para a produção de hidrogênio por bactérias púrpuras não-sulfurosas (PNS), é necessária iluminação e uma atmosfera inerte e anaeróbica. A nitrogenase é a principal enzima associada à produção de H₂, que por sua vez, catalisa a reação em meios de cultura limitados de nitrogênio.

Essas bactérias fotossintetizantes são apresentadas na literatura como boas candidatas a um sistema microbiológico de produção de hidrogênio por apresentarem algumas vantagens, tais como: apresentarem elevados rendimentos teóricos de conversão de substrato em H₂, não produzirem O₂, que é inibidor da nitrogenase, possuírem a capacidade de utilizar amplo espectro luminoso para obtenção de energia e utilizarem vários substratos orgânicos, tanto para o crescimento quanto para a produção de H₂ (MATHEWS; WANG, 2009). A Figura 3.4 ilustra a formação de H₂ por fotodecomposição.

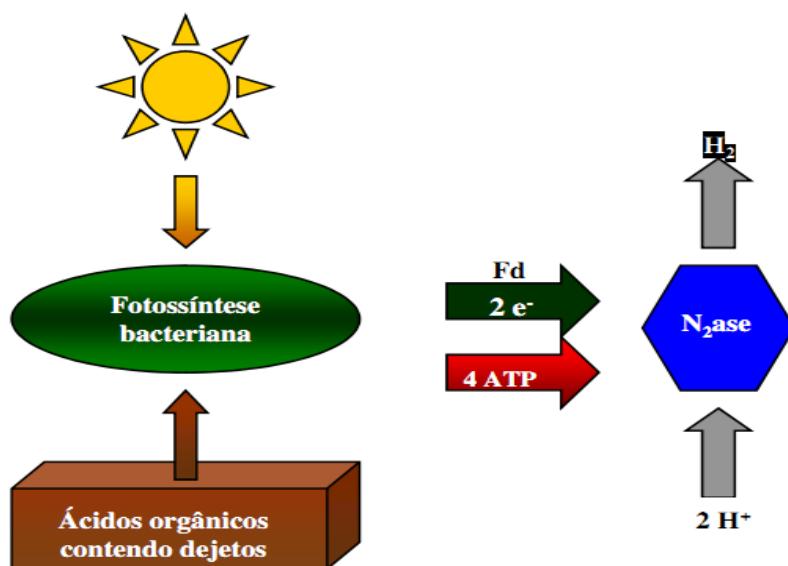
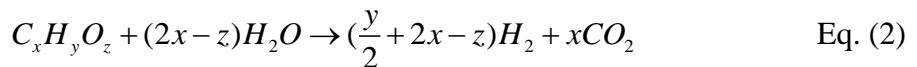


Figura 3.4 Esquema da Fotodecomposição
Fonte – HALLENBECK e BENEMANN (2002)

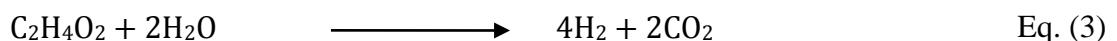
A fotofermentação apresenta como desvantagens a grande quantidade de adenosina trifosfato (ATP) requerida pela nitrogenase, os custos envolvidos na manutenção dos fotobiorreatores e na baixa eficiência dos fotossistemas das bactérias fotoheterotróficas. Apesar de este processo ser relativamente simples e barato, ainda demanda muita pesquisa para a otimização da tecnologia, uma vez que os rendimentos alcançados são baixos e insatisfatórios para torná-lo competitivo frente aos métodos tradicionais (MANISH; BANERJEE, 2008).

De acordo com LOSS (2009), a reação hipotética mostrada na Equação 2 descreve a quantidade teórica que seria obtida se todo o substrato fosse utilizado para a produção de H₂ e CO₂.

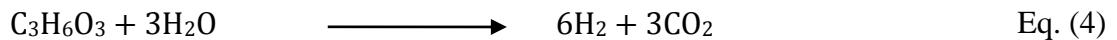


No processo de digestão anaeróbia a produção de H₂ é seguida pela produção de ácidos orgânicos. As equações de 3 a 6 mostram os principais ácidos obtidos da fermentação escura e teoricamente a quantidade de mols que são produzidos na conversão total dos mesmos por bactérias fotossintetizantes.

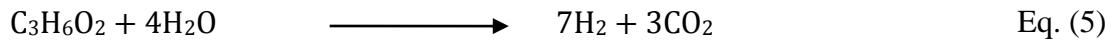
a) Ácido acético:



b) Ácido láctico:



c) Ácido propioníco



d) Ácido butírico



Ainda assim, além dos ácidos orgânicos mencionados, as bactérias fotossintetizantes possuem a capacidade de produzir hidrogênio a partir de açúcares, evidenciado em estudos que empregaram meios sintéticos (glicose, sacarose, lactose) ou resíduos agrícolas, como melão, ou ainda efluentes provenientes da fermentação escura (TIAN et al., 2010, AFSAR et al., 2011, KESKIN; HALLENBECK, 2012).

Neste contexto, a fotofermentação é considerada uma rota muito favorável, principalmente quando combinada a fermentação escura que na maioria das vezes resulta no incremento da produção de H₂ (AFSAR et al., 2011; KIM et al. 2006).

3.3.2.1 Parâmetros que influenciam a produção de H₂ por fotofermentação

Alguns parâmetros são fundamentais na produção de biohidrogênio produzido por fotofermentação tais como a temperatura, pH, fonte de luz, tipo de substrato, meio nutriente, concentração de inóculo, configuração de biorreatores, modo de operação e íons associados às enzimas (CHEN et al., 2011; BARBOSA et al., 2001; HONGLIANG et al., 2012, KOKU et al., 2003; ODA et al., 2005; SCHNEIDER et al., 1991). Dos principais representantes das bactérias PNS os mais utilizados são *R. palustris*, *R. capsulatus*, *R. sphaeroides* e *Rhodospirillum rubrum*

(DASGUPTA et al., 2010). A Figura 3.5, ilustra o micro-organismo que foi utilizado neste trabalho, células da cultura *R. capsulatus*.

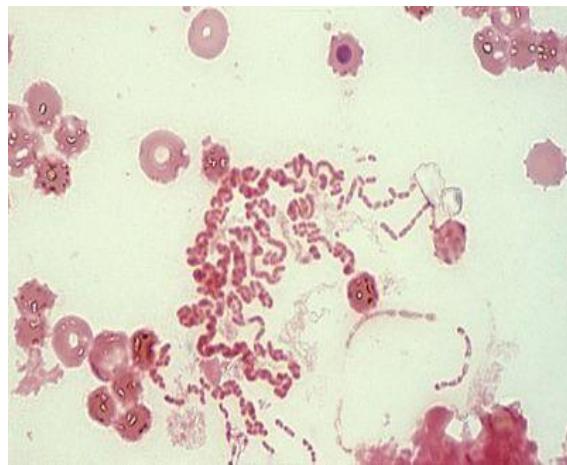


Figura 3.5 Células de *R. capsulatus*, em vista microscópica
Fonte - MICROBEWIKI, (2010)

Sevinc et al. (2012) estudaram a produção de H₂ utilizando *R. capsulatus* em fotofermentação empregando substrato duplo composto por ácido acético e ácido láctico em diferentes temperaturas (20, 30 e 38°C). Os resultados revelaram que a máxima taxa de produção de H₂ (R_{max}) foi de 0,5 mmol H₂/L.h obtida a 30 °C e 67,5 photons. $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A produção de H₂, aplicando um consórcio microbiano de bactérias PNS, em um reator anaeróbio de fluxo ascendente (UASB) e variando a fonte de carbono, foi avaliada por Lázaro et al. (2012). Neste estudo, a conversão máxima de H₂ foi de 0,6; 1,4; 0,7; 0,5 e 0,9 mmol H₂/mmol acetato, butirato, citrato, lactato e malato, respectivamente.

Özgur et al. (2010 a) utilizaram *R. capsulatus* em suas fermentações e avaliaram o efeito da concentração de acetato na produção de H₂ e no crescimento celular. Para isso várias concentrações iniciais de acetato foram estudadas: 10, 20, 30, 40 e 50 mM para uma concentração fixa de 2 mM de glutamato, o que resultou em razões C/N de 15, 25, 35, 45 e 55 respectivamente. A bactéria cresceu e produziu H₂ com sucesso em todas as concentrações de acetato, embora o início da produção de H₂ tenha sido mais rápido em concentrações mais baixas de acetato, sendo a maior produtividade 1,36 mg/L_c.h. obtida com a razão C/N de 35.

No trabalho desenvolvido por Avcioglu et al. (2011), a produção de hidrogênio foi estudada em um sistema híbrido composto da utilização do efluente da fermentação escura com melaço como substrato seguida de fotofermentação por *R. capsulatus* em um fotobiorreator em

condições ambientes. A estratégia resultou na produtividade máxima de 12,0 mmol H₂/L.dia sendo uma conversão de 0,50 mol H₂/mol de substrato verificada.

Afsar et al. (2011) fizeram testes com intuito de avaliar a produção de H₂ por *R. palustris* e *R. capsulatus*. A fotofermentação foi realizada com ambas as cepas puras e empregou-se como substrato efluente da fermentação escura contendo acetato (114 mM), ácido lático (6 mM), glicose (20 mM) e NH₄Cl (1 mM), haja vista que esse meio foi diluído três vezes. O resultado da produtividade para a cepa *R. capsulatus* foi de 10,32 mmol de H₂/L.dia, enquanto que para *R. palustris* este valor foi de 7,92 mmol de H₂/L.dia.

3.3.2.2 Relação Carbono/Nitrogênio (C/N)

Alguns nutrientes como o carbono e o nitrogênio são de extrema importância na produção de biohidrogênio. Cada elemento possui papel fundamental para favorecer o processo fermentativo. Dentre as várias funções do carbono, ele fornece energia para as atividades vitais dos micro-organismos. Já quanto ao nitrogênio, a microbiota necessita de uma taxa adequada para sua reprodução e o desempenho das reações do metabolismo durante a fermentação (LIN e LAY, 2005).

Oztekin et al. (2008) relatam que quando ocorrem oscilações nas concentrações de nitrogênio, o baixo rendimento e uma reduzida velocidade de produção de hidrogênio podem ser verificadas, uma vez que o nitrogênio pode atuar como fator limitante, ocasionando mudanças de rotas metabólicas, a redução da atividade biológica, além de causar efeitos inibitórios e interferir nas culturas microbianas dominantes e nos produtos da fermentação.

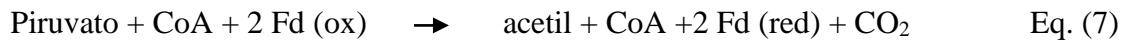
Lin e Lay (2005) testaram diferentes relações C/N em reator batelada e tendo como substrato a sacarose, sendo o inóculo obtido a partir do lodo de uma estação de tratamento de esgoto (ETE) pré-tratado termicamente. Os autores verificaram como mais favorável a relação C/N de 47, em termos da produtividade (4,8 mol de H₂.mol sacarose⁻¹) e velocidade de produção de hidrogênio (270 mmol H₂.L⁻¹.dia⁻¹) .

Rojas (2010) também analisou o efeito da relação C/N na produção de biohidrogênio a partir de água residuária sintética a base de sacarose, em reatores de leito fixo e fluxo ascendente. Foram avaliadas diferentes relações C/N de 40, 90, 140 e 190, na qual a fonte de carbono e nitrogênio foi a sacarose e a ureia, respectivamente. Os maiores valores foram obtidos para uma relação C/N de 140, sendo a conversão de substrato em H₂ e a produção volumétrica de hidrogênio de 3,5 mol H₂/mol sacarose e 159,6 mmol H₂/L.dia, respectivamente.

3.3.3 Produção de hidrogênio a partir da fermentação escura

Segundo Manish e Banerjee (2008), tem-se investido bastante na produção de hidrogênio por processos biológico sem todo o mundo. Bactérias fermentativas possuem boas características e são as candidatas favoritas para a produção de hidrogênio. Essas bactérias degradam matéria orgânica e liberam hidrogênio e dióxido de carbono, sendo que um percentual dessa matéria orgânica permanece na forma de ácido acético e ácido butírico ou outros ácidos, dependendo da bactéria que a fermenta. A fermentação pode ser realizada por diversos micro-organismos como os anaeróbios obrigatórios da espécie *Clostridium*, os anaeróbios facultativos das espécies *Enterobacter* sp., *Escherichia coli*, *Citrobacter* sp., ou culturas mistas.

No decorrer do processo de fermentação, utilizando como substrato a glicose, esta é inicialmente convertida a piruvato na via glicolítica. O piruvato é oxidado a acetil-CoA, o qual em seguida é convertido em acetil fosfato resultando na produção de ATP e na produção de íons acetato. A oxidação do piruvato a acetil-CoA requer a redução da ferrodoxina (Fd). Esta última, na sua forma reduzida, é oxidada pela enzima hidrogenase, produzindo Fd (oxidado) e libertando elétrons que vão formar hidrogênio molecular. A reação global é representada pelas Equações 7 e 8 (DAS e VEZIROGLU, 2008).



A fermentação anaeróbia (*dark fermentation*) se trata de um processo relativamente simples, que permite a produção de hidrogênio a partir de vários substratos, incluindo resíduos industriais e efluentes. A enzima hidrogenase desempenha um importante papel neste processo. A reação química é representada abaixo (HALLENBECK, 2005 apud CORREIA, 2009) pela Equação 9. Além disso, este processo geralmente ocorre a uma taxa de velocidade elevada e não depende da luz solar (DAS e VEZIROGLU 2008). A Figura 3.6 apresenta a rota metabólica resumida para síntese de hidrogênio.



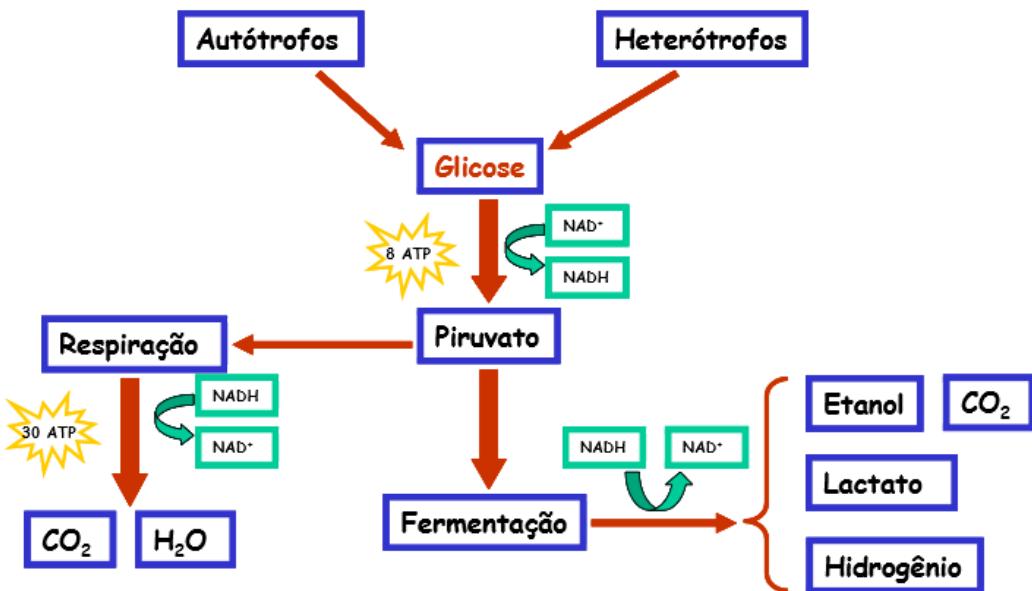
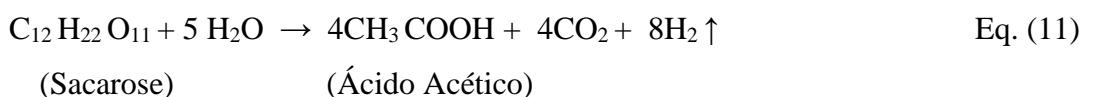
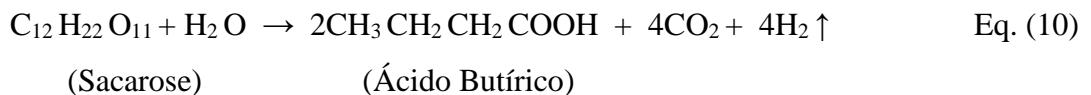


Figura 3.6 - Esquema de produção de hidrogênio
Fonte – BORGES (2008).

As reações de produção de hidrogênio a partir da sacarose são representadas pelas Equações 10 e 11:



Na realização de um balanço de carbono verifica-se que se a bactéria produzisse apenas ácido acético como subproduto e não produzisse ácido butírico e nenhum outro ácido, ela produziria o dobro de mols de hidrogênio por mol de substrato. No entanto, estas reações são teóricas baseadas em balanços estequiométricos e na realidade a bactéria produz os dois ácidos. Além disso, etanol e lactato, mesmo que em menores quantidades também são sintetizados. Porém esta relação pode variar com as condições de cultivo dentro dos limites termodinâmicos determinados (MUCCILLO, 2007). Em processos fermentativos o hidrogênio é produzido pela ação de hidrogenases como meio de eliminar o excesso de elétrons gerados durante a degradação de um substrato orgânico.

A produção de hidrogênio por fermentação escura é influenciada pela concentração de hidrogênio podendo ocorrer a inibição por produto. Assim, o aumento da concentração de H₂, conduz normalmente, a um desvio da via metabólica no sentido da produção subprodutos do metabolismo, tais como o etanol, lactato, acetona, butanol e alanina com consequente diminuição do volume de hidrogênio produzido (NATH; DAS, 2004).

3.3.3.1 Parâmetros operacionais relevantes para a produção H₂ por fermentação escura

Muitos fatores são determinantes e influenciam na produção de hidrogênio, como pH, temperatura, inóculo, substrato entre outros. Estes parâmetros possuem maior relevância para experimentos em batelada.

3.3.3.1.1 Influência do pH

No decorrer da fermentação ocorre a queda do pH devido ao aumento da concentração de ácidos orgânicos que são formados paralelamente ao hidrogênio na etapa de acidogênese. A concentração elevada de ácidos dissociados aumenta a força iônica da solução e proporciona o deslocamento da produção de hidrogênio para a produção de solventes, etapa denominada solventogênese. Neste caso, o efeito inibidor dos ácidos orgânicos ocorre quando os ácidos não polares e não dissociados penetram através da parede celular, onde estão a baixo pH, e liberam prótons dentro da célula que se encontra a pH interno maior. Isto leva a célula a um gasto maior de energia para manter a sua neutralidade e, consequentemente, há redução da síntese de hidrogênio (VAN GINKEL; SUNG; LAY, 2001). Desta forma, o pH deve ser controlado e preferencialmente mantido entre 5,0 e 6,5 (CHEN et al., 2008; VALDEZ-VALDEZ; FERNANDES, 2008).

O pH é um parâmetro que possui bastante influência na atividade das bactérias acidogênicas pois está intimamente ligado a ação da enzima hidrogenase e na rota metabólica de degradação da matéria orgânica, além de influenciar na produtividade do hidrogênio (AMORIM 2009; FANG; LIU, 2002 apud LEITE, 2010). Fang e Liu (2002) verificaram que o aumento do pH de 4 para 7 ocasionou uma redução da concentração de ácido butírico e aumentou a concentração de ácido acético.

3.3.3.1.2 Influência da temperatura

A temperatura é considerada um dos parâmetros operacionais de maior relevância na produção de hidrogênio, pois altera a atividade produtora de hidrogênio das bactérias (XIN et al., 2010; WANG WAN , 2009). O aumento da temperatura pode conduzir a um acréscimo na produção de hidrogênio, embora altas temperaturas acarretem uma diminuição da viabilidade e do rendimento por parte das bactérias (WANG e WAN, 2008).

Um estudo piloto desenvolvido por Wang e Wan (2009) deporta que, o aumento da temperatura resulta em um acréscimo da atividade microbiana, sendo que na maioria dos casos, a temperatura ideal para culturas puras em condições mesófilas é de 37°C e para termófilas 55°C. O aumento da temperatura de 25°C para 35°C aumentou tanto a produção de etanol quanto a de ácido acético, e que de 35°C para 55°C essas concentrações diminuíram, sugerindo que esse comportamento pode estar relacionado a alguma alteração do metabolismo para a produção de hidrogênio.

O hidrogênio possui baixa solubilidade em fase aquosa e, assim, a temperatura influencia em sua solubilidade, diminuindo a interação do gás com os micro-organismos presentes no processo. As vantagens dessa característica para a produção de hidrogênio são: como se encontra pouco disponível, o consumo do gás para geração de outros produtos é desfavorecido e uma maior facilidade é apresentada em sua remoção (FERNANDES, 2008).

3.3.3.1.3 Influência do inóculo (culturas puras ou mistas)

Os estudos sobre a produção de biohidrogênio envolvem discussão sobre a aplicação de culturas puras, co-culturas ou mistas. O uso de culturas mistas apresenta diversas vantagens em relação ao uso de culturas puras. Considerando a utilização de resíduos como substratos, que apresentam composição complexa e em condições não estéreis, as culturas mistas são adequadas para a degradação deste tipo de matéria-prima por serem obtidas de condições também não estéreis. Além disso, apresentam um conjunto de atividades hidrolíticas adequadas para a degradação dos diferentes compostos presentes nos resíduos e são mais robustas a variações das condições ambientais (KLEEREBEZEM; VAN LOOSDRECHT, 2007).

Segundo Fang et al. (2002), o processo biológico fermentativo é bastante atrativo, não somente por se tratar de um processo ambientalmente correto, mas também por haver uma variedade enorme de bactérias que atuam neste processo. A produção de hidrogênio via

fermentação anaeróbia tem sido muito utilizada com o emprego de micro-organismos pertencentes ao gênero *Clostridium*.

A escolha do micro-organismo envolve o tipo de substrato e também do balanço econômico do processo de produção de H₂. Devido às condições ambientais e a diversidade de substâncias no resíduo a ser utilizado, há grandes possibilidade de bactérias que consumem o H₂ estarem presentes em elevada concentração. Com isso, sugere-se que culturas mistas passem por um pré-tratamento por métodos como choque térmico, aeração, congelamento e descongelamento ou adição de ácido (SANTOS et al., 2013).

3.3.3.1.4 Influência da composição do meio de fermentação

Os substratos submetidos à fermentação são destinados de acordo com a disponibilidade, custos, quantidade de carboidrato e biodegradabilidade. É fato que o substrato mais testado na fermentação escura é a glicose, seguido da sacarose, uma vez que ambos podem ser facilmente degradados. Porém, é promissora utilização da biomassa como substrato para a produção do biohidrogênio, por ser proveniente de diversas fontes como de resíduos domésticos e industriais, de alimentos ricos em amido, de lacticínios, de óleos como de palma, de glicerol e de material lignocelulósico proveniente de resíduos agrícolas (CHONG et al., 2009, PRAKASHAM et al., 2009).

Quanto ao enriquecimento do substrato, Chen et al., (2008) observaram que o uso de peptona na fermentação escura evitou a queda brusca do pH, indicando que substratos contendo proteínas podem contribuir para a manutenção do pH durante a fermentação escura.

Sobre a presença de açúcares, altos teores podem ocasionar elevada produção de ácidos orgânicos na fermentação escura que, consequentemente, inibirá a produção de hidrogênio na etapa de acidogênese (VAN GINKEL; LOGAN, 2005).

A complementação com íons também é descrita como necessária. O íon magnésio é um cofator importante para enzimas e o íon ferro é um elemento essencial para a ferrodoxina, além de ser necessário para a enzima hidrogenase, responsável pela formação de hidrogênio (CHONG et al., 2009, LIN; LAY, 2005). Portanto, a concentração dos componentes do substrato deve ser avaliada para se determinar a composição mais adequada para aumentar a taxa de produção de H₂.

3.4 Enzimas envolvidas na produção biológica de H₂

O processo biológico de produção de hidrogênio está subordinado à presença de duas enzimas são estas a hidrogenase e nitrogenase. Ambas são metaloproteínas, ou seja, contém metais em seus sítios ativos (DASGUPTA et al., 2010).

3.4.1 Nitrogenases

A enzima nitrogenase geralmente reduz o azoto molecular (N₂) à amônia (NH₃), contudo pode produzir H₂, em particular, na ausência de N₂. Entre o metabolismo das algas, apenas as cianobactérias apresentam essa enzima. A liberação de H₂ por estas enzimas ocorre através de uma reação irreversível com vínculo a uma fonte extra de energia fornecida pela ATP. Assim, devido à exigência de alta intensidade de recurso energético pelas cianobactérias seu processo torna-se menos viável (OLIVEIRA, 2014). As nitrogenases se caracterizam de acordo com os metais presentes em seus sítios ativos. Podem ser classificadas como nitrogenase Molibdênio (Mo), Vanádio (V) ou Ferro (Fe). A nitrogenase Mo é normalmente a mais encontrada nos organismos que possuem esse tipo de enzima e, por isso, é denominada nitrogenase convencional. Ao passo que as nitrogenases V e Fe são chamadas de nitrogenases alternativas (DAS; VEZIROGLU, 2001).

A eficiência da ação da nitrogenase demanda certa quantidade de energia (ATP) e poder redutor. O principal inibidor da nitrogenase é a presença de oxigênio, que causa destruição irreversível da enzima. Sua presença é limitada e regulada pela existência do íon amônio, que por sua vez reprime tanto sua síntese como sua ação. Pequena concentração de amônio no meio de cultivo, por exemplo, 20 µM, inibiram a atividade da enzima em culturas de *R. sphaeroides* (KOKU et. al., 2002). Entretanto, esse tipo de inibição é reversível e a enzima retoma sua atividade uma vez que o íon é consumido (REDWOOD; MACASKIE, 2006).

Segundo Koku et al. (2002), o efeito inibidor sobre a nitrogenase ocorre mesmo quando a fonte de nitrogênio não contém amônio. Estudos realizados com células *R. capsulatus* mostraram haver inibição celular quando o lactato foi consumido primeiro que o glutamato, provocando o surgimento da amônia. Tal fato explica o ponto de vista de alguns autores, que empregam altas relações de C/N para produção do biohidrogênio, condição que favorece primeiramente o consumo da fonte de nitrogênio e, em seguida, a fonte de carbono (HILMER; GEST, 1977 apud LAZARO, 2009).

As PNS podem ter um, dois ou todos os três tipos destas enzimas presentes e ativas em funcionamento simultâneo e suas atividades podem mudar por vários fatores que refletem em alterações relativamente pequenas na condição de crescimento. Apesar de a hidrogenase ter sido detectada nas bactérias PNS, a nitrogenase é a principal enzima para a produção de H₂.

3.4.2 Hidrogenases

O processo pelo qual se obtém o hidrogênio acontece a partir da oxidação da matéria orgânica no qual o excesso de elétrons produz o H₂, catalisado pela hidrogenase (PEIXOTO, 2008 apud LEITE, 2010).

O metabolismo das hidrogenases é bem diferente comparado com o das nitrogenases. As hidrogenases são inibidas quando o pH está abaixo de 4,7 e na presença de monóxido de carbono e oxigênio apresentam maior tolerância ao último em relação às nitrogenases.

As enzimas hidrogenases são responsáveis pela produção biológica de hidrogênio via processo fermentativo. Estas enzimas são responsáveis pela catálise da reação reversível de oxidação do H₂. As hidrogenases podem ser agrupadas, em duas classes distintas, baseadas no tipo de metal encontrado em seus respectivos centros catalíticos: aquelas que contêm somente ferro são chamadas de [FeFe]-hidrogenases e aquelas que contém níquel e ferro são denominadas [NiFe]-hidrogenases. Algumas enzimas também podem apresentar o selênio, além do níquel e do ferro no centro catalítico, sendo denominadas [NiFeSe]-hidrogenases (HALLENBECK; BENEMANN, 2002; VIGNAIS; COLBEAU, 2004).

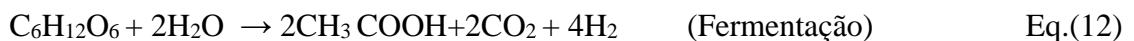
As [FeFe]-hidrogenases são geralmente encontradas em micro-organismos produtores de H₂, tais como os do gênero *Clostridium*. As [NiFe]-hidrogenases e as [NiFeSe]-hidrogenases são frequentemente encontradas em micro-organismos consumidores de H₂, tais como as arqueias metanogênicas e as bactérias redutoras de sulfato (MEYER, 2007; DAS; VEZIROGLU, 2008; VIGNAIS; COLBEAU, 2004 apud OLIVEIRA, 2014).

3.5 Processo Híbrido

O processo híbrido é a combinação dos processos de fermentação e fotofermentação, com intuito de otimizar a produção de H₂. A associação de bactérias fototróficas e fermentativas é uma opção promissora usada para produção de hidrogênio a partir do consumo de carboidratos. A fermentação anaeróbia de resíduos orgânicos produz compostos intermediários, como por exemplo, ácidos orgânicos de baixa massa molecular. Estes metabólitos solúveis são

consumidos pelas bactérias fotoheterotróficas para a produção de hidrogênio em condição de anaerobiose, na presença de energia luminosa e alta relação C/N. A utilização de substratos simples, como glicose, lactose e sacarose são facilmente assimiláveis e preferenciais para produção de hidrogênio por processo híbrido. Porém é oneroso o uso dessas fontes de carboidratos como matéria-prima. Desta forma, o emprego de água residuária para produção do biogás se torna vantajoso (LAZARO, 2009).

Teoricamente, segundo Vardar-Schara; Maeda e Wood (2008), o rendimento máximo do processo de combinação da fermentação escura e fotofermentação são 12 mols de H₂ por mol de glicose que pode ser obtido, por exemplo, quando glicose é convertida em acetato durante a fermentação. Subsequentemente, este acetato produz H₂ e CO₂ na fotossíntese. As Equações 12 a 14 explicam as reações para obtenção máxima de hidrogênio.



Na literatura têm sido observados diversos exemplos de processos híbridos. Entretanto, em sua maioria os rendimentos obtidos experimentalmente estão muito distantes do teórico. Segundo Kim et. al. (2006), *Clostridium butyricum* produziu hidrogênio com um rendimento de 2,58 mols de H₂/mol de glicose gerando formato, acetato, propionato e butirato como intermediários. Estes compostos foram então convertidos em hidrogênio pela *R. sphaeroides* resultando em um rendimento total de 8,3 mols de H₂ por mol de glicose utilizada (SILVA et al., 2009).

Su et al. (2009) estudaram a produção de H₂ usando um sistema integrado, associando os dois processos, digestão anaeróbia e fotofermentação. No primeiro estágio, utilizando *Clostridium butyricum* e como substrato a glicose, encontrou-se um rendimento de 1,59 mol de H₂/mol de glicose. Em um segundo estágio, o efluente resultante da digestão anaeróbia, caracterizado principalmente por conter ácido acético e butírico foi inoculado com *Rhodopseudomonas palustris* e reutilizado para a produção de H₂ na fotofermentação, obtendo-se um rendimento de 4,16 mol H₂/mol glicose.

Em um estudo realizado por Liu et al. (2010) *Clostridium butyricum* e *Rhodopseudomonas faecalis* DLD-53 foram empregados para produzir H₂ usando glicose

como substrato. O ácido acético e ácido butírico produzidos por *C. butyricum* foram os produtos predominantes no final da digestão anaeróbia. Ressalta-se que estes se mostraram substratos eficazes para o processo fotofermentativo. O máximo de produção de H₂ obtido foi 122,4 mL H₂ e a velocidade de produção foi de 0,5 mL/mL.dia.

Segundo Andrade (2007), existe dois critérios importantes e frequentemente utilizados na avaliação da produção biológica de H₂ a partir de um substrato específico. O primeiro refere-se à velocidade de produção de H₂ (quantidade/tempo) com base na concentração de biomassa ou massa seca bacteriana. O segundo refere-se à eficiência de conversão do substrato, ou seja, à quantidade utilizada para produção de H₂ e não para crescimento ou biossíntese. Este último é a razão entre mols reais de H₂ produzidos pela quantidade teórica que teria sido obtida se todo o substrato fosse utilizado para produção de H₂ e CO₂. A Figura 3.7, ilustra um exemplo de processo combinado de fermentação escura e fotofermentação para formação de H₂.

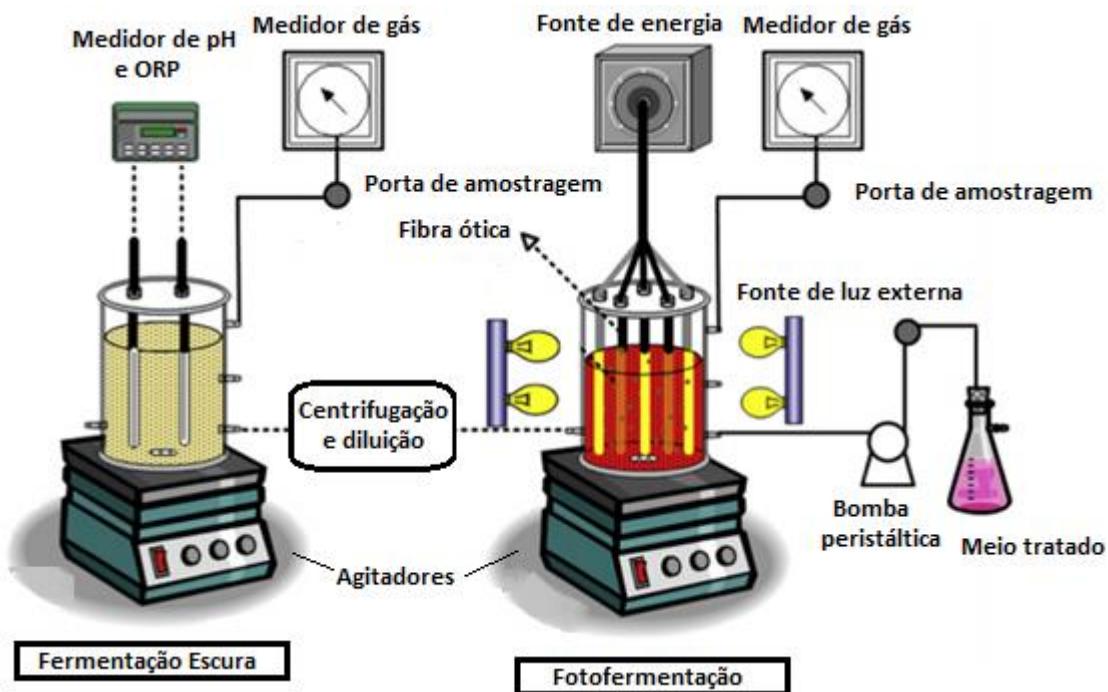


Figura 3.7 Esquema do processo combinando fermentação escura e fotofermentação

Fonte – Adaptado de Chen, et al. (2008).

CAPÍTULO 4

MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo será apresentado o material utilizado no desenvolvimento experimental deste trabalho, bem como a metodologia empregada para tal.

4.1 Material

4.1.1 Micro-organismos

A cepa de bactéria fotossintetizante liofilizada *Rhodobacter capsulatus* SB 1003 adquirida da DSMZ (*German Collection of Microorganisms and Cell Culture*), coleção alemã de micro-organismos e cultura de células, foi empregada nos ensaios da fotofermentação.

A ativação e o cultivo da bactéria fotossintetizante foi realizado em meio basal RCV (*Rhodobacter capsulatus* V minimal medium) (WEAVER et al., 1975), cuja composição é apresentada nas Tabelas 4.1 e 4.2 em água destilada.

Tabela 4.1 Composição do Meio RCV

Componentes	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
Solução de Micronutrientes	1 mL
Tiamina	0,001
(NH ₄) ₂ SO ₄	1

Tabela 4.2 Composição da solução de micronutrientes utilizada no meio RCV

Componentes	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

Com o objetivo de se obter o volume de células suficiente para os ensaios de fotofermentação, a cepa foi cultivada em frascos de Duran de 500 mL de capacidade (Figura 4.1), sendo que para 300 mL de meio de cultura RCV, 100 mL foram de inóculo e 200 mL de *headspace* preenchido com gás Argônio. Os frascos foram mantidos em câmara de germinação a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, sob iluminação de $30 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Posteriormente, no tempo de 10 dias, as células foram centrifugadas a 7730 g por 15 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento obtido ressuspenso em meio de cultura novo.



Figura 4.1 Inóculo em meio líquido da cepa *R. capsulatus*

4.2 Meios de cultura

Nos ensaios de fotofermentação, a fonte de carbono utilizada foi o efluente proveniente da fermentação escura de uma cultura mista proveniente de um reator anaeróbio de fluxo ascendente (UASB), realizada pelo grupo de pesquisa do Núcleo de Bioquímica (NUCBIO-UFU) (ROMÃO et al., 2014). No meio de fotofermentação estão presentes os metabólitos provenientes da etapa de fermentação escura. Para esclarecimento, na fermentação escura foi utilizado um meio sintético composto de (g/L): 3 KH₂PO₄, 7 K₂HPO₄, 1 MgSO₄, 3 extrato de levedura, 0,5 extrato de carne, 1 (NH₄)₂SO₄, 0,6 (FeSO₄) e 20 de lactose. A lactose foi proveniente do Permeado de Soro de Leite, adquirido da empresa Sooro Concentrado Indústria de Produtos Lácteos Ltda.

O efluente resultante da fermentação escura foi centrifugado e suplementado com os componentes do meio RCV, com exceção do sulfato de amônio e do ácido málico. O sulfato de

amônio não foi acrescentado, visto que a amônia já se encontrava presente no efluente da etapa de fermentação escura e que altas concentrações de fonte de nitrogênio, especialmente a amônia, podem inibir a nitrogenase, principalmente enzima catalisadora da formação de H₂ por bactérias púrpuras não-sulfurosas (OH et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2014). Além do efeito da composição dos ácidos orgânicos oriundos da fermentação escura, foi avaliada a influência da adição de uma outra fonte de carbono durante a fotofermentação, que neste caso foi a lactose ou a glicose. A lactose empregada nos ensaios em frascos de penicilina foi proveniente do soro permeado de leite e nos ensaios no biorreator, empregou-se lactose grau analítico.

Como o pH final da fermentação escura é de aproximadamente 5,0, ajustou-se o pH para 6,8. Este meio foi tratado termicamente (121°C, 20 min) em autoclave para promover a inativação de células do consórcio microbiano e quaisquer matérias coloidais que pudessem interferir a penetração da luz (ÖZGÜR et al., 2010a). Após resfriamento, este meio tratado foi inoculado com a *Rhodobacter capsulatus*.

4.3 Condição dos ensaios preliminares da fotofermentação

Os experimentos foram realizados em biorreatores (frascos de penicilina) de 50 mL (Figura 4.2), volume reacional de 37,5 mL, a 35 ± 3°C, em duplicata e sob intensidade luminosa de 30,0 µmol. photons m⁻² s⁻¹. Após a inoculação, o frasco foi purgado com gás argônio durante 3 min para garantir condição de anaerobiose. Em seguida, os frascos de penicilina foram selados com um septo de borracha butílica e uma espessa cápsula de alumínio.

As amostras de biogás foram coletadas após um período de 5 dias com seringas de 10 mL graduadas previamente acopladas ao sistema e armazenadas em ampolas gasométricas (Construmaq LTDA, Brasil) para análise da composição do biogás. Ao encerrar a fermentação, uma amostra de 10 mL do meio reacional foi coletada e centrifugada durante 15 min a 7730 g. O sobrenadante foi coletado para posterior análise de sua composição. As células sedimentadas após centrifugação foram descartadas ou, quando necessário, utilizadas para análise de sólidos voláteis totais.



Figura 4.2 Fermentações em batelada utilizando seringas para a cepa *R. capsulatus*.

Nestes ensaios buscou-se verificar o comportamento e a produção de hidrogênio da fotofermentação em diferentes condições (lactose e ácido láctico) proveniente da fermentação escura. Assim, comparou-se o efeito de dois meios provenientes de fermentação escura na síntese do produto alvo. No **Ensaio 1** a concentração de lactose foi 5,5 g/L e ácido láctico 0,58 g/L, o **Ensaio 2** tinha 5,1 g/L de lactose e ácido láctico com uma maior concentração 12,3 g/L.

Já em um segundo momento realizou-se um ensaio para obter condições de comparar com o primeiro, foi realizado o inverso, a concentração de ácido láctico manteve-se constante entre os dois meios (~8,8 g/L) e a concentração de lactose por sua vez no **Ensaio 3** foi de 0,7 g/L e no **Ensaio 4** de 9,1 g/L. Desta forma, a partir da Tabela 4.3, o intuito destes ensaios foi verificar a influência da composição de ambos os compostos e em que faixa de concentração promove uma maior produtividade.

Tabela 4.3 Composição do meio fermentativo.

MEIO FERMENTATIVO	LACTOSE (g/L)	ÁC. LÁCTICO (g/L)
ENSAIO 1	5,5	0,58
ENSAIO 2	5,1	12,3
ENSAIO 3	0,7	8,83
ENSAIO 4	9,1	8,80

Após a análise comparativa dos testes acima, fez-se o terceiro teste onde consta a composição dos meios na Tabela 4.3, para entender o comportamento da fotofermentação alternando valores das condições em lactose e ácido láctico.

Tabela 4.4 Composições dos meios fermentativos.

MEIO FERMENTATIVO	LACTOSE (g/L)	ÁC. LÁTICO (g/L)
ENSAIO 5	3,0	11,00
ENSAIO 6	4,3	11,76
ENSAIO 7	6,7	4,59
ENSAIO 8	2,27	11,67
ENSAIO 9	5,44	13,77
ENSAIO 10	8,70	10,89
ENSAIO 11	9,50	10,67
ENSAIO 12	10,14	0,10
ENSAIO 13	6,43	12,91
ENSAIO 14	7,96	14,25
ENSAIO 15	0,00	19,32
ENSAIO 16	0,00	18,27

A representação na Figura 4.3, ilustra o modo que foi realizado os procedimentos para produção de hidrogênio por fotofermentação em escala reduzida (frascos de penicilina) de 50 mL.

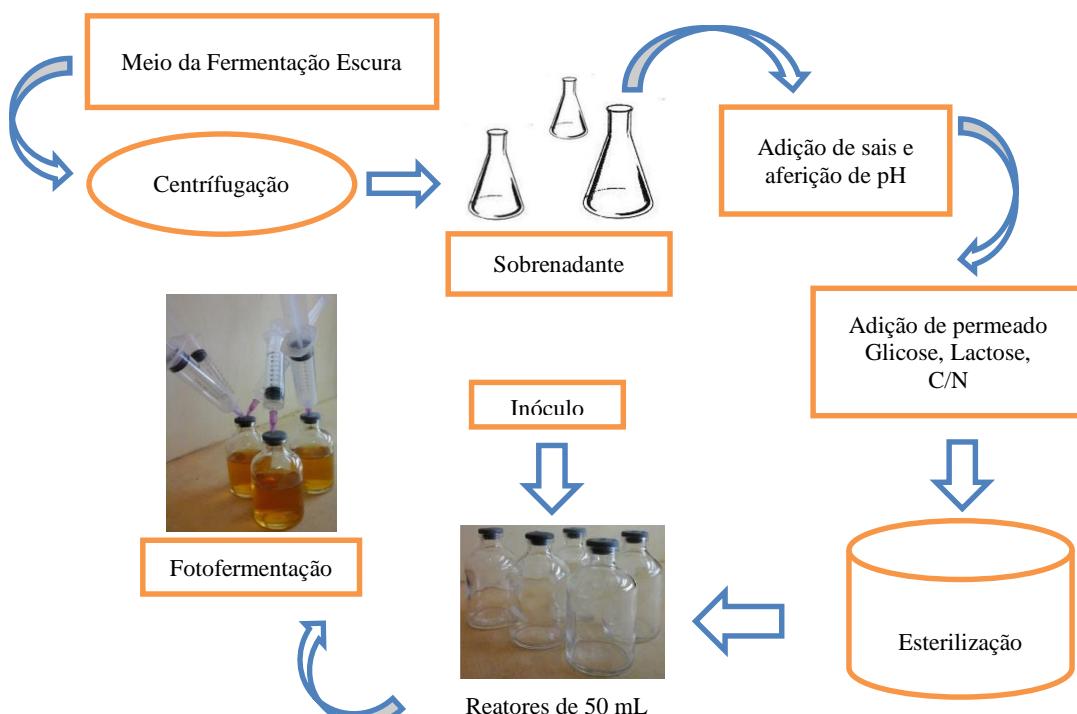


Figura 4.3 Fluxograma da produção de H₂ por fotofermentação em escala reduzida

4.4 Condição dos ensaios no biorreator

Os experimentos foram realizados em um biorreator de 1,5 L com volume reacional de 700 mL, sendo 65,3 mL de inóculo *Rhodobacter capsulatus* e 634,7 do meio da fermentação escura. A temperatura da fotofermentação foi de 35 ± 3 °C e foi mantida sob intensidade luminosa de 70 photons. $\mu\text{mol. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e agitação de 130 rpm.

Após a inoculação, borbulhou-se o meio com gás argônio durante, aproximadamente 15 min, para garantir condição de anaerobiose. O biogás produzido foi quantificado utilizando-se medidor de vazão volumétrica MilliGas-Counter da Ritter Tipo MGC-1. De modo a haver volume de biogás suficiente a ser determinado pelo medidor MilliGas-Counter, a tubulação foi bloqueada e, somente após um intervalo de tempo (12 - 14 h) de fermentação, liberou-se a passagem de gás na primeira amostragem. Para as medidas subsequentes, com o intuito de manter a pressão positiva no interior do biorreator, a tubulação foi bloqueada após cada amostragem.

Para o acompanhamento do crescimento celular e da produção de metabólitos, nos ensaios em escala reduzida (reatores de 50 mL), após o ensaio de fermentação, uma amostra de 10 mL do meio reacional foi coletada com utilização de seringa. Para os ensaios em escala ampliada (1,5 L), amostras foram retiradas periodicamente, durante o ensaio de fermentação. Para cada amostra, mediu-se a concentração celular por absorbância e, em seguida, esta amostra foi centrifugada durante 15 min a 7730 g. O sobrenadante foi coletado para posterior análise dos metabólitos e açúcares por cromatografia líquida. As células sedimentadas após centrifugação foram descartadas ou, quando necessário, utilizadas para análise de concentração de sólidos voláteis (SV) pelo método gravimétrico.

As amostras gasosas foram armazenadas em ampolas gasométricas (Construmaq LTDA, Brasil) até a análise da composição do biogás. As Figuras 4.4 e 4.5 ilustram as fotofermentações conduzidas em batelada utilizando Módulo Fermentador da TECNAL, composto por medidor on-line de biogás, módulo controlador TE – 2003/1,5-E1.



Figura 4.4 Diferentes vistas do biorreator com fotoperíodo usado nos ensaios de fotofermentação por *Rhodobacter capsulatus*.



Figura 4.5 Biorreator utilizado para fotofermentação

1- Biorreator com fotoperíodo **2-** Medidor on-line de biogás **3-** Módulo controlador

Foram realizados testes no biorreator com o propósito de aumentar a escala de produção de biohidrogênio assim como verificar o comportamento do consumo de ácidos e açúcares no decorrer do processo fotofermentativo. Desta forma, avaliaram-se algumas condições:

Condição 1: Adição de lactose (~10g/L) ao efluente de fermentação escura no t = 0;

Condição 2: Adição de lactose (5 g/L) uma vez observado seu consumo total. Fato verificado após 31h;

Condição 3: Estudo da fotofermentação a partir do efluente da fermentação escura (substrato: lactose) com adição inicial de lactose (10 g/L) e adição de glicose (6 g/L) após 19 h;

Condição 4: Análise da fotofermentação tendo apenas como substrato os ácidos provenientes da fermentação escura;

Condição 5: Avaliação da fotofermentação utilizando meio sintético (meio RCV com lactose (15 g/L) e na ausência de ácidos orgânicos);

Condição 6: Estudo da fotofermentação a partir do efluente da fermentação escura (substrato: lactose) com adição de glicose (10 g/L) no início e após 25 e 60 h;

Condição 7: Avaliação da fotofermentação a partir do efluente da fermentação escura (substrato: glicose) com adição de glicose (10 g/L) no início e após 28 e 70 h;

Condição 8: Análise da fotofermentação a partir do efluente da fermentação escura (substrato: lactose), com adição inicial de lactose (10 g/L), e posterior adição alternada entre glicose e lactose, ambas mantidas em torno de 7 g/L.

Em continuidade, a representação na Figura 4.6, ilustra o fluxograma das etapas dos procedimentos realizados para produção de hidrogênio por fotofermentação em escala ampliada (biorreator de 1,5L).

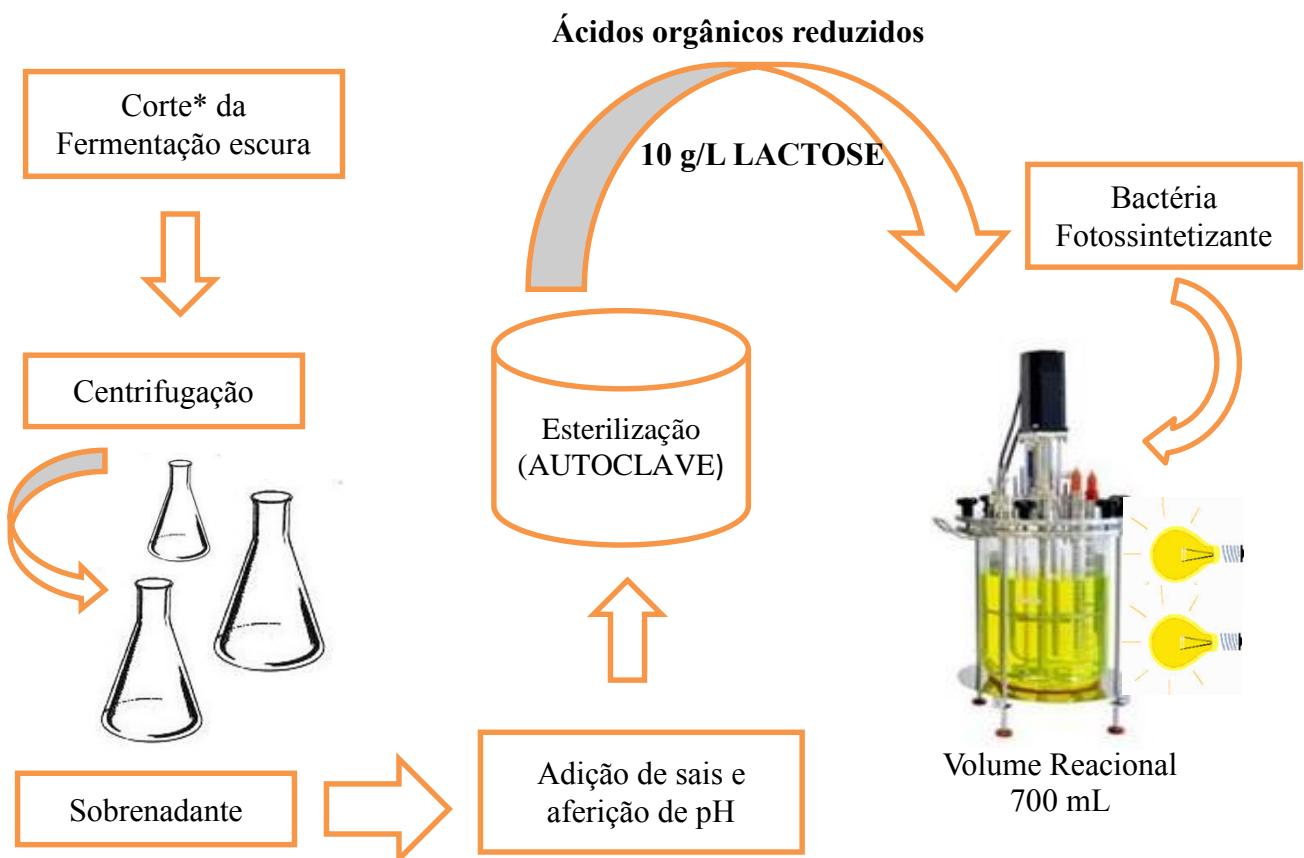


Figura 4.6 Fluxograma da produção de H₂ por fotofermentação em escala ampliada

*Corte: Suspensão celular removida da fermentação escura.

Inicialmente, com o intuito verificar a “performance” da fotofermentação, três cortes foram utilizados simultaneamente para a avaliação das condições 1, 2 e 3 supracitadas. Posteriormente, para a avaliação das demais condições (4 a 9), um único corte foi utilizado como substrato (sobrenadante) para a execução da fotofermentação.

4.5 Metodologia Analítica

4.5.1 Determinação da concentração celular

A determinação da concentração de sólidos voláteis (SV) foi realizada pelo método gravimétrico. Na determinação da curva de calibração, a densidade óptica a 660 nm foi medida em um espectrofotômetro (marca GENESYS) e convertida em g/L pela equação de correlação entre OD660 e g de SV/L, Figura A.1, apresentada no Apêndice A (CLESERI et al., 1998). Inicialmente uma amostra de 25 mL proveniente do inóculo foi centrifugada a 8000 rpm por 20 minutos. 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, previamente calcinadas e pesadas, tendo-se P1 (mg de massa úmida) e estas foram levadas à estufa, mantida a 110°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 P2 (mg massa seca). Na sequência, a amostra celular foi calcinada em mufla a 550°C por 30 minutos e depois colocada novamente em um dessecador até esfriar completamente (40 minutos), sendo posteriormente pesada e determinando-se P3 (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.

$$ST \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{(P2 - P1)(g)}{V_{amostra} (L)} \quad \text{Eq.(4.1)}$$

$$SV \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{(P3 - P2)(g)}{V_{amostra} (L)} \quad \text{Eq. (4.2)}$$

$$SF \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{(P3 - P1)(g)}{V_{amostra} (L)} \quad \text{Eq. (4.3)}$$

A curvas-padrão de crescimento celular para as cepa *R. capsulatus* está apresentada no Apêndice A, juntamente com a equação A.1 que apresenta a curva de calibração.

4.5.2 Análises cromatográficas

4.5.2.1 Determinação de Ácidos Orgânicos e Açúcares – Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As concentrações dos ácidos e açúcares foram analisadas por um HPLC (marca Shimadzu, modelo LC-20A proeminência, Supelcogel), em que os componentes foram detectados por luz ultravioleta (UV) e índice de refração (RID), respectivamente. A coluna utilizada foi C-610H mantida a 32 °C e a fase móvel utilizada para a eluição a 0,5 mL / min foi solução aquosa de H₃PO₄ (0,1%).

4.5.2.2 Determinação do Gás Hidrogênio - Cromatografia Gasosa (GC)

Nas amostras de biogás armazenadas em ampolas gasométricas foi determinado o teor de H₂ por um cromatógrafo em fase gasosa (GC) equipado com um detector de condutividade térmica. Uma coluna capilar carboxen 1010 (comprimento 30 m, diâmetro interno de 0,53 milímetros) foi usada e gás Argônio foi utilizado como gás de arraste a 15 mL/min. O forno, injetor e detector foram mantidos a uma temperatura de 30°C, 230°C e 230°C, respectivamente.

Ao longo de todos os experimentos a resposta analisada foi a produtividade volumétrica de hidrogênio (mmol de H₂/L.dia), determinadas por cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência.

4.5.3 Carbono Orgânico Total – TOC e Nitrogênio Total - NT

A caracterização das amostras que foram coletadas no decorrer do processo em relação ao carbono orgânico total (COT) e Nitrogênio Total (NT) foi realizada pela técnica de combustão catalítica a alta temperatura, empregando o aparelho analisador Total Organic Carbon Analyzer TOC-L CPH/CPN da Shimadzu.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir, são apresentados os resultados de acordo com a sequência com que foram realizados os ensaios experimentais e os parâmetros avaliados em cada um deles.

5.1 Ensaios em Escala Reduzida: Biorreator de 50 mL

Os resultados dos ensaios de fotofermentação por *Rhodobacter capsulatus* em reatores de 50 mL são apresentados nas Tabelas 5.1 a 5.4.

No primeiro lote de ensaios, cujos resultados estão mostrados na Tabela 5.1, foi avaliado o efeito do enriquecimento do substrato com lactose pela adição de permeado de soro de leite. Para estes ensaios, conhecia-se a composição do efluente da fermentação escura em termos da concentração de lactose e de ácido láctico. Inicialmente, apenas o ácido láctico foi determinado, uma vez que este ácido foi o metabólito predominante da etapa de fermentação escura.

Tabela 5.1: Produtividade de hidrogênio e composição de metabólitos nos ensaios de fotofermentação por *R. capsulatus* em biorreator de 50 mL sem e com adição de soro permeado de leite

Ensaio	$C_{\text{iniciallactose}}^{(1)}$ (g/L)	$C_{\text{inicialác.láctico}}^{(1)}$ (g/L)	Correção da Razão C/N ⁽²⁾	$V_{\text{biogás}}$ (mL)	Produtividade volumétrica (mmol H ₂ /L dia)	Porcentagem final dos principais metabólitos				
						% (Láctico)	% (Acético)	% (Butírico)	% (Propiônico)	% (Láctico + Butírico)
1	5,50	0,58	Sem permeado	41	8,00 ± 1,40	16,86	22,06	47,82	13,27	64,67
			17:1	39	7,09 ± 0,89	29,94	21,08	37,99	10,98	67,94
			35:1	51	9,62 ± 2,42	36,63	19,85	34,27	9,25	70,90
			70:1	34,5	4,74 ± 1,35	50,38	16,40	24,99	8,24	75,36
2	5,10	12,30	Sem permeado	84	10,16 ± 1,84	48,92	10,53	35,72	4,82	84,64
			35:1	84,5	6,94 ± 4,66	65,07	11,86	20,15	2,92	85,22
			70:1	66	11,24 ± 6,34	66,64	11,78	18,54	3,03	85,18
3	0,70	8,83	Sem permeado	26	0,44 ± 0,32	4,86	41,17	22,42	31,56	27,28
			17:1	25,5	0,40 ± 0,10	3,97	43,40	19,14	33,50	23,10
			35:1	40	4,67 ± 0,07	24,99	27,32	26,10	21,59	51,08
			70:1	52	8,66 ± 9,14	51,84	20,07	19,70	8,39	71,54
4	9,10	8,80	Sem permeado	77	14,33 ± 9,78	57,63	12,70	27,15	2,51	84,78
			35:1	92,5	11,43 ± 0,28	54,67	9,83	32,62	2,87	87,30
			70:1	83,5	8,93 ± 2,60	61,62	10,04	25,66	2,68	87,28

(1) composição final da fermentação escura (composição inicial para a fotofermentação).

(2) variável estudada. A razão C/N foi corrigida adicionando permeado de soro de leite, com base na concentração de lactose presente no permeado (86 a 92%)

Ao analisar os dados da Tabela 5.1, sem adição de permeado de soro de leite, os maiores volumes de biogás produzidos (84 e 77 mL) e os maiores valores de produtividade de hidrogênio (10,16 e 14,33 mmol H₂/L dia) foram obtidos nos Ensaios 2 e 4, respectivamente. Nestes ensaios, o efluente da fermentação escura usado como substrato para a fotofermentação apresentava concentração de lactose e ácido láctico superiores a 5 g/L e 8 g/L, respectivamente. Este efeito fica mais evidente ao comparar os Ensaios 1 e 2, com concentração inicial de lactose de cerca 5 g/L, sendo que no Ensaio 1 a concentração inicial de ácido láctico foi desprezível (0,58 g/L) e no Ensaio 2 a concentração inicial de ácido láctico foi de 12,3 g/L e ao comparar os Ensaios 3 e 4, com concentração inicial ácido láctico de 8,8 g/L, sendo que no Ensaio 3 a concentração inicial de lactose foi desprezível (0,7 g/L) e no Ensaio 4 a concentração inicial de lactose foi de 9,1 g/L. Para todos os ensaios (1 – 4), verificou-se que a adição de permeado de soro de leite, independente da razão C/N, não resultou em aumento da produtividade de hidrogênio.

Quanto à composição dos metabólitos, indicada na Tabela 5.1 pelas concentrações dos principais ácidos orgânicos produzidos, deve-se salientar que a menor produção de H₂ ocorreu no Ensaio 3, em que houve a maior produção de ácido propiônico (21,59 a 33,50%). No Ensaio 4, que resultou na maior produtividade de H₂ (14,33 mmol H₂/L dia), foi mínima a produção de ácido propiônico (2,51 %). Além disso, observou-se que nas condições que houve maior produção de hidrogênio, os ácidos láctico e butírico foram os principais metabólitos produzidos e que a soma de ambos compostos foi superior a 84% do total dos metabólitos.

Com base nesses resultados, um segundo lote de ensaios foi realizado, utilizando como substrato somente os efluentes resultantes da fermentação escura contendo ambos os compostos, lactose e ácido láctico. Ou seja, neste lote de experimentos, não houve adição de permeado de soro de leite. Os resultados são indicados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2: Produtividade de hidrogênio e composição de metabólitos nos ensaios de fotofermentação por *R. capsulatus* em biorreator de 50 mL

Ensaio	$C_{\text{inicial}}^{\text{lactose}}{}^{(1)}$ (g/L)	$C_{\text{inicial}}^{\text{ác. láctico}}{}^{(1)}$ (g/L)	V _{biogás} (mL)	Produtividade volumétrica (mmol H ₂ /L dia)	% (Láctico)	% (Acético)	% (Butírico)	% (Propioníco)	% (Láctico + Butírico)
5 ⁽²⁾	3	11,00	29	0,94 ± 0,19	17,03	35,86	18,01	29,10	35,03
6	4,3	11,76	55	11,67 ± 3,23	18,90	22,06	43,02	16,01	61,93
7	6,7	4,59	71	20,34 ± 2,85	63,63	14,95	18,55	2,87	82,18
8 ⁽²⁾	2,27	11,67	57	3,83 ± 1,00	14,68	30,79	22,21	32,03	36,89
9	5,44	13,77	94	15,63 ± 4,15	60,01	7,48	26,65	3,82	86,66
10	8,7	10,89	69	15,55 ± 0,28	70,53	11,81	15,52	2,15	86,05
11	9,5	10,67	74	14,89 ± 2,76	66,21	9,98	22,18	1,63	88,39

(1) composição final da fermentação escura (composição inicial para a fotofermentação)

(2) houve o escurecimento do frasco.

Observou-se que o melhor resultado de produtividade de hidrogênio (20,34 mmol H₂/L dia) foi obtido para uma concentração inicial de 6,7 e 4,59 g/L de lactose e ácido láctico, respectivamente. O aumento nas concentrações de ambos os compostos não levou a acréscimo na produção de volume de biogás e de produtividade de H₂. Assim como foi verificado na Tabela 5.1, os dados apresentados na Tabela 5.2 mostram que menores produções de H₂ (0,94 e 3,83 mmol H₂/L dia) foram obtidas nos Ensaio 5 e 8, respectivamente, quando houve maior formação de ácido propiônico (29,10 e 32,03 % dos metabólitos produzidos) e a soma da quantidade dos ácidos láctico e butírico foi a menor (35,03 e 36,89%). Novamente, para os Ensaios 7, 9, 10 e 11, com maior produção de biogás e de H₂, a soma da porcentagem dos ácidos láctico e butírico foram superiores a 82%.

Com o intuito de melhorar a compreensão da influência da composição do efluente resultante da fermentação escura, ou seja, das condições iniciais para a fotofermentação, além das concentrações de lactose e ácido láctico, novo lote de ensaios foram realizados com a determinação da composição de outros ácidos orgânicos, do etanol, e da concentração celular, antes e após a fotofermentação. A comparação entre o estado inicial e final para cada um destes elementos é indicada nas Tabelas 5.3 e 5.4.

Os resultados deste lote de experimentos (Ensaios 12 a 16) comprovam a necessidade de fornecer uma fonte de açúcar para a bactéria púrpura não sulfurosa *R. capsulatus*, visto que nos ensaios 15 e 16, sem lactose inicialmente, teve produção desprezível de H₂ (0,37 – 0,48 mmol H₂/L dia), mesmo havendo uma alta concentração inicial de ácido láctico de 19,32 e 18,27 g/L, respectivamente. Além disso, assim como observado nos Ensaios 7, 9, 10 e 11 (Tabela 5.2), os resultados dos Ensaios 12 a 14 indicam que o aumento da concentração inicial de lactose acima de 6,43 g/L (Ensaio 13) não resultou em incrementos significativos na produção de H₂, sendo nesta condição obtida a máxima produtividade de 37,23 mmol H₂/L dia, com volume de biogás de 98,33 mL.

As diferenças dos resultados de produtividade entre os ensaios dos três lotes de experimentos, mesmo sendo a condição inicial de lactose equivalente, podem ser devido à influência da composição dos ácidos orgânicos presentes no substrato, que pode ser variável dependendo das condições usadas na etapa de fermentação escura, como pode ser observado pelas concentrações iniciais dos ácidos láctico, acético, propiônico, butírico e fórmico determinadas nos Ensaios de 12 a 16. Além disso, os ensaios que deram maior produtividade de hidrogênio (7, 13 e 14) apresentaram a concentração de lactose entre 6 e 8 g/L indicando que pode existir uma faixa de concentração de açúcar que favorece a produção de hidrogênio.

Com relação à variação da composição dos ácidos orgânicos, nota-se pelos dados apresentados na Tabela 5.3, que na ausência de lactose, o ácido láctico foi consumido para a produção principalmente de ácido acético e ácido propiônico (Ensaios 15 e 16). Nos Ensaios 13 e 14, com concentração inicial de lactose de cerca de 6,4 – 8,0 g/L, o ácido láctico é ligeiramente consumido e, dentre os ácidos formados, há uma maior variação na concentração do ácido butírico.

Na Tabela 5.4 estão apresentados os dados de produtividade específica, razão C/N antes e após o ensaio em batelada e da concentração final de células, sendo que a concentração inicial de células foi de 0,58 g_{sv}/L.

Com relação ao aumento da biomassa, para Ensaios 13 e 14 de maiores produtividades, o crescimento celular foi de 2 e 3,4 vezes, respectivamente. Ao se determinar a produtividade específica, o melhor resultado foi do Ensaio 13 com 32,07 mmol H₂/g_{sv}.dia, confirmando que concentração de lactose de cerca de 6 – 7 g/L é a melhor condição inicial para a fotofermentação para produção de hidrogênio pela *R. capsulatus*.

No presente estudo verificou-se que nos ensaios onde houve o escurecimento do meio, foi determinada uma baixa produtividade. Assim, fez-se análise de ferro dissolvido para identificar se o escurecimento foi causado pela oxidação do ferro. Os resultados não permitiram concluir qual a relação da concentração de ferro dissolvido com a produção de hidrogênio e o escurecimento do frasco durante a fotofermentação. O escurecimento do meio também é relatado na literatura. Segundo Eroglu (2011), observou-se o escurecimento do meio após adição de Fe²⁺. No estudo desenvolvido por Zhu et al. (2007), a ocorrência do efeito de coagulação influenciou negativamente a produção de hidrogênio. Com este efeito o Fe²⁺ foi retido em flocos ou precipitado na superfície das células bacterianas. Em outro estudo, Kars et al. (2006), verificou alteração da cor no meio de acordo com o teor de Fe²⁺, onde concluiu que não houve produção de hidrogênio na ausência de Fe²⁺. E ainda afirma que a concentração ótima no meio é de 0,1 nM, no entanto, já em uma concentração de 1,0 nM resulta numa baixa produtividade volumétrica de hidrogênio, por ser tóxico e não permitir a penetração da luz devido apresentar cor intensa.

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

Tabela 5.3: Produtividade de hidrogênio e comparação da composição de metabólitos antes e após fotofermentação por *R. capsulatus* em biorreator de 50 mL.

Ensaio	C _{ilact} (g/L)	V _{biogás} (mL)	Produtividade volumétrica (mmol H ₂ /L dia)	C _{iác. lác} (g/L)	C _{fác. lác} (g/L)	C _{iác. acét} (g/L)	C _{fác. acét} (g/L)	C _{iác. prop} (g/L)	C _{fác. prop} (g/L)	C _{iác. but} (g/L)	C _{fác. but} (g/L)	C _{iác. fórm} (g/L)	C _{fác. fórm} (g/L)
12	10,14	77,67	17,12 ± 0,99	0,10	6,18	1,59	2,13	0,15	0,11	2,44	3,97	0,84	0,55
13	6,43	98,33	37,23 ± 3,08	12,91	11,46	1,46	1,55	0,17	0,14	1,69	4,92	0,39	0,47
14	7,96	100,00	31,57 ± 4,88	14,25	11,69	1,31	0,97	0,15	0,62	0,48	4,78	0,49	0,35
15 ⁽¹⁾	0,00	23,00	0,48 ± 0,13	19,32	6,27	2,27	5,28	0,31	4,44	0,21	0,71	0,13	0,03
16 ⁽¹⁾	0,00	21,33	0,37 ± 0,09	18,27	1,67	3,01	6,06	0,26	5,21	0,00	1,20	0,04	0,00

i: inicial; f: final; lac: lactose; ác. lac: ácido láctico; ác. acet: ácido acético; ác. prop: ácido propiônico; ác. but: ácido butírico; ác. form: ácido fórmico

(1) houve o escurecimento do frasco.

Tabela 5.4: Produtividade específica de hidrogênio, razão de C/N e concentração de biomassa antes e após fotofermentação por *R. capsulatus* em biorreator de 50 mL. (Concentração celular inicial = 0,58 g_{sv}/L).

Ensaio	C _{inicial lactose} (g/L)	V _{biogás} (mL)	Produtividade específica		Razão C/N _{inicial}	Razão C/N _{final}	C _{final célula} (g _{sv} /L)
			(mmol H ₂ /g _{sv} .dia)				
12	10,14	77,67	10,93		9,93	12,43	1,62
13	6,43	98,33	32,07		17,01	16,53	1,17
14	7,96	100,00	16,28		16,27	16,41	1,95
15 ⁽¹⁾	0,00	23,00	0,87		20,02	19,14	0,55
16 ⁽¹⁾	0,00	21,33	0,09		19,67	17,08	3,99

(1) houve o escurecimento do frasco.

5.2 Ensaios em Escala Ampliada: Biorreatore de 1,5 L

Condição 1: O substrato correspondeu ao corte proveniente da fermentação escura realizada a 30°C. Vale ressaltar que no ensaio da fermentação escura, o inóculo foi reciclado e o meio foi totalmente renovado. A composição em g/L do efluente usado como substrato para o ensaio de fotofermentação foi: 0 de lactose, 12,54 de ácido láctico, 0,32 de ácido fórmico, 1,20 de ácido acético, 0,82 de ácido butírico, e 0,79 de ácido propiônico. A razão C/N foi de 11,29 (mg/mg). O ensaio de fotofermentação foi conduzido a 35 ±3 °C e com concentração inicial de células de 0,49g/L e ajustou-se a concentração inicial de lactose para 10 g/L. Neste ensaio, o volume útil foi de 0,7 L e *headspace* de 0,8 L.

Os resultados deste primeiro ensaio são apresentados nas Figuras 5.1 a 5.4 e na Tabela 5.5.

A Figura 5.1 e a Tabela 5.5 indicam a quantidade de hidrogênio acumulado ao longo do processo de fotofermentação por *R. capsulatus*, atingindo 0,0842 mol de H₂ em 40 h de ensaio. Neste mesmo intervalo, pela Figura 5.2 e Tabela 5.5, observa-se que a máxima produtividade foi de 98,23 mmol H₂/L dia em 26 h de processo, sendo que ao final das 40 h está produtividade sofre um decréscimo de 17% (81,36 mmol H₂/L dia). Em termos de produtividade específica, os valores correspondentes para 26 h e 40 h foram 61,60 e 54,38 mmol H₂/g_{sv}. dia, respectivamente. Com relação ao crescimento celular, verifica-se que a máxima concentração de célula foi obtida em 18 h (1,64 g_{sv}/L), permanecendo constante até o final do processo. A máxima produção de biogás foi observada após 30 h de experimento, sendo 1,36 L.

Na Figura 5.2 verifica-se o perfil da concentração celular, volume de biogás, produtividade volumétrica e específica e consumo de lactose em função de tempo. Pela análise da Figura 5.2, houve um consumo de 88,16% de lactose, sendo que a concentração foi reduzida de 9,78 g/L para 1,16 g/L nas 40 h de processo. Os resultados mostram que o volume de biogás e o hidrogênio acumulado aumenta até 30 h de processo, depois permanece constante. Este comportamento coincide com a queda no consumo de lactose.

Tabela 5.5: Dados da produção de H₂ por fotofermentação por *R. capsulatus*. Concentração inicial de lactose de 10 g/L, temperatura de 35 ± 3 °C

Tempo (h)	C _{células} (g _{sv} /L)	V _{Gás} (L)	H ₂ acumulado (mol)	Produtividade volumétrica (mmol H ₂ /L dia)	Produtividade específica (mmol H ₂ /g _{sv} . dia)
0	0,49	0,00	0,00	0,00	0,00
14	0,55	0,32	7,61x10 ⁻³	18,65	33,87
18	1,64	0,75	3,32x10 ⁻²	63,89	38,93
22	1,64	1,07	5,67x10 ⁻²	90,18	54,95
26	1,59	1,27	7,23x10 ⁻²	98,23	61,60
30	1,62	1,34	8,16x10 ⁻²	97,15	59,83
34	1,58	1,36	8,44x10 ⁻²	89,57	56,57
40	1,50	1,36	8,42x10 ⁻²	81,36	54,38

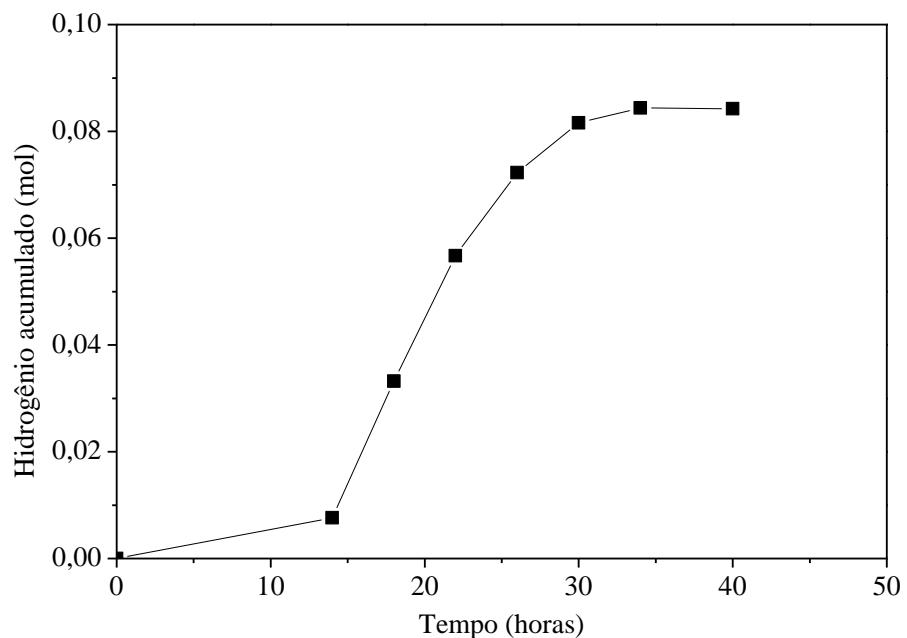


Figura 5.1 Hidrogênio acumulado (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*. Concentração inicial de lactose de 10 g/L, temperatura de 35 ± 3 °C.

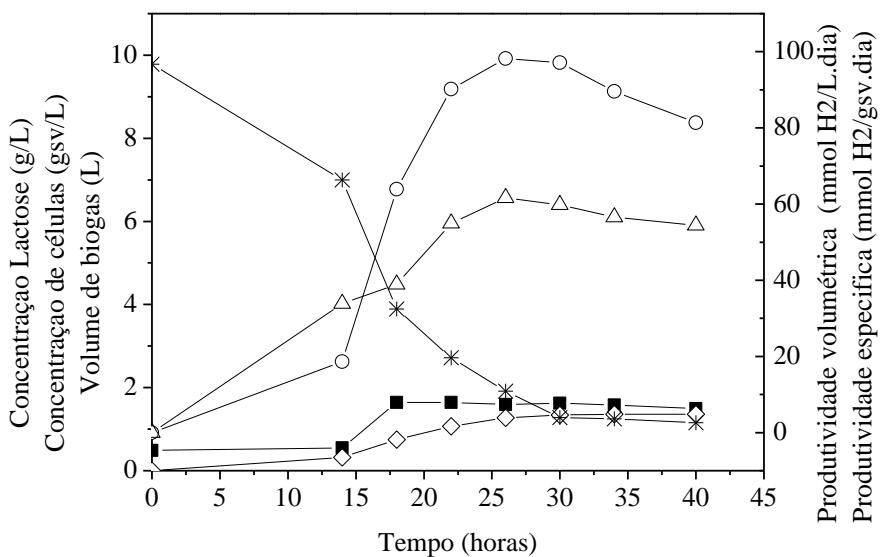


Figura 5.2 Perfil da concentração celular (■), volume de biogás (◊), produtividade volumétrica (○) e específica (Δ) e consumo de lactose (*), em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*. Concentração inicial de lactose de 10 g/L, temperatura de 35 ± 3 °C.

Verifica-se na Figura 5.3 o perfil de variação das concentrações dos metabólitos. Verifica-se que não houve variação das concentrações de ácido láctico, propiônico e de etanol ao longo das 40 h de fotofermentação, sendo que foi mantido em torno de $12,54 \pm 0,5$ g/L e $1,47 \pm 0,10$ g/L, respectivamente. Para os demais ácidos orgânicos, houve um aumento de concentração. A concentração de ácido fórmico aumentou 2,6 vezes, de 0,32 g/L para 0,83 g/L atingindo o máximo em 18 h. A síntese de ácido acético elevou sua concentração em duas vezes, aumentando de 1,20 g/L para 2,39 g/L. O ácido orgânico mais produzido foi o ácido butírico, havendo um aumento de cerca de cinco vezes da concentração deste metabólito. A concentração de ácido butírico variou de 0,82 g/L para 4,09 g/L.

Estes resultados de formação dos metabólitos seguiram a mesma tendência observada nos ensaios em biorreatores de 50 mL, em que a soma da porcentagem dos ácidos láctico e butírico é superior a 80% e havendo lactose no meio de fermentação, o ácido láctico não é consumido, mesmo que sua concentração seja alta.

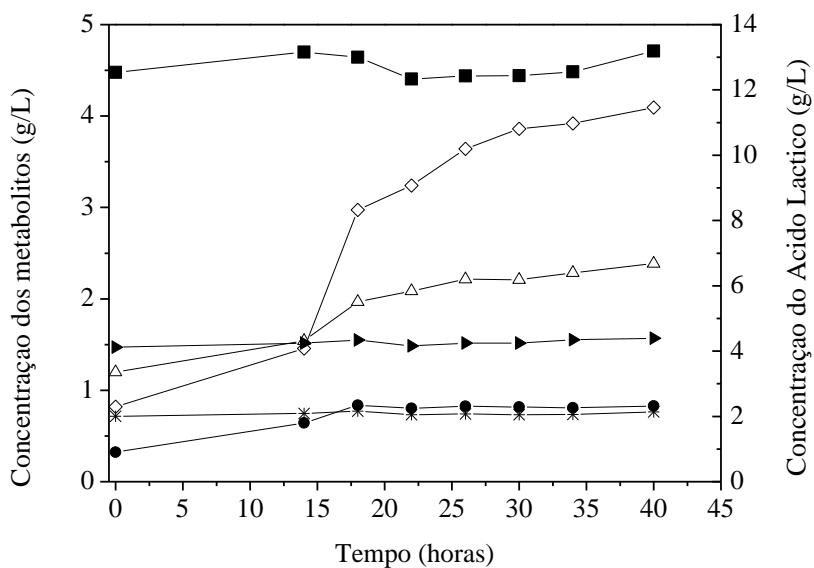


Figura 5.3 Perfil da concentração de ácido fórmico (●), etanol (▲), ácido acético (△), ácido propioníco (*), ácido butírico (◊) e ácido láctico (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*. Concentração inicial de lactose de 10 g/L, temperatura de 38 ± 3 °C.

Ao analisar a Figura 5.4, observa-se que a razão C/N permanece constante ao longo do ensaio de fotofermentação (40 h), com cerca de 17 (mg/mg). Esse resultado indica que está havendo a conversão da lactose em outros metabólitos complexos (ácidos orgânicos e etanol), o que está de acordo com a baixa fração de CO₂ detectada na composição do biogás (10 – 15%).

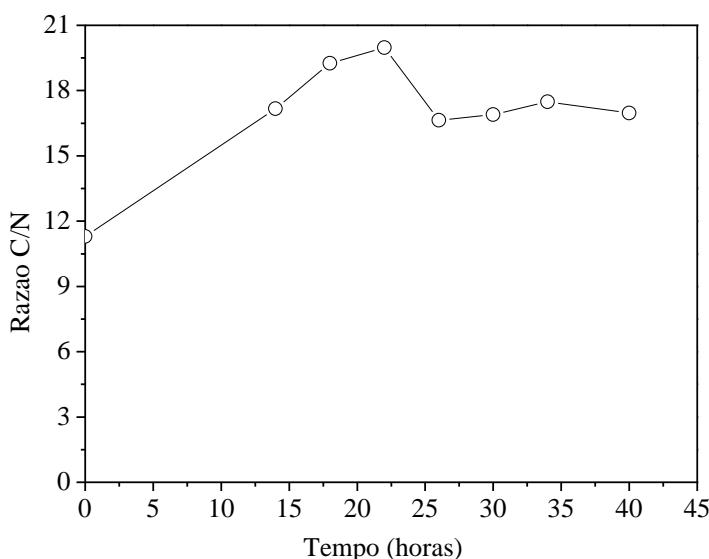


Figura 5.4 Perfil da razão C/N (○) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*. Concentração inicial de lactose de 10 g/L, temperatura de 38 ± 3 °C.

Condição 2: As condições deste segundo ensaio de fotofermentação foram praticamente as mesmas do ensaio anterior (**Condição 1**), variando apenas na temperatura de $35 \pm 3^\circ\text{C}$ e na concentração do substrato durante o processo. Neste teste, ajustou-se a concentração inicial de lactose para 10 g/L e após 31 h de fermentação, quando houve consumo de 99% deste substrato, adicionou-se mais lactose na concentração de 5,95 g/L. Os resultados são apresentados nas Figuras 5.5 a 5.8 e na Tabela 5.6.

Neste ensaio, a quantidade de hidrogênio acumulada foi maior que no teste sem adição de lactose durante o processo (Figura 5.5 e Tabela 5.6). Neste caso, o volume de biogás produzido aumentou até 40 horas e o hidrogênio acumulado até 36 horas, sendo que foi obtido 0,107 mol de H₂ ao final de 48 h. Com relação à produtividade volumétrica, a máxima foi de 114,29 mmol H₂/L dia em 31 h. No entanto, a adição de lactose não promoveu um aumento da produtividade, sendo que ao final das 48 h, obteve-se 83,04 mmol H₂/L dia, que é um resultado semelhante ao verificado no teste sem adição de substrato (Figura 5.6 e Tabela 5.6).

Em termos de concentração celular, neste experimento, houve um crescimento inferior ao do ensaio sem adição de lactose, havendo um aumento de 0,49 g_{sv}/L para 1,20 g_{sv}/L e após a segunda adição de lactose, a concentração de células se manteve em torno de 1,09 g_{sv}/L (Figura 5.6 e Tabela 5.6). Estes dados justificam resultados superiores ao se comparar os valores de produtividade específica. A produtividade específica máxima foi de 95,22 mmol H₂/g_{sv}. dia e, ao final de 48 h, foi de 80,92 mmol H₂/g_{sv}. dia.

Conforme os dados de produtividade e hidrogênio acumulado, o volume de biogás também foi superior ao do primeiro teste, atingindo o valor de 1,99 L. Com relação ao consumo de substrato, nas primeiras 31 h de processo, houve um consumo de 99% e após a adição de lactose, ao final das 48 h de ensaio, houve um consumo de 39,72%. Verifica-se, portanto, que houve uma possível inibição da cultura, visto que a produção de biogás foi interrompida após 40 h de processo, mesmo havendo disponibilidade de lactose. O pH do meio fermentativo foi mantido durante todo o processo na faixa de 5,5.

Tabela 5.6: Dados da produção de H₂ por fotofermentação por *R. capsulatus*. Concentração inicial de lactose de 10 g/L, com adição de 5,95 g/L de lactose às 31 h de fermentação, Temperatura de 35 ± 3°C.

Tempo (h)	C _{células} (g _{sv} /L)	V _{Gás} (L)	H ₂ acumulado (mol)	Produtividade volumétrica (mmol H ₂ /L dia)	Produtividade específica (mmol H ₂ /g _{sv} . dia)
0	0,49	0,00	0,00	0,00	0,00
15	0,95	0,39	9,93x10 ⁻³	22,70	23,88
19	1,11	0,83	3,31x10 ⁻²	60,29	54,44
23	1,27	1,27	6,39x10 ⁻²	97,23	76,57
27	1,29	1,58	8,37x10 ⁻²	109,56	85,11
31	1,20	1,77	9,92x10 ⁻²	114,29	95,22
Adição de 5,95g/L de lactose					
36	1,16	1,89	1,02x10 ⁻¹	102,71	88,57
40	1,10	1,95	1,02x10 ⁻¹	89,74	81,89
44	1,07	1,99	1,02x10 ⁻¹	85,61	80,25
48	1,03	1,99	1,07x10 ⁻¹	83,04	80,92

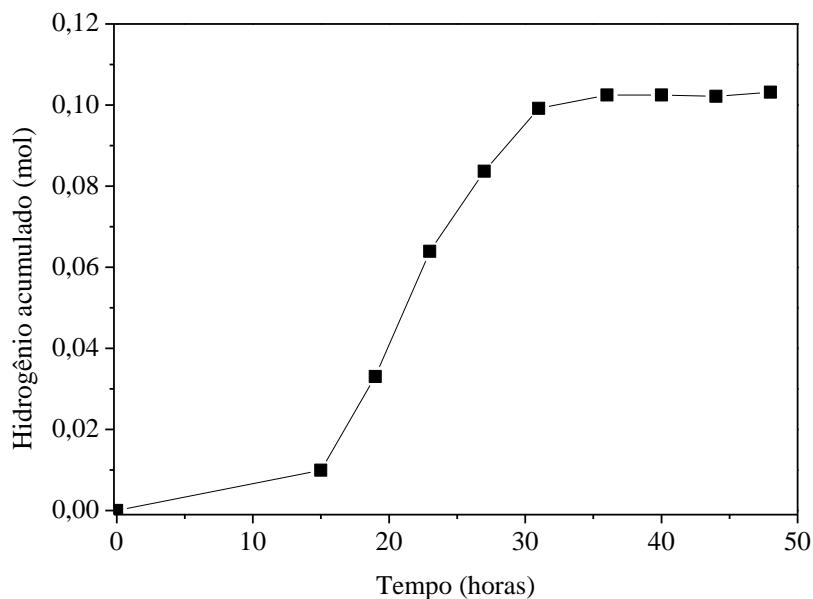


Figura 5.5 Hidrogênio acumulado (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*. Concentração inicial de lactose de 10 g/L, com adição de 5,95 g/L de lactose às 31h de fermentação, temperatura de 35 ± 3°C

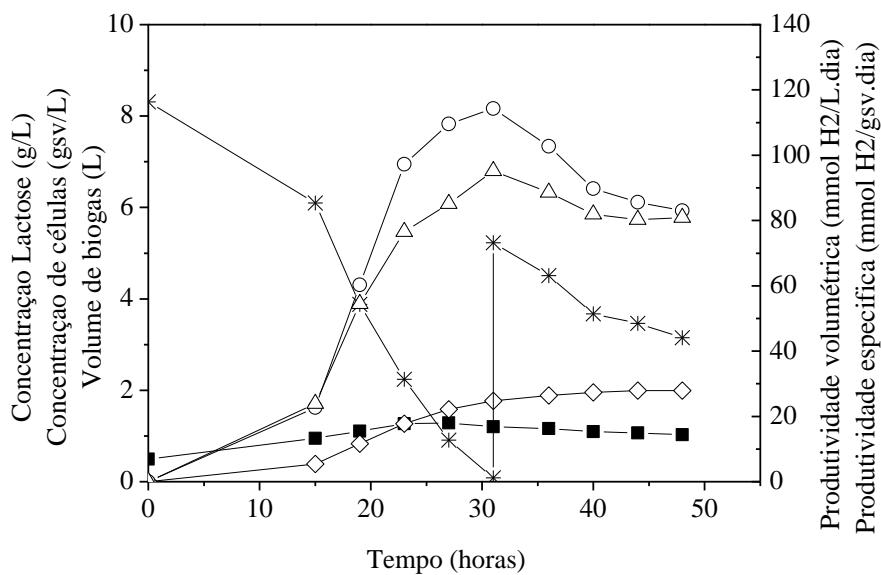


Figura 5.6 Perfil da concentração celular (■), volume de biogás (◊), produtividade volumétrica (○) e específica (Δ) e consumo de lactose (*) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*. Concentração inicial de lactose de 10 g/L, com adição de 5,95 g/L de lactose às 31 h de fermentação, temperatura de 35 ± 3°C.

A análise da Figura 5.7 indica que a tendência observada no ensaio sem adição de lactose durante o processo foi a mesma para os ácidos láctico, acético, butírico e propiônico. A concentração de ácido láctico sofreu um ligeiro aumento, sendo detectada uma concentração final de 14,22 g/L. Para o ácido acético, verifica-se um aumento de 1,88 vezes, variando de 1,35 g/L para 2,53 g/L. Para o ácidos butírico, houve um aumento de 3,6 vezes da concentração. A concentração deste ácido aumentou de 0,81 g/L para 2,92 g/L. Com relação ao ácido propiônico, sua concentração se manteve constante, com aproximadamente, 0,59 g/L.

Para o etanol e o ácido fórmico, observa-se um resultado diferente do ensaio sem suplementar lactose. No experimento com adição de lactose, houve o consumo total de ácido fórmico e houve um aumento da produção de etanol, de 1,64 g/L para 2,49 g/L, o que corresponde a um acréscimo de 52% na sua concentração.

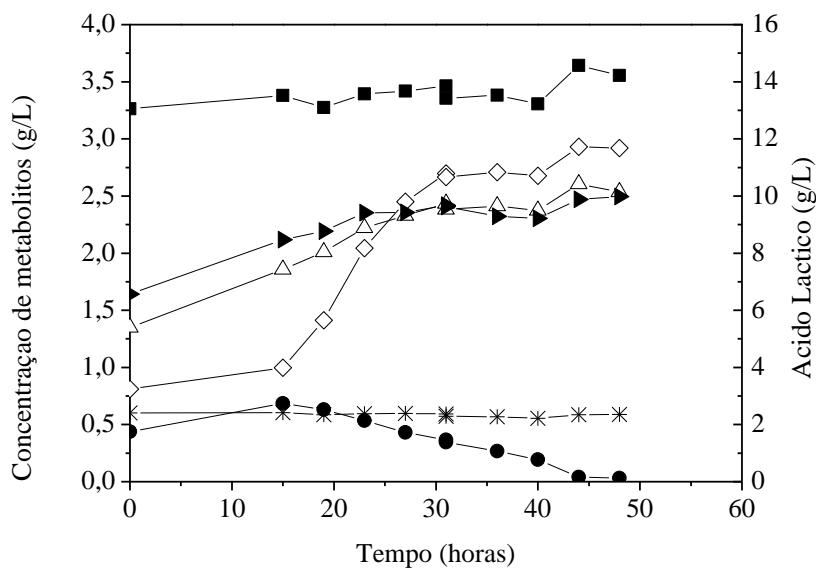


Figura 5.7 Perfil da concentração de ácido fórmico (●), etanol (▲), ácido acético (△), ácido propioníco (*), ácido butírico (◇) e ácido láctico (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*. Concentração inicial de lactose de 10 g/L, com adição de 5,95 g/L de lactose às 31 h de fermentação, temperatura de 35 ± 3°C.

A análise da variação da Razão C/N pela Figura 5.8, revela que este parâmetro se manteve em torno de 14,6 a 17 (mg/mg). O ponto inicial igual a 10,62 se refere a razão C/N do efluente proveniente da fermentação escura, antes da correção de lactose para 10 g/L. E às 31 h, a razão C/N atingiu o valor de 19,69 em virtude da adição de lactose durante o processo.

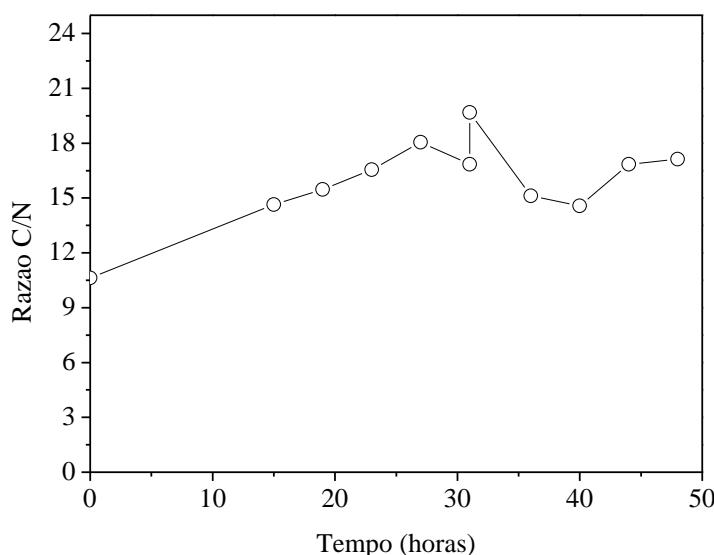


Figura 5.8 Variação da razão C/N (○) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*. Concentração inicial de lactose de 10 g/L, com adição de 5,95 g/L de lactose às 31 h de fermentação, temperatura de 35 ± 3°C.

Com base nos resultados do ensaio sob a **Condição 2**, verificou-se que a adição de lactose durante o processo, mesmo após um consumo de 99% em 31 h, não se obteve aumento significativo na produtividade de hidrogênio. Portanto, no ensaio seguinte (**Condição 3**), optou-se por alterar a fonte de carbono, com o intuito de induzir uma mudança na rota metabólica da *R. capsulatus* que levasse ao aumento da formação de hidrogênio.

Condição 3: As condições deste terceiro ensaio de fotofermentação foram praticamente as mesmas dos ensaios anteriores (**Condições 1 e 2**), variando na temperatura a $35 \pm 3^\circ\text{C}$, na concentração e no tipo de fonte de carbono durante o processo. Neste teste, ajustou-se a concentração inicial de lactose para 8,3 g/L e após 19 h de fermentação, quando houve consumo de 77% deste substrato, adicionou-se glicose na concentração de 7,35 g/L. Os resultados são apresentados na Tabela 5.7 e nas Figuras 5.9 a 5.13.

Tabela 5.7 Dados da produção de H₂ por fotofermentação por *R. capsulatus*, concentração inicial de lactose de 10 g/L, com adição de 7,35 g/L de glicose às 19 h de fermentação, temperatura de $35 \pm 3^\circ\text{C}$.

Tempo (h)	C _{células} (g _{sv} /L)	V _{Gás} (L)	H ₂ acumulado (mol)	Produtividade volumétrica (mmol H ₂ /L.dia)	Produtividade específica (mmol H ₂ /g _{sv} . dia)
0	0,48	0,00	0,00	0,00	0,00
14	1,10	0,60	0,03	78,13	70,92
19	1,21	1,13	0,07	124,73	102,92
Adição de 7,35 g/L de glicose					
23	1,22	1,40	0,08	129,21	106,11
27	1,21	1,55	0,09	119,66	99,21
31	1,21	1,64	0,10	114,01	94,07
37	1,16	1,71	0,11	105,74	91,18
45	1,23	1,93	0,13	103,24	83,98
51	1,79	2,88	0,19	140,41	78,61
58,5	2,17	3,62	0,24	154,10	70,86
69	2,19	4,27	0,28	153,56	70,23
81,5	2,05	4,49	0,30	139,72	68,25
95,5	2,12	4,58	0,30	120,31	56,83
118	2,19	4,91	0,33	107,70	49,13
126,5	2,08	5,04	0,34	106,17	51,14
142	2,04	5,15	0,35	99,00	48,64
152	2,00	5,23	0,36	96,24	48,10

Pela Tabela 5.7, verifica-se uma produtividade de 124,73 mmol H₂/L.dia, em 19 h, no meio contendo apenas lactose como substrato, uma vez que as condições iniciais da

fermentação escura são diferentes da **Condição 2**. A condição inicial da fermentação 3 em g/L: 8,3 de lactose, 12,94 de ácido láctico, 0,32 ácido fórmico, 1,24 de ácido acético, 0,77 de ácido butírico, 0,60 de ácido propiônico, 3,2 de etanol e 0,48 de concentração de célula. A razão C/N foi de 9,51 (mg/mg). Os dados da Tabela 5.7 e das Figuras 5.9 e 5.10 mostram que a adição de glicose promoveu o aumento dos parâmetros avaliados (concentração celular, hidrogênio acumulado, volume de biogás e produtividade) com relação ao ensaio com adição de lactose. Entre 19 h e 152 h, a produtividade máxima foi de 154,10 mmol H₂/L dia, decaindo 37,55% ao final do ensaio (96,24 mmol H₂/L dia).

Observa-se na Figura 5.10 que o crescimento celular passa por uma fase estável, entre 19 h e 45 h (1,21 g_{sv}/L). Nesta fase, nota-se que há uma queda da produtividade e a produção de biogás é reduzido. A concentração celular aumenta até 2,19 g_{sv}/L e mantém-se constante após 60 h de ensaio. Com o aumento das células, verifica-se o aumento da produtividade e aumento significativo do volume de biogás e de hidrogênio produzido. Neste ensaio, teve-se 0,36 mol de H₂ acumulado e uma produção de 5,23 L de biogás.

Quanto à produtividade específica, os valores variaram entre 106,11 mmol H₂/g_{sv}. dia para 23 h de ensaio e 48,10 mmol H₂/g_{sv}. dia em 152 h.

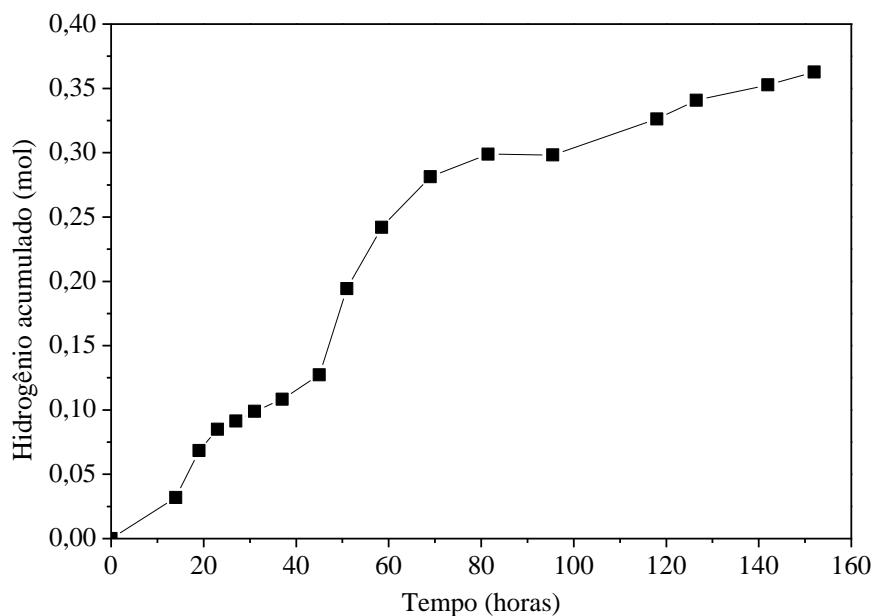


Figura 5.9 Hidrogênio acumulado (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*. Concentração inicial de lactose de 10 g/L, com adição de 7,35 g/L de glicose às 19 h de fermentação, temperatura de 35 ± 3°C.

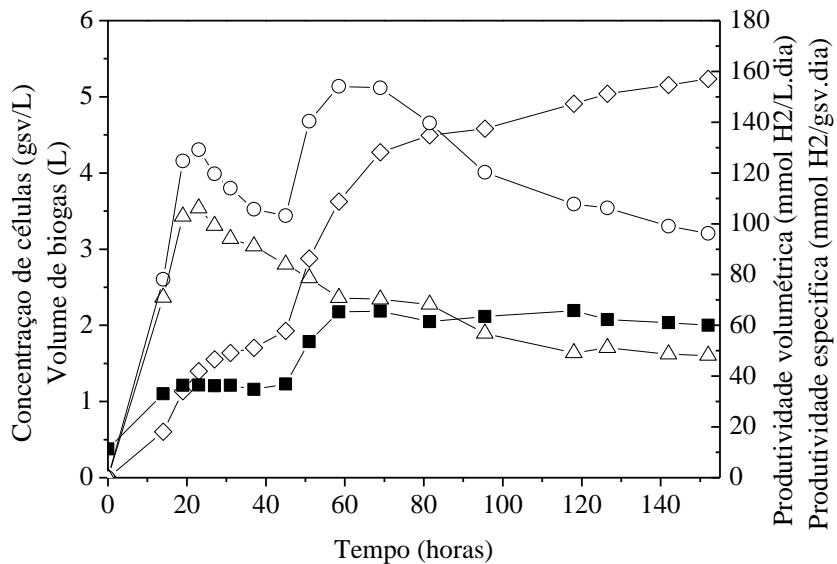


Figura 5.10 Perfil da concentração celular (■), volume de biogás (◊), produtividade volumétrica (○) e específica (Δ) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*. Concentração inicial de lactose de 10 g/L, com adição de 7,35 g/L de glicose às 19 h de fermentação, temperatura de 35 ± 3°C.

A Figura 5.11 ilustra o perfil de concentração dos açúcares presentes no meio de fotofermentação. A lactose foi consumida totalmente em 51 h de processo. A glicose, que foi adicionada às 19 h de ensaio, teve seu consumo total em 69 h.

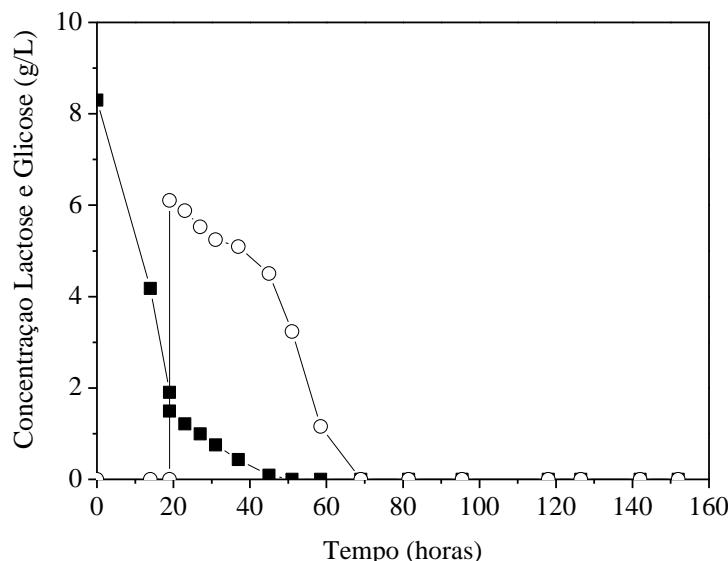


Figura 5.11 Perfil da concentração dos açúcares lactose (■) e glicose (○) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*. Concentração inicial de lactose de 10 g/L, com adição de 7,35 g/L de glicose às 19 h de fermentação, temperatura de 35 ± 3°C.

O perfil de concentração dos metabólitos no ensaio com alteração do tipo de açúcar (glicose) apresentou uma tendência diferente daquela observada no teste com adição de lactose, como pode ser verificado ao comparar as Figuras 5.7 e 5.12. As maiores diferenças foram no consumo do ácido láctico, na baixa produção de ácido propioníco, no consumo do ácido acético e na concentração de etanol que se manteve constante durante o processo.

O ácido láctico se manteve a uma concentração de, aproximadamente, 13,44 g/L no período em que havia apenas lactose e na fase de adaptação das células ao novo substrato, ou seja, até 45h. Após este intervalo, o ácido láctico foi consumido atingindo o valor de 0,59 g/L. Nota-se que o consumo dos ácidos láctico e acético iniciou quando as concentração de lactose era nula e a de glicose era pequena e estava em queda acentuada (ver Figuras 5.11 e 5.12). A concentração do ácido propioníco variou de 0,60 g/L até 1,74 g/L e a do ácido acético variou de 1,24 a 0,72 g/L. Em todo o processo, a concentração de etanol foi inferior a 1,00 g/L.

Neste ensaio houve uma produção significativa de ácido butírico, atingindo o teor de 12,59 g/L ao final das 152 h. O ácido fórmico foi produzido na presença de somente lactose (0,76 g/L) e foi consumido até 0,26 g/L na segunda etapa da fotofermentação, após adição de glicose.

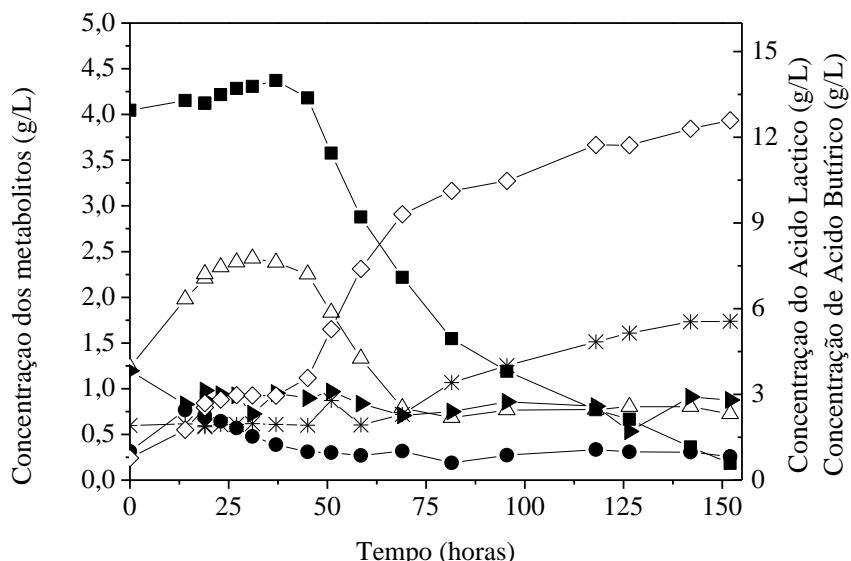


Figura 5.12 Perfil da concentração de ácido fórmico (●), etanol (►), ácido acético (Δ), ácido propioníco (*), ácido butírico (◊) e ácido láctico (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*. Concentração inicial de lactose de 10 g/L, com adição de 7,35 g/L de glicose às 19 h de fermentação, Temperatura de 35 ± 3°C.

Pela Figura 5.13, verifica-se que em relação à razão C/N, o seu valor aumentou para 28,92 (mg/mg) em até 58,5 h e após este tempo, foi mantida constante. E, em todo o processo, independente do tipo de açúcar presente no meio de fotofermentação, o pH foi mantido na faixa

entre 5,2 e 6,2. Na literatura muitos autores avaliaram a melhor relação C/N para a produção do gás hidrogênio, no entanto, não há um consenso com relação a este valor. Alguns indicam que a melhor C/N é 1, com o propósito de evitar que a fonte de carbono seja consumida antes da fonte de nitrogênio. Segundo Eroglu et al. (2011), a relação deve ser 15/2 nM (malato/glutamato) e para Sasikala et al. (1995), o valor de C/N deve ser 30/2-4 para o cultivo de *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. Nesta condição, observa-se que, apesar do alto valor da razão C/N verificada neste ensaio, sendo de duas a quatro vezes superior à registrada por esses autores, esta condição não inibiu a produção do H₂, visto que se obteve resultados promissores. Além disso, os autores não mencionaram nada em relação a um comportamento diferente da razão aumentar e depois se manter constante. Pelo menos, não se foi discutido isso na sua descrição. Foi descrito apenas que o valor foi de 7,5 (15/2) e de 15 (30/2).

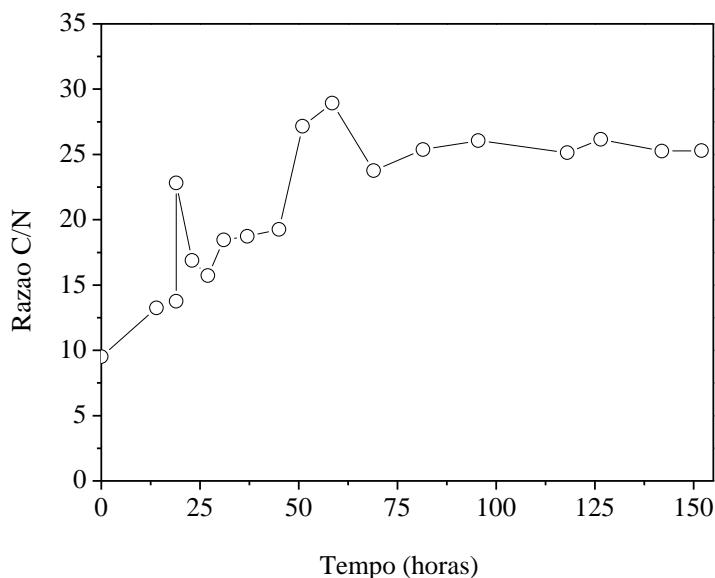


Figura 5.13 Perfil da razão C/N (○) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*. Concentração inicial de lactose de 10 g/L, com adição de 7,35 g/L de glicose às 19 h de fermentação, temperatura de 35 ± 3°C.

A fotofermentação possui capacidade de produzir hidrogênio a partir de bactérias fotossintetizantes por diferentes substratos, ácidos e/ou açúcares. Keskin e Hallenbeck (2012) realizaram um estudo apresentando resultados promissores em que a produção de H₂ por fotofermentação foi avaliada utilizando diferentes substratos: melaço de beterraba, melaço de cana e sacarose nas seguintes concentrações em g/L: 1, 2, 5, 10, 15, 20. A partir dos resultados dos três ensaios realizados, percebeu-se que a *R. capsulatus* teve preferência a consumir açúcares. Com o objetivo de verificar o efeito isolado de cada fonte de carbono como substrato,

isto é, dos metabólitos do efluente da fermentação escura e dos açúcares, nos testes subsequentes, utilizou-se somente ácidos orgânicos e etanol (**Condição 4**) e, no segundo teste, somente o açúcar como fonte de carbono no processo (**Condição 5**).

Condição 4: Neste teste, foi usado como substrato o efluente da fermentação escura sem suplementação de lactose, com o intuito de verificar a influência deste açúcar como fonte de carbono. A composição do efluente usado como substrato para o ensaio de fotofermentação foi de 0,75 g/L de ácido láctico, 0,38 g/L de ácido fórmico, 0,59 g/L de ácido acético, 4,98 g/L de ácido butírico e 1,05 g/L de ácido propiônico. A razão C/N foi de 5,72 (mg/mg).

O ensaio de fotofermentação foi conduzido a $35 \pm 3^\circ\text{C}$ e com concentração inicial de células de 0,51 g/L. Os resultados são apresentados nas Figuras 5.14 a 5.17 e na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 Dados da produção de H₂ por fotofermentação por *R. capsulatus*, utilizando efluente da fermentação escura sem suplementação de lactose como substrato.

Tempo (h)	C _{células} (g _{sv} /L)	V _{Gás} (L)	H ₂ acumulado (mol)	Produtividade volumétrica (mmol H ₂ /L dia)	Produtividade específica (mmol H ₂ /g _{sv} . dia)
0	0,51	0,00	0,00	0,00	0,00
14	0,52	0,03	$7,46 \times 10^{-5}$	0,18	0,57
19	0,52	0,03	$9,08 \times 10^{-5}$	0,17	0,51
35,5	0,56	0,03	$9,45 \times 10^{-5}$	0,09	0,26
47,5	0,50	0,03	$8,03 \times 10^{-5}$	0,06	0,14
66	0,48	0,03	$6,95 \times 10^{-5}$	0,04	0,08

Os dados da Tabela 5.8 e das Figuras 5.14 e 5.15 apontam que todos os dados (concentração celular, hidrogênio acumulado, volume de biogás e produtividade e produtividade específica) são inferiores quando comparados com os ensaios anteriores, indicando que a produção de hidrogênio foi desprezível. A utilização somente de ácidos orgânicos como fonte de carbono não se mostrou viável para produção de hidrogênio por fotofermentação.

Este resultado indica que o sistema híbrido conforme proposto na literatura pode ser aperfeiçoado pela adição de açúcares, como a lactose, obtendo-se significativa evolução de H₂ em ambas as etapas de fermentação escura e fotofermentação, que constituem o sistema híbrido.

Pela Tabela 5.8, verifica-se que se obteve 0,18 mmol H₂/L dia de produtividade máxima, em 14 h, e 0,57 mmol H₂/g_{sv}. dia de produtividade específica e, em seguida observa-se um

decréscimo com o decorrer do tempo. Pela Figura 5.15, nota-se que o crescimento celular possui um pequeno aumento de $0,31 \text{ g}_{\text{sv}}/\text{L}$ para $0,48 \text{ g}_{\text{sv}}/\text{L}$, diferença muito inferior dos demais testes realizados. O volume de biogás produzido foi somente nas primeiras 14 h e depois se manteve constante em 0,03 L. Já o H₂ acumulado apresentou valor máximo de $9,45 \times 10^{-5}$ e diferentemente dos demais ensaios houve uma queda desse H₂ acumulado até $6,95 \times 10^{-5}$ em 66 h, indicando o consumo do hidrogênio inicialmente sintetizado pela *R. capsulatus*.

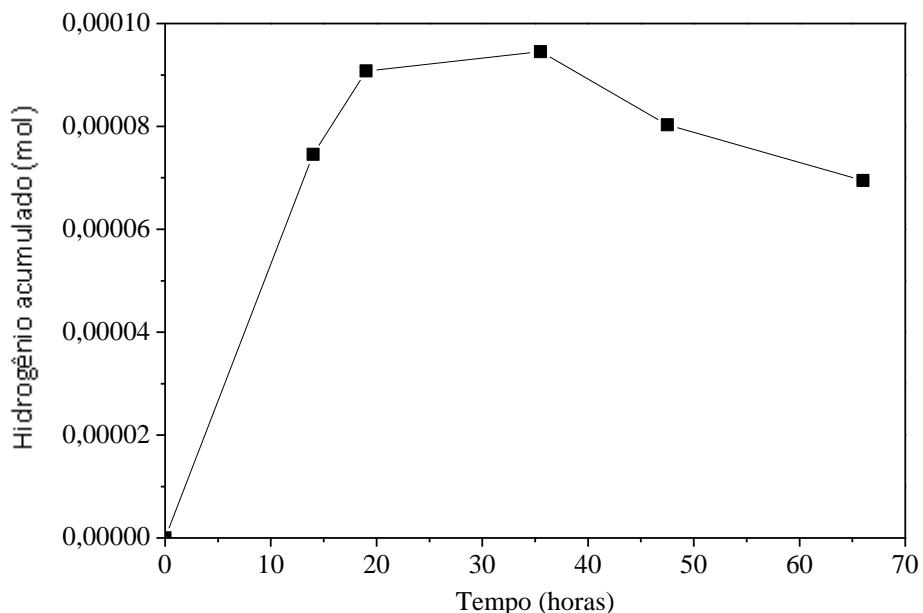


Figura 5.14 Hidrogênio acumulado (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*, utilizando efluente da fermentação escura sem suplementação de lactose como substrato.

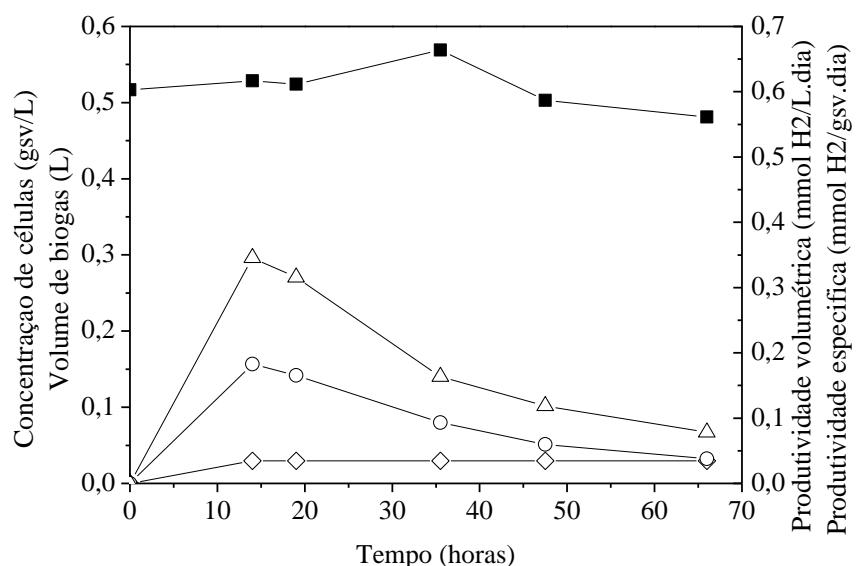


Figura 5.15 Perfil da concentração celular (■), volume de biogás (◊), produtividade volumétrica (○) e específica (Δ) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*, utilizando efluente da fermentação escura sem suplementação de lactose como substrato.

Pela análise dos perfis de concentração dos metabólitos para essa condição, mostrado na Figura 3.16, nota-se que os ácidos láctico e fórmico foram totalmente consumidos após 35,5 h de fermentação. De forma semelhante aos ensaios das **Condições 1e 2**, a concentração do ácido acético aumentou, sendo que neste caso o aumento foi de 3,5 vezes, com variação de concentração de 0,59 g/L até 2,06 g/L ao final das 66 h de fotofermentação.

As concentrações dos ácidos propiônico e butírico mantiveram constante no decorrer do processo em torno de 1,11 g/L e 5,04 g/L, respectivamente. No processo, a concentração de etanol apresentou um aumento de 13%, de 1,18 g/L a 1,33 g/L nas primeiras 14 h e, posteriormente, diminuiu até atingir 0,82 g/L.

Neste teste, ao se usar somente o efluente proveniente da fermentação escura sem suplementação de lactose (10 g/L), a soma do teor de ácidos láctico e butírico, sofreu um decréscimo de 74 a 60% do total dos metabólitos, proporção inferior aos ensaios anteriores, cujos valores determinados compreenderam a faixa de 82 a 84%.

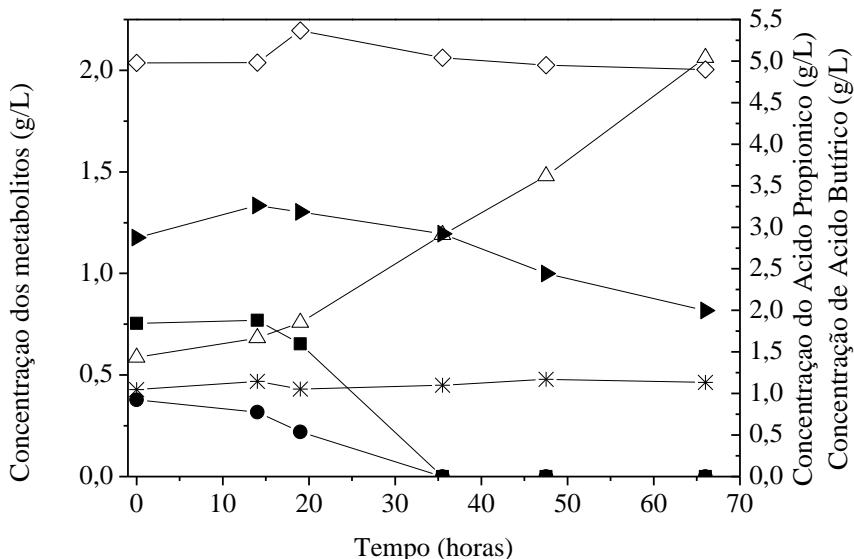


Figura 5.16 Perfil da concentração de ácido fórmico (●), etanol (▶), ácido acético (Δ), ácido propioníco (*), ácido butírico (◊) e ácido láctico (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*, utilizando efluente da fermentação escura sem suplementação de lactose como substrato.

Pela Figura 5.17, verifica-se que em relação à razão C/N, seu valor manteve-se constante em torno de 5,36 (mg/mg) ao longo do processo (66 h). Essa razão foi cerca de 4 vezes menor que nos demais testes, justificado pela presença de somente ácidos orgânicos e etanol no meio,

uma vez que não houve adição de lactose como nas condições anteriores. O pH foi mantido em torno de 6,0.

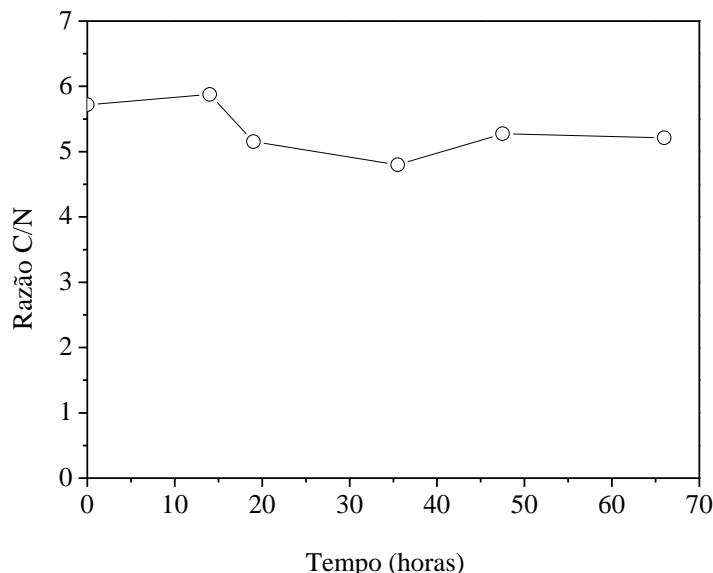


Figura 5.17 Perfil da razão C/N (○) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*, utilizando efluente da fermentação escura sem suplementação de lactose como substrato.

Vale destacar que neste experimento, houve o escurecimento do meio. O mesmo efeito foi observado nos Ensaios 8 (Tabela 5.2) e 16 (Tabela 5.4), cujos ensaios também tiveram baixas concentrações inicial de lactose (sendo 2,27 g/L e 0 g/L, respectivamente). A Figura 5.18 mostra a alteração de coloração (escurecimento) durante a fotofermentação.



Figura 5.18 Biorreator no decorrer da fotofermentação por *R. capsulatus*, utilizando efluente da fermentação escura sem suplementação de lactose como substrato.

Condição 5: Neste teste utilizou-se um meio sintético com lactose (14,54 g/L) com o intuito de avaliar se o efeito da lactose na produção de hidrogênio, na ausência dos metabólitos

produzidos em uma etapa prévia de fermentação escura. A razão C/N do meio foi de 16,06 (mg/mg). A temperatura do experimento foi conduzida a $35 \pm 3^\circ\text{C}$ e com concentração inicial de células de 0,30 g/L. Os resultados são apresentados nas Figuras 5.19 a 5.22 e na Tabela 5.9.

Tabela 5.9 Dados da produção de H₂ por fotofermentação por *R. capsulatus*, utilizando somente lactose (14,54 g/L) como substrato.

Tempo (h)	C _{células} (g _{sv} /L)	V _{Gás} (L)	H ₂ acumulado (mol)	Produtividade volumétrica (mmol H ₂ /L dia)	Produtividade específica (mmol H ₂ /g _{sv} . dia)
0	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00
16	1,77	0,03	$3,16 \times 10^{-4}$	0,68	0,38
22	2,09	0,15	$2,60 \times 10^{-3}$	4,09	1,96
36	1,90	0,22	$5,14 \times 10^{-3}$	4,99	2,62
41	1,81	0,22	$5,86 \times 10^{-3}$	5,05	2,79
60	1,90	0,22	$6,32 \times 10^{-3}$	3,76	1,98

Os dados da Tabela 5.9 e das Figuras 5.19 e 5.20 apontam melhores resultados obtidos sob a **Condição 5** ao serem comparados com os dados do teste sob a **Condição 4**, tendo como fonte de carbono somente o efluente da fotofermentação sem a suplementação da lactose. No entanto, em relação aos demais testes (**Condições 1 a 3**), a formação de hidrogênio foi consideravelmente inferior, com hidrogênio acumulado de $6,32 \times 10^{-3}$ mol em 60 h de processo, produtividades volumétrica e específica máximas foram obtidas em 41 h de processo com 5,05 mmol H₂/L dia e 2,79 mmol H₂/g_{sv}. dia, respectivamente. O volume de biogás produzido foi somente nas primeiras 36 h e depois se manteve constante em 0,22 L e a concentração celular variou de 0,50 g_{sv}/L para 1,90 g_{sv}/L. Com relação ao consumo de lactose, verifica-se uma alta concentração final de lactose (12,05) g/L, correspondendo a um consumo de apenas 17% durante 60 h de fotofermentação.

Este resultado mostra que há um sinergismo entre os metabólitos do efluente da fermentação escura e a lactose como substrato que influenciou positivamente a produção de hidrogênio por fotofermentação pela *R. capsulatus* e que a utilização isolada da lactose ou dos metabólitos da fermentação escura não promoveu melhoria dos parâmetros avaliados.

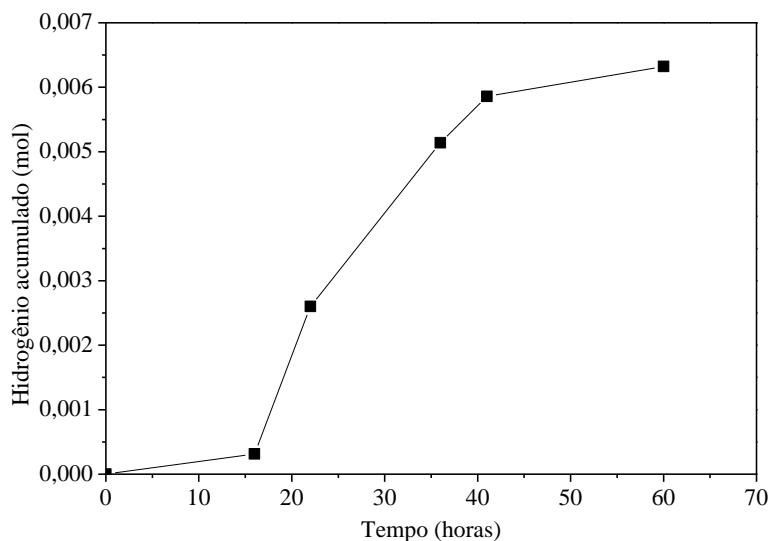


Figura 5.19 Hidrogênio acumulado (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*, utilizando somente lactose (14,54 g/L) como substrato.

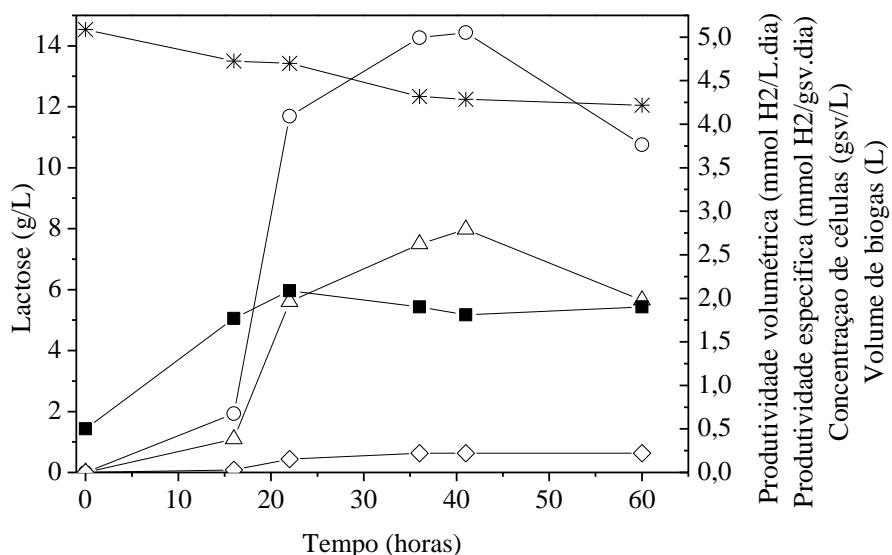


Figura 5.20 Perfil da concentração celular (■), lactose (*), volume de biogás (◊), produtividade volumétrica (○) e específica (Δ) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*, utilizando somente lactose (14,54 g/L) como substrato.

A variação das concentrações dos metabólitos para a **Condição 5** é ilustrada da Figura 5.21. Verifica-se que as concentrações foram ainda menores do que os valores detectados na **Condição 4**, atingindo teores finais em 60 h de processo de 0,85 g/L, 0,36 g/L, 0,06 g/L e 0,40 g/L dos ácidos láctico, acético e propiônico e etanol, respectivamente. A concentração do ácido fórmico apresentou um máximo em 16 h de fotofermentação, sendo totalmente consumido ao final das 60 h. O ácido butírico não foi detectado no decorrer da fotofermentação. A soma dos

percentuais dos ácidos láctico e butírico foram inferiores, pelo fato de não conter ácidos inicialmente aumentou até atingir a proporção de 66% do total dos metabólitos.

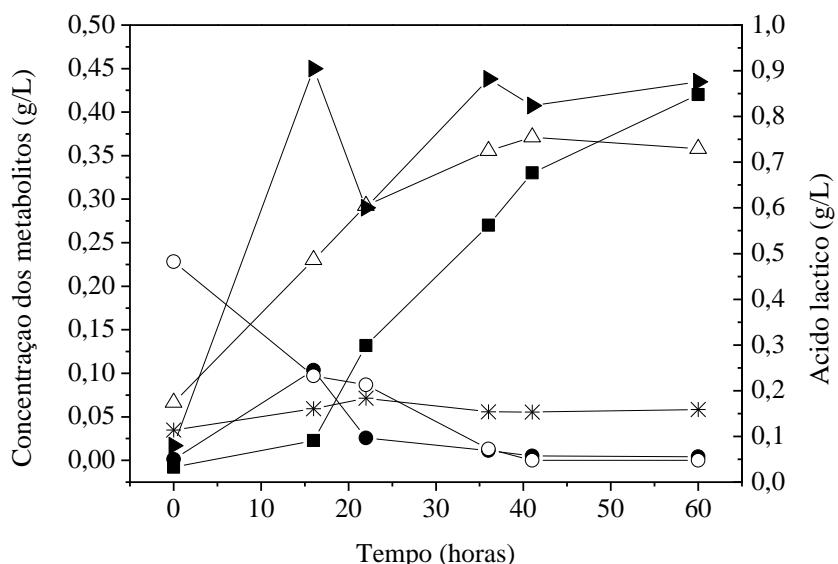


Figura 5.21 Perfil da concentração de concentração de ácido fórmico (●), etanol (►), ácido acético (Δ), ácido propionílico (*), ácido málico (○) e ácido láctico (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*, utilizando somente lactose (14,54 g/L) como substrato.

Pela Figura 5.22 a razão C/N, iniciou-se com 16,06 (mg/mg) e este valor foi mantido constante em 21 (m/m) após 16 h em todo o decorrer do processo. Nesta condição, notou-se uma queda do pH maior do que nos ensaios anteriores, sendo sua variação de 6,8 a 4,35.

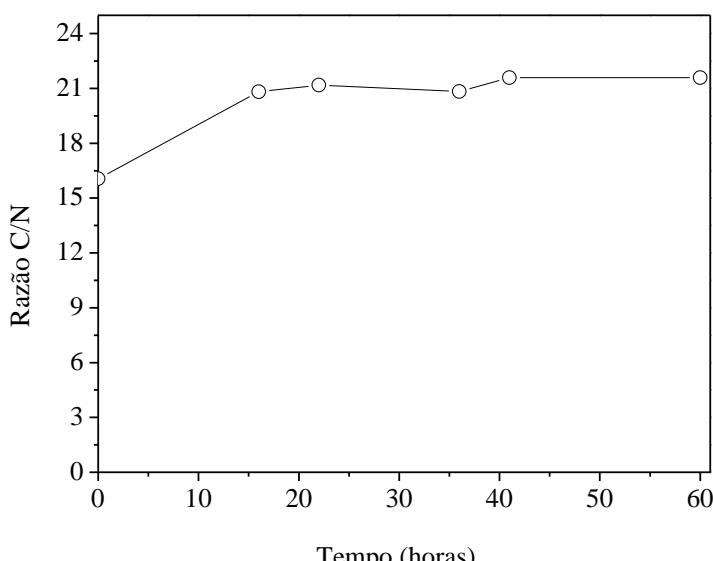


Figura 5.22 Perfil da razão C/N (○) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*, utilizando somente lactose (14,54 g/L) como substrato.

Diante dos resultados de baixa formação de hidrogênio das Condições 4 e 5 ao se utilizar a lactose de forma isolada ou somente o efluente da fermentação escura sem suplementação da lactose, e da maior produtividade de H₂ ao se adicionar glicose durante a fotofermentação, como no ensaio da **Condição 3**, os ensaios seguintes tiveram o propósito de avaliar o desempenho da fotofermentação, primeiramente, mediante a alteração do tipo de açúcar como fonte de carbono na fermentação escura, usando lactose (**Condição 6**) e glicose (**Condição 7**), com adição de glicose repetidamente durante o processo de fotofermentação em ambas condições. O intuito foi verificar se a composição de metabólitos resultante da etapa de fermentação escura melhoraria o potencial de produção de H₂ pela bactéria púrpura não-sulfurosa, além de certificar se a alimentação repetida de glicose prolongaria a evolução de biogás.

Condição 6: Neste ensaio utilizou-se efluente de fermentação escura tendo a lactose como substrato, assim como nas **Condições 1 a 5**. Na etapa de fotofermentação, iniciou-se o processo com adição de 10 g/L de glicose. Entretanto, em contraste ao ensaio da **Condição 3**, o açúcar foi adicionado mais de uma vez durante o experimento, ajustando a concentração de glicose para cerca de 7,8 g/L após 25 h e 60 h de ensaio. A composição do efluente usado como substrato para o ensaio de fotofermentação foi de 1,6 g/L de lactose, 9,68 g de glicose, 4,65 g/L de ácido láctico, 0,71 g/L de ácido fórmico, 3,61 g/L de ácido acético, 3,18 g/L de ácido butírico, e 0,25 g/L de ácido propiônico. A razão C/N inicial foi de 6,77 (mg/mg). A temperatura do ensaio de fotofermentação foi mantido constante a 35 ± 3°C por um banho termostatizado, a concentração inicial foi de células de 0,55 g/L. Os resultados deste ensaio são apresentados na Tabela 5.10 e nas Figuras 5.24 a 5.28.

De acordo com os dados da Tabela 5.10, nota-se que se obteve 70,90 mmol H₂/L.dia de produtividade, em 25 h, no meio antes de adicionar mais substrato. Após a adição de glicose em 25 h de processo, a produtividade atingiu o máximo de 114,80 mmol H₂/L.dia e, em seguida, foi reduzindo mesmo após se adicionar novamente glicose após 60 h de fotofermentação alcançando um valor de 70,83 mmol H₂/L.dia em 72 h de ensaio.

Deve-se salientar que no teste da **Condição 3**, a concentração inicial de lactose de 8,3 g/L e adição de glicose (6,2 g/L) ocorreu após 19 h de processo. Com este procedimento, os valores de produtividade foram superiores a este (Ver Tabela 5.7). Quanto à produtividade específica, na **Condição 6**, encontrou-se uma máxima produção de 46,57 mmol H₂/g_{sv}.dia em 40 h.

Os dados da Tabela 5.10 e das Figuras 5.24 e 5.25 mostram que a concentração celular aumentou de 0,55g_{sv}/L para 2,29 g_{sv}/L antes da primeira adição de glicose. Entre 25 h e 60 h,

manteve-se constante (2,43 g_{sv}/L) e reduzindo para 2,29 g_{sv}/L em 72 h. Neste ensaio o hidrogênio acumulado atingiu 0,14 mol de H₂ em 47 h e se manteve constante durante a fotofermentação. Ao comparar estes dados com o ensaio da **Condição 3**, nota-se a **Condição 3** apresentou maiores valores, sendo volume de biogás de 5,23 L e 0,36 mol de H₂ em 152 h. Nota-se que a produção de hidrogênio foi detectada a partir de 19 h de processo, o que indica que a cultura levou um certo tempo para iniciar esta produção. Este fato pode estar relacionado à composição inicial do efluente da fotofermentação, o que pode ter contribuído para uma baixa de biogás e de hidrogênio.

Tabela 5.10 Dados da produção de H₂ por fotofermentação por *R. capsulatus*. Concentração inicial de glicose de 10 g/L, com ajuste para 7,78 g/L de glicose às 25 h e 7,73 g/L as 60 h de fermentação, temperatura de 35 ± 3°C.

Tempo (h)	C _{células} (g _{sv} /L)	V _{Gás} (L)	H ₂ acumulado (mol)	Produtividade volumétrica (mmol H ₂ /L dia)	Produtividade específica (mmol H ₂ /g _{sv} . dia)
0	0,55	0,00	0,000	0,00	0,00
13,5	0,85	0,07	0,001	2,80	3,29
19	1,77	0,48	0,014	25,48	14,40
25	2,29	1,13	0,051	70,90	30,95
25	Adição de 7,78 g/L de glicose				
28	2,39	1,43	0,078	99,02	41,44
35	2,44	1,84	0,110	111,84	45,81
40	2,46	2,04	0,127	114,80	46,57
47	2,44	2,12	0,139	108,63	44,60
60	2,42	2,12	0,140	83,09	34,36
60	Adição de 7,73 g/L de glicose				
72	2,29	2,12	0,140	70,83	30,92

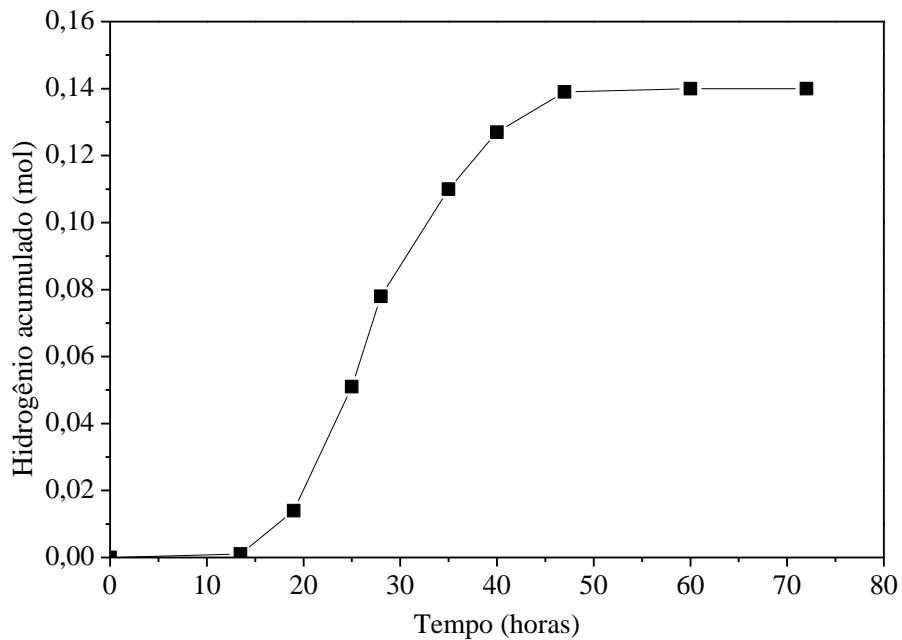


Figura 5.24 Hidrogênio acumulado (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*. Concentração inicial de glicose de 10 g/L, com adição de 7,35 g/L de glicose às 25 h e 7,73 g/L as 60 h de fermentação, temperatura de 35 ± 3°C.

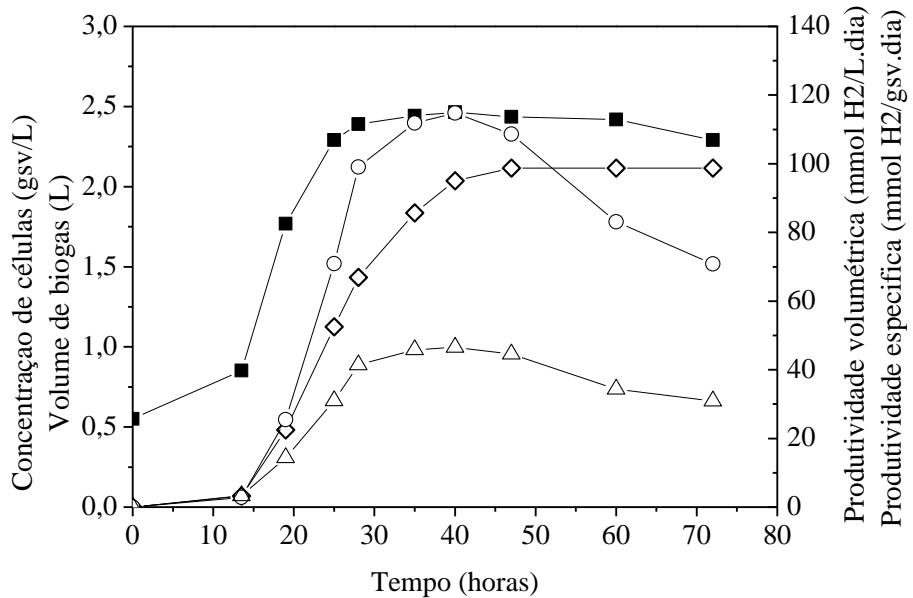


Figura 5.25 Perfil da concentração celular (■),volume de biogás (◊), produtividade volumétrica (○) e específica (Δ) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*. Concentração inicial de glicose de 10 g/L, com ajuste para 7,35 g/L de glicose às 25 h e 7,73 g/L as 60 h de fermentação, temperatura de 35 ± 3 °C.

A Figura 5.26 exibe o perfil de concentração dos açúcares presentes no meio de fotofermentação. No início havia 1,6 g/L de lactose proveniente do efluente da fermentação escura, que foi consumida antes de 20 h de ensaio. A glicose, que foi adicionada inicialmente

(9,68 g/L), teve seu consumo de 64% em 25 h (3,49 g/L). Neste momento, ajustou-se a concentração para 7,78 g/L e em 60 h de processo já havia sido consumido também 64% do substrato (2,80 g/L). A 60 h, ajustou-se novamente a concentração de glicose para 7,73 g/L, no entanto, o consumo foi baixo e a produção de biogás não sofreu incremento, mesmo contendo açúcar presente no meio reacional.

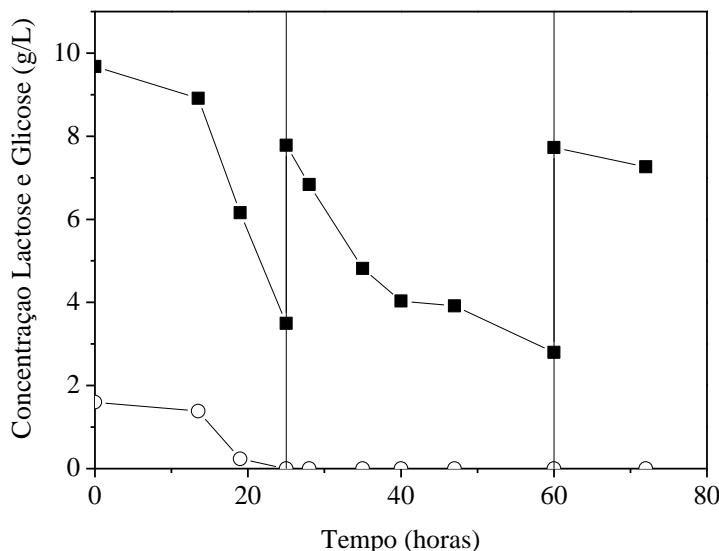


Figura 5.26 Perfil da concentração dos açúcares lactose (○) e glicose (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*, concentração inicial de glicose de 10 g/L, com ajuste para 7,35 g/L de glicose às 25 h e 7,73 g/L as 60 h de fermentação, temperatura de 35 ± 3°C.

Com relação ao teste em que houve adição de glicose durante o ensaio (**Condição 3**), não foi observada a mesma tendência, como pode ser verificado ao se comparar as Figuras 5.12 e 5.27. Enquanto no teste da Condição 3 houve considerável produção de ácido butírico (12,59 g/L) e consumo de 96% do ácido láctico após a adição de glicose, neste experimento sob a **Condição 6**, houve um aumento de 1,62 vezes da concentração de ácidos lácticos, variando de 4,65 g/L para 7,55 g/L, enquanto a concentração de ácido butírico aumentou somente 2 vezes, de 3,18 g/L para 6,28 g/L. O ácido propioníco e o etanol se mantiveram constantes em 0,29 g/L e 0,96 g/L, respectivamente. As concentrações dos ácidos fórmico e acético apresentaram um ligeiro aumento nas 25 h de processo e, sem seguida, se mantiveram constantes em aproximadamente 1,0 g/L e 4,7 g/L, respectivamente. Estas diferenças podem ser justificadas pela diferença de composição dos metabólitos presentes no efluente, apesar de que, nos dois casos, o substrato usado na fermentação escura foi a lactose e pela presença glicose desde o início da fotofermentação.

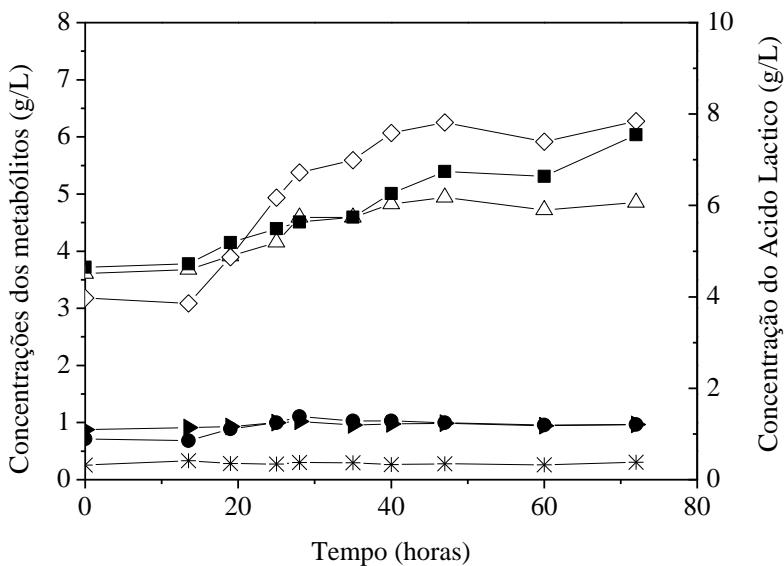


Figura 5.27 Perfil da concentração de ácido fórmico (●), etanol (▲), ácido acético (△), ácido propiônico (*), ácido butírico (◊) e ácido láctico (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*. Concentração inicial de glicose de 10 g/L, com ajuste para 7,35 g/L de glicose às 25 h e 7,73 g/L as 60 h de fermentação, temperatura de 35 ± 3 °C.

Verifica-se que na Figura 5.28 a relação à razão C/N aumentou de 6,0 para 13,0 (mg/mg) com adição de glicose em 25 h e foi mantida constante após este tempo, fato que ocorreu na **Condição 3**, cuja análise da variação da Razão C/N pela Figura 5.13, indica que este parâmetro se manteve em torno de 14,6 a 17 (mg/mg). Quanto ao pH este foi reduzido de 6,8 a 5,14.

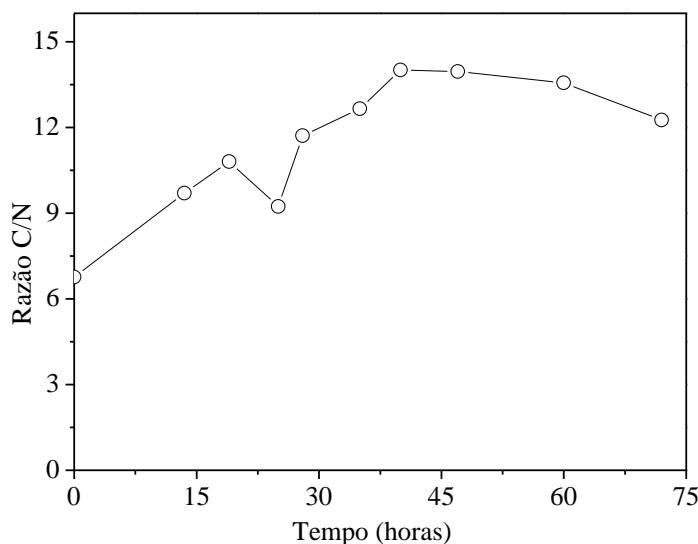


Figura 5.28 Perfil da razão C/N (○) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*. Concentração inicial de glicose de 10 g/L, com ajuste para 7,35 g/L de glicose às 25 h e 7,73 g/L as 60 h de fermentação, temperatura de 35 ± 3 °C.

Condição 7: Este ensaio teve o intuito de avaliar a produção de hidrogênio empregando glicose como substrato, tanto na fermentação escura quanto na fotofermentação. A composição do efluente usado como substrato suplementado com glicose para o ensaio de fotofermentação foi de 10,49 g/L de glicose, 10,38 g/L de ácido láctico, 0,86 g/L de ácido fórmico, 0,25 g/L de ácido acético, 2,00 g/L de ácido butírico e 0,74 g/L de ácido propiônico. A razão C/N foi de 12,5 (mg/mg). A temperatura do ensaio de fotofermentação foi mantida constante a $35 \pm 3^{\circ}\text{C}$ por um banho termostatizado, a concentração inicial de células foi de 0,51 g/L e houve ajuste da concentração de glicose para 9,12 g/L às 28 h de processo e 10,40 g/L às 70 h de processo. Esta fotofermentação teve a duração de 108 h.

Pela Tabela 5.11, observa-se que a produtividade máxima encontrada foi de 42,79 mmol H₂/L.dia, em 28 h, no meio antes de adicionar mais substrato. No experimento anterior (**Condição 6**), a produtividade atingiu uma produtividade de 70,90 em 25 h e, posteriormente, com adição de glicose houve um efeito positivo sobre a evolução de hidrogênio, em que se obteve uma produtividade de 114,80 mmol H₂/L.dia.

Os dados da Tabela 5.11 e das Figuras 5.29 e 5.30 mostram que todos os parâmetros, concentração celular, hidrogênio acumulado, produção de biogás, produtividade volumétrica e específica foram inferiores ao ensaio da **Condição 6**, cujos resultados são apresentados na Tabela 5.10.

Uma das justificativas para a baixa produção de hidrogênio pode ser o baixo crescimento celular, que foi 2,4 vezes inferior ao ensaio da **Condição 6**, com crescimento em torno de 1,0 g_{sv}/L em 28 h e após este tempo se manteve constante. Mesmo com uma maior concentração celular, na **Condição 6** obteve-se valores iguais de máxima produtividade específica 45,50 mmol H₂/g_{sv}. dia em 40 h.

O hidrogênio acumulado demonstrou melhores resultados no teste com as condições anteriores, atingindo 0,14 mol de H₂ com 47 h. Em contraste, o ensaio da **Condição 7** produziu 0,06 mol de H₂ acumulado em aproximadamente 50 h de fotofermentação. Neste mesmo período de processo, a produção de biogás foi de 0,93 L, em contrapartida na **Condição 6** obteve-se 2,12 L próximo a esse tempo. Nota-se que, neste experimento, assim como na condição 6, que a produção de hidrogênio não foi detectada no tempo de 13,5 h, sendo registrada a partir de 22 h de processo, o que pode ter contribuído também para os baixos valores de produção de biogás e de hidrogênio.

Comparando as fermentações 1, 2, 3, 6 e 7, nota-se que a última fermentação foi a única em que não havia concentração inicial de lactose no meio da fotofermentação. Por outro lado, a **Condição 7** foi que obteve menores resultados da produção de hidrogênio, biogás e outras

respostas avaliadas, este fato indica que a presença de lactose inicialmente no meio favoreceu a produção de hidrogênio.

Su et al. 2009 realizaram processo de fermentação escura e fotofermentação a fim de aumentar a produção de H₂ a partir de glicose. Foram usadas as bactérias *Clostridium butyricum* e *Rhodopseudomonas palustris* para fermentação escura e fotofermentação, respectivamente. A produção de gás hidrogênio a partir de glicose na fermentação escura foi mais rápida (96,0 mmol H₂/L.dia) comparado com a fotofermentação (25,97 mmol H₂/L.dia). Assim, mesmo não apresentando valores promissores, os resultados de produtividade volumétrica na **Condição 7** (42,79 mmol H₂/L dia) foram superiores comparado com o resultado obtido pelo autor.

Tabela 5.11: Dados da produção de H₂ por fotofermentação por *R. capsulatus*. Concentração inicial de glicose de 10 g/L, com adição de 9,12 g/L de glicose às 28 h e 10,40 g/L as 70 h de fermentação, temperatura de 35 ± 3°C.

Tempo (h)	C _{células} (g _{sv} /L)	V _{Gás} (L)	H ₂ acumulado (mol)	Produtividade volumétrica (mmol H ₂ /L dia)	Produtividade específica (mmol H ₂ /g _{sv} . dia)
0	0,31	0	0	0	0
13,5	0,52	0,11	0,00	6,72	13,0382
22	1,04	0,45	0,02	25,28	24,3552
28	1,00	0,69	0,03	42,79	42,6626
28	Adição de 9,12 g/L de glicose				
41	0,93	0,89	0,05	42,52	45,5537
51,5	0,95	0,93	0,06	40,08	42,4081
70	1,05	0,93	0,06	30,99	29,5271
70	Adição de 10,40 g/L de glicose				
88	1,00	0,93	0,06	26,06	26,1334
108	1,06	0,93	0,06	20,96	19,7515

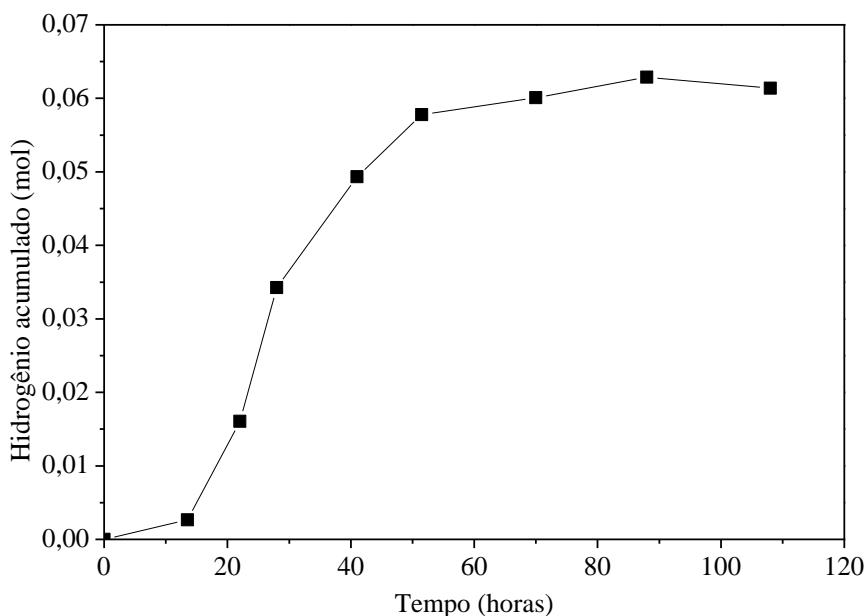


Figura 5.29 Hidrogênio acumulado (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*. Concentração inicial de glicose de 10 g/L, com adição de 9,12 g/L de glicose às 28 h e 10,40 g/L as 70 h de fermentação, temperatura de $35 \pm 3^\circ\text{C}$.

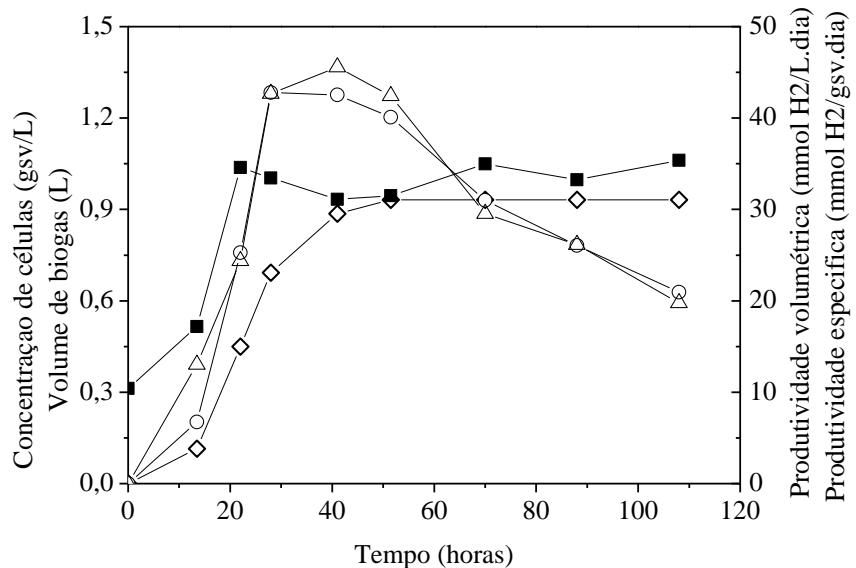


Figura 5.30 Perfil da concentração celular (■), volume de biogás (◊), produtividade volumétrica (○) e específica (Δ) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*. Concentração inicial de glicose de 10 g/L, com adição de 9,12 g/L de glicose às 28 h e 10,40 g/L as 70 h de fermentação, temperatura de $35 \pm 3^\circ\text{C}$.

A Figura 5.31 ilustra o perfil de concentração de glicose no ensaio fotofermentativo sob a **Condição 7**. Observa-se que 73% da glicose foi consumida em 28 h de processo (2,8 g/L). Com o intuito de fornecer mais fonte de carbono ao processo, a concentração de glicose foi ajustada para 9,12 g/L de glicose. Entre 28 h e 70 h, ou seja, em 42 h, 40 % da glicose foi consumida, verificando que o consumo nesta etapa da fotofermentação foi mais lento. Mesmo

ainda havendo glicose no meio, a produção de biogás foi reduzida e, portanto, neste mesmo tempo (70 h) acrescentou-se mais glicose, ajustando sua concentração para 10,40 g/L. Entretanto, há a possibilidade de que esta quantidade de açúcar no meio, neste estágio da fotofermentação, tenha inibido a produção de gás pela *R. capsulatus*. O substrato foi 34,5% consumido em 38 h, mas não foi convertido em hidrogênio, sendo utilizado provavelmente para manutenção das células.

Comportamento semelhante foi observado na fermentação na **Condição 6**, onde a cada adição de glicose o consumo da mesma era cada vez menor. Este fato está indicando que manter o sistema com açúcar sempre presente no meio fermentativo pode acarretar possível inibição para a produção de hidrogênio com o tempo de processo.

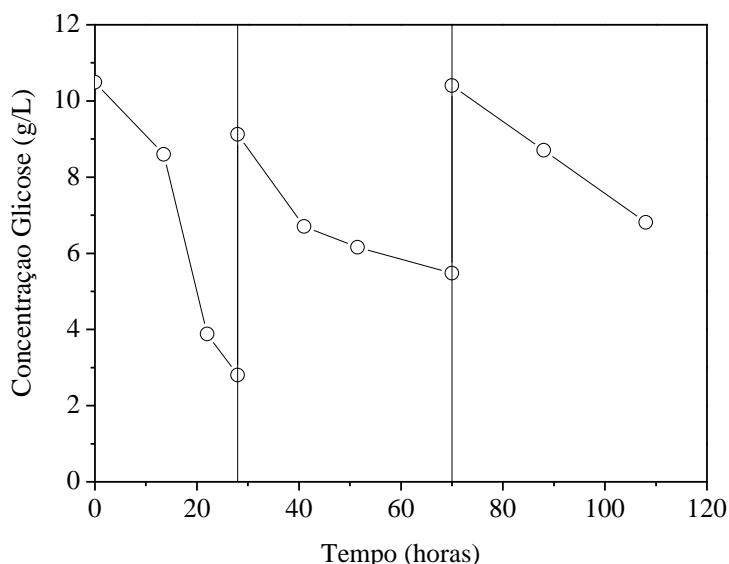


Figura 5.31 Perfil da concentração de glicose (○) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*. Concentração inicial de glicose de 10,49 g/L, com ajuste para 9,12 g/L de glicose às 28 h e 10,40 g/L às 70 h de fermentação, temperatura de 35 ± 3 °C.

O perfil de concentração dos metabólitos evidenciou o aumento da concentração de ácido láctico de aproximadamente 48%, de 10,38 g/L para 15,41 g/L, e do ácido butírico em 58%, de 2,00 g/L para 3,15 g/L, resultados estes que possuem a mesma tendência da condição anterior.

O ácido fórmico e o etanol sofreram incrementos em suas concentrações até a primeira correção do meio com adição de glicose (1,45 g/L e 2,0 g/L, respectivamente). Após esta adição, o ácido fórmico foi consumido, sendo detectado 0,36 g/L em 108 h de processo, diferente do ensaio da **Condição 6** em que permanece constante após adição do açúcar. A concentração de

etanol se manteve constante após a adição de glicose ao meio, com concentração equivalente ao dobro do teste da **Condição 6**.

A concentração de ácido acético aumenta 4,11 vezes durante às 28 horas de processo e permanece constante em 1,12 g/L, concentração bem inferior comparado com o valor advindo da **Condição 6**. O ácido propiônico foi ligeiramente consumido (11%), variando de 0,74 g/L para 0,69 g/L.

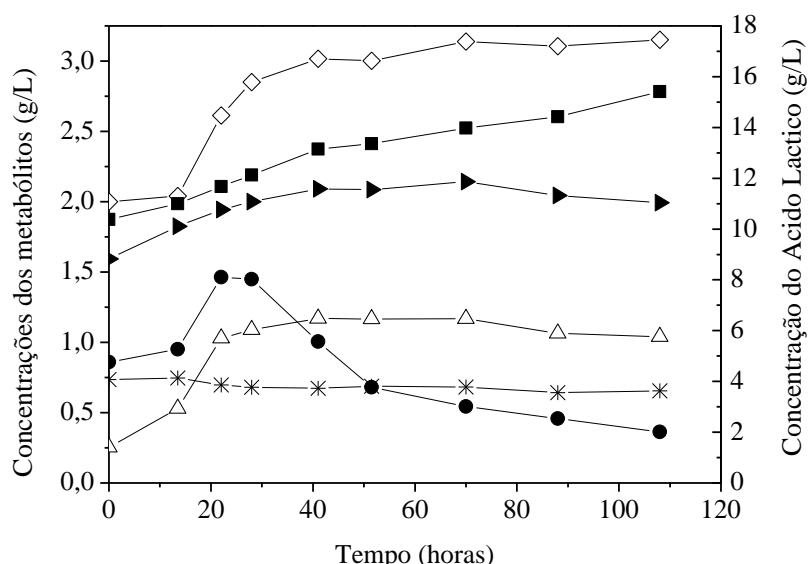


Figura 3.32 Perfil da concentração de ácido fórmico (●), etanol (►), ácido acético (Δ), ácido propiônico (*), ácido butírico (◊) e ácido láctico (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*. Concentração inicial de glicose de 10,49 g/L, com ajuste para 9,12 g/L de glicose às 28 h e 10,40 g/L às de fermentação, temperatura de 35 ± 3 °C.

Pela Figura 5.33, verifica-se que a relação C/N se manteve constante em cerca de 10 (mg/mg) na primeira etapa da fotofermentação, sofreu um aumento de 13,8 (mg/mg) até 21 entre as duas correções do meio pela adição de glicose (28h – 70 h), e seu valor voltou a ser reduzido após a segunda correção do meio pela adição do açúcar, variando de 24,7 (mg/mg) para 16 (mg/mg).

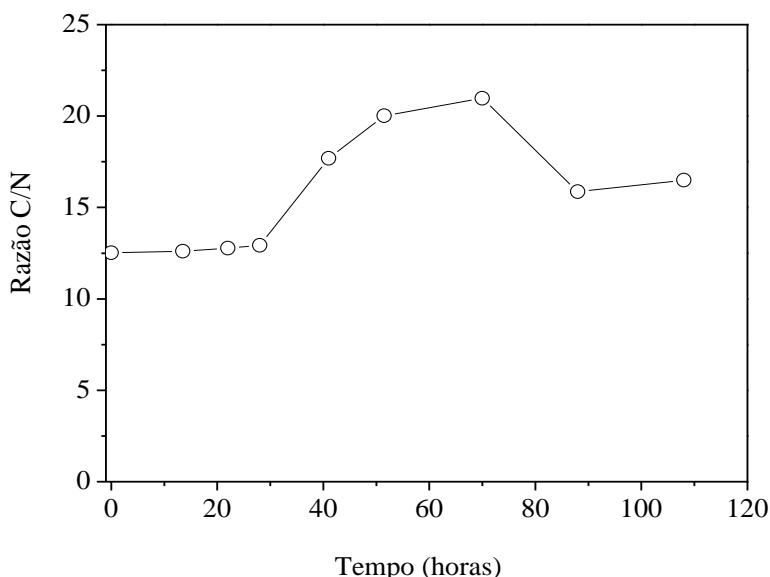


Figura 5.33 Perfil da razão C/N (○) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*. Concentração inicial de glicose 10,49g/L, com ajuste para 9,12 g/L de glicose às 28 h e 10,40 g/L às de fermentação, temperatura de 35 ± 3 °C.

Comparando as **Condições 6 e 7**, que se diferem pelo substrato utilizado na fermentação escura, lactose e glicose, respectivamente, verificou-se que a experimento da **Condição 6** proporcionou resultados promissores em todos os parâmetros avaliados concentração celular, hidrogênio acumulado, produção de biogás, produtividade volumétrica e específica. Assim, nos experimentos seguintes, foi utilizada a lactose como fonte carbono para cultura mista na etapa de fermentação escura.

Além disso, comparando os resultados dos ensaios sob as **Condições 2 e 6** com o ensaio da **Condição 3**, concluiu-se que a alteração entre o tipo de açúcar adicionado ao meio durante a fotofermentação resultou em maior produtividade de hidrogênio pela *R. capsulatus*.

Comparando as fermentações das condições 3, 6 e 7 nota-se que, quando o meio apresenta concentrações de açúcares superiores a 1 g/L, a adição de um novo açúcar não favoreceu a produção de hidrogênio. Desta forma, no ensaio seguinte avaliou-se o desempenho do processo de fotofermentação para produção de hidrogênio, pela correção periódica do meio com a fonte de carbono, alternando o tipo de açúcar (lactose e glicose). Esta correção foi realizada quando houve o consumo total ou a concentração de açúcar no meio era muito baixa. Este procedimento teve como intuito de verificar se esta proposta é suficiente para alterar a rota metabólica da bactéria e consequentemente a composição do meio (o que pode diminuir o efeito de inibição do mesmo para a bactéria) no sentido de prolongar o processo de evolução de hidrogênio com alta produtividade.

Lembrando que nos ensaios das **Condições 2 e 3**, iniciou-se o processo efluente da fermentação escura suplementado com lactose com adição posterior de lactose e glicose, respectivamente. E no ensaio da **Condição 6**, efluente da fermentação escura foi suplementado inicialmente com glicose e adição posterior e periódica de glicose.

Condição 8: Este ensaio teve o intuito avaliar o comportamento da fotofermentação alternando o tipo de substrato a ser adicionado periodicamente durante a fotofermentação. Neste ensaio, a adição da segunda fonte de carbono (lactose ou glicose) foi feito somente após o consumo total do açúcar adicionado anteriormente. Ou seja, a concentração dos açúcares foi monitorada de maneira que ao ser totalmente consumido, o segundo tipo de açúcar já foi adicionado para que não houvesse a falta de substrato. Assim, adicionou-se os açúcares de modo que a concentração para cada alimentação foi mantida em torno de 6 g/L.

A composição do efluente da fermentação escura suplementado com lactose usado como substrato para o ensaio de fotofermentação foi de 9,31 g/L de lactose, 14,12 g/L de ácido láctico, 0,71 g/L de ácido fórmico, 1,21 g/L de ácido acético, 4,61 g/L de ácido butílico e 2,53 g/L de ácido propiônico. A razão C/N foi de 13,80 (mg/mg). O ensaio de fotofermentação foi conduzido a $35 \pm 3^\circ\text{C}$ e com concentração inicial de células de 0,53 g_{sv}/L. O volume do meio foi mantido constante em 700 mL pela reposição de meio de mesma composição ao inicial, prevendo-se que o tempo de processo poderia ser prolongado em um número maior de dias. O tempo total deste ensaio foi de 787 h. Os resultados são apresentados nas Figuras 5.34 a 5.38 e na Tabela 5.12.

Na Figura 5.34 e a Tabela 5.12 observa-se que a quantidade de hidrogênio acumulado ao longo do processo de fotofermentação por *R. capsulatus*, atingiu 1,01 mol de H₂ em 746 h de operação. Na Figura 5.35 nota-se que a máxima produtividade encontrada foi de 208,40 mmol H₂/L.dia em 52 h. Posteriormente a este tempo de processo, a produtividade reduz, sendo que após de 265 h esta queda é gradativa e variando na faixa entre 44 e 60 mmol H₂/L.dia. Quanto à produtividade específica, o maior valor obtido foi de 121,82 mmol H₂/g_{sv}.dia, e posteriormente tendeu a diminuir ligeiramente devido o tempo de processo, conforme esperado, seguindo a mesma tendência da produtividade volumétrica, uma vez que o crescimento celular foi gradual ao longo de todo o ensaio.

Com relação ao crescimento celular, verifica-se que houve uma variação da concentração de célula de 0,530 g_{sv}/L a 2,5 g_{sv}/L até 424 h e manteve-se constante até o final do processo. A máxima produção de biogás observada em 787 h de experimento foi 8,273 L.

Tabela 5.12 Dados da produção de H₂ por fotofermentação por *R. capsulatus*, com alteração do tipo de açúcar (lactose e glicose) alimentado periodicamente ao meio. Temperatura de 35 ± 3 °C.

Tempo (h)	C _{células} (g _{sv} /L)	V _{Gás} (L)	H ₂ acumulado (mol)	Produtividade volumétrica (mmol H ₂ /L dia)	Produtividade específica (mmol H ₂ /g _{sv.} dia)
0	0,53	0,000	0,00	0,00	0,00
21	1,03	0,401	0,02	35,16	34,26
23	1,36	0,611	0,04	66,42	48,74
23 Adição de 8,51 g/L de glicose					
27	1,52	0,939	0,10	131,05	86,26
31,5	1,72	1,299	0,17	189,99	110,31
34	1,74	1,480	0,21	207,78	119,43
45	1,69	1,847	0,27	204,17	120,98
52	1,71	2,142	0,32	208,40	121,82
57,5	1,75	2,346	0,35	208,00	119,16
84	1,64	2,602	0,38	155,26	94,61
100	1,64	2,713	0,39	133,39	81,28
100 Adição de 6,76 g/L de lactose					
123	1,59	2,910	0,42	115,73	72,57
142	1,70	3,051	0,43	104,29	61,38
142 Adição de 6,21 g/L de glicose					
156	1,98	3,153	0,44	97,79	49,30
167	1,85	3,235	0,45	92,79	50,16
178,5	1,77	3,290	0,45	86,59	48,95
197,5	1,71	3,330	0,45	77,84	45,50
200	1,72	3,360	0,45	77,00	44,77
200 Adição de 6,19 g/L de lactose					
211	1,73	3,418	0,46	74,84	43,31
218	1,71	3,448	0,46	72,82	42,57
235,5	1,69	3,517	0,47	68,19	40,27
243	1,69	3,553	0,47	66,74	39,41
254	1,74	3,586	0,48	64,24	36,92
254 Adição de 7,00 g/L de glicose					
265	1,76	3,638	0,48	62,64	35,65
281	1,77	3,763	0,50	60,64	34,17
290	1,75	3,854	0,50	59,65	34,06
303	1,79	3,996	0,52	58,60	32,70
312	1,82	4,094	0,53	58,40	32,07
312 Adição de 5,83 g/L de lactose					
328	1,90	4,228	0,55	57,28	30,11
336	1,87	4,287	0,56	56,87	30,36
353	1,88	4,435	0,58	55,98	29,70

Tempo (h)	C _{células} (g _{sv} /L)	V _{Gás} (L)	H ₂ acumulado (mol)	Produtividade volumétrica (mmol H ₂ /L dia)	Produtividade específica (mmol H ₂ /g _{sv.} dia)
361	1,98	4,550	0,59	55,99	28,31
361				Adição de 4,99 g/L de glicose	
378	2,20	4,720	0,61	55,46	25,16
385	2,35	4,825	0,62	55,56	23,65
400	2,41	4,976	0,64	54,93	22,77
400				Adição de 5,94 g/L de lactose	
408	2,43	5,101	0,65	54,89	22,59
424	2,55	5,311	0,68	54,73	21,45
431	2,52	5,406	0,69	54,54	21,62
450	2,48	5,554	0,70	53,54	21,62
457	2,48	5,642	0,71	53,45	21,53
472	2,44	5,826	0,74	53,41	21,93
478	2,52	5,927	0,75	53,56	21,23
478				Adição de 6,22 g/L de glicose	
494	2,66	6,193	0,78	54,35	20,41
503	2,78	6,396	0,81	55,32	19,87
517	2,78	6,600	0,84	55,55	20,00
524	2,77	6,679	0,85	55,39	19,98
524				Adição de 4,60 g/L de lactose	
544	2,75	6,849	0,87	54,81	19,90
551	2,64	6,938	0,88	54,66	20,71
568	2,64	6,997	0,88	53,33	20,17
575	2,49	7,023	0,88	52,76	21,16
575				Adição de 4,90 g/L de glicose	
593	2,48	7,102	0,90	51,89	20,95
600	2,46	7,161	0,90	51,57	20,92
617	2,41	7,272	0,92	51,11	21,18
624	2,36	7,354	0,93	51,20	21,69
624				Adição de 7,72 g/L de lactose	
638	2,61	7,436	0,94	50,64	19,40
646	2,75	7,479	0,96	50,80	18,44
662	2,64	7,525	0,97	50,16	18,97
672	2,55	7,567	0,97	49,63	19,49
684	2,55	7,600	0,97	48,54	19,02
684				Adição de 6,59 g/L de glicose	
705	2,53	7,886	0,99	48,09	18,97
721	2,52	8,079	1,00	47,75	18,93
721				Adição de 5,17 g/L de lactose	
746	2,51	8,207	1,01	46,50	18,56
767	2,49	8,243	1,01	45,19	18,12
787	2,51	8,273	1,01	44,00	17,52

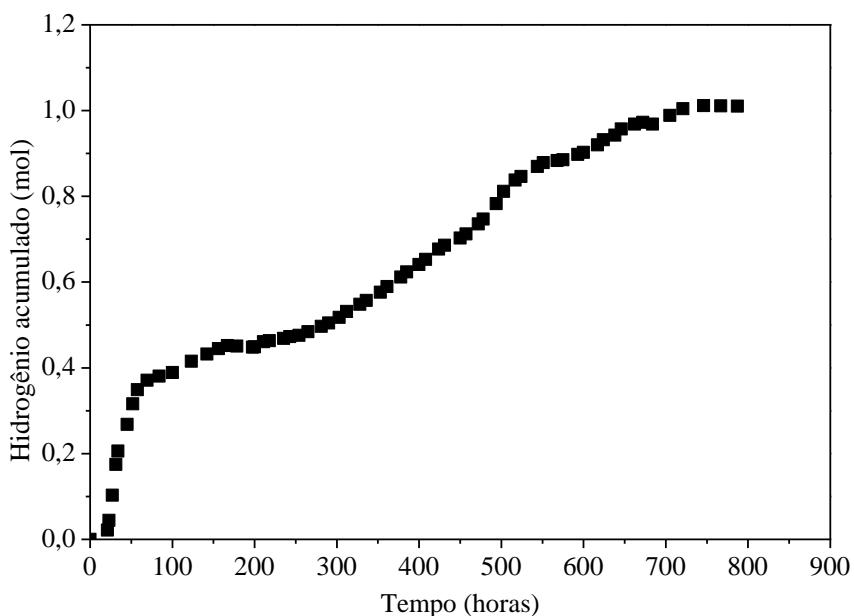


Figura 5.34 Hidrogênio acumulado (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*. Revezamento de lactose e glicose temperatura de $35 \pm 3^\circ\text{C}$.

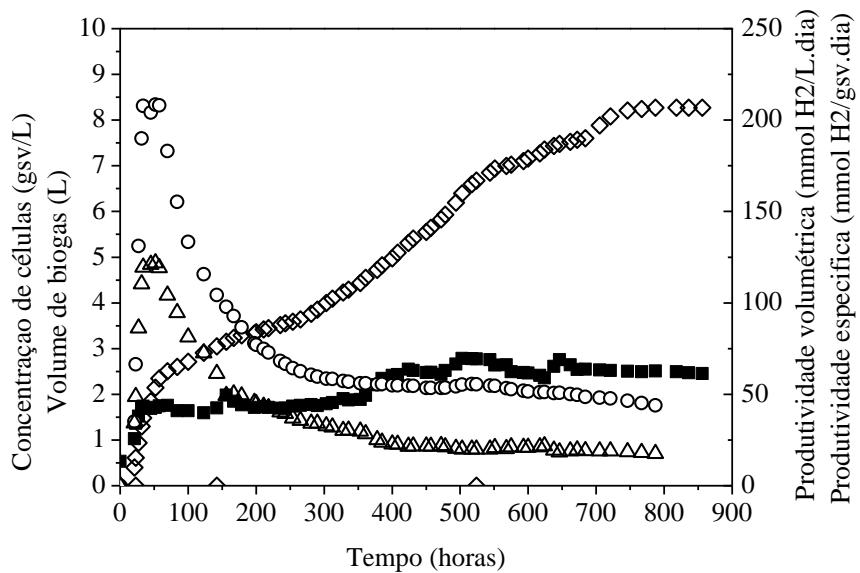


Figura 5.35 Perfil da concentração celular (■), volume de biogás (◊), produtividade volumétrica (○) e específica (Δ) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*, com alteração do tipo de açúcar (lactose e glicose) alimentado periodicamente ao meio, temperatura de $35 \pm 3^\circ\text{C}$.

Em relação à adição de substrato no decorrer do processo fotofermentativo, ilustrada na Figura 5.36, constatou-se que a variação entre glicose e lactose se mostrou promissor na extensão do processo de produção de hidrogênio por fotofermentação pela *R. capsulatus*, tendo em vista que mesmo após 787 h de ensaio, houve total degradação destas fontes de carbono após a sua adição ao meio, indicando que todos os parâmetros avaliados foram

consideravelmente melhores do que todas as condições anteriormente avaliadas, inclusive do ensaio da **Condição 3**.

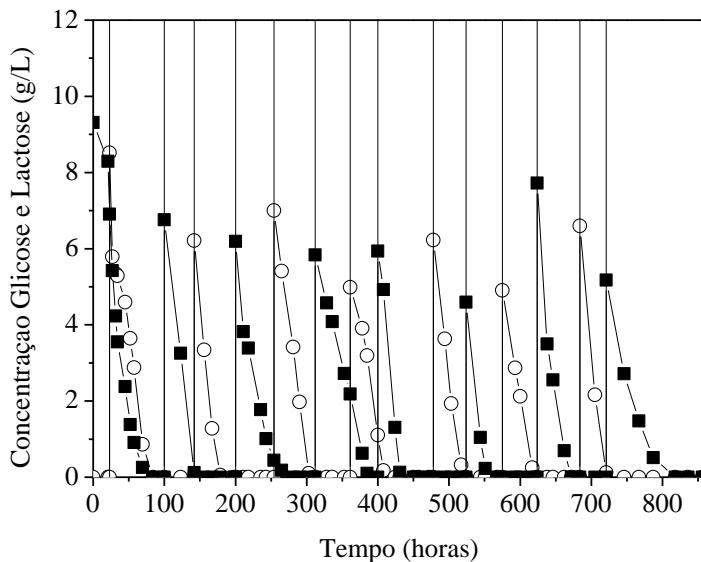


Figura 5.36 Perfil da concentração de substrato em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*, com alteração do tipo de açúcar, lactose (■) e glicose (○), alimentado periodicamente ao meio, temperatura de $35 \pm 3^\circ\text{C}$.

A Figura 5.37 mostra o perfil de variação das concentrações dos metabólitos. Nota-se que os ácidos orgânicos mais produzidos foram os ácidos láctico e butírico, sendo que o primeiro chegou a uma concentração de aproximadamente 32 g/L e o segundo atingiu (15 g/L). Entretanto, a produção de ácido butírico foi consideravelmente maior. Deve-se ressaltar, que o aumento da concentração destes ácidos verificado na **Condição 8** é um resultado contrário ao observado na **Condição 3**, em que após a adição de glicose, houve o consumo do ácido láctico. Porém, vale ressaltar que, na **Condição 3** não houve mais adição de açúcar depois da glicose. Portanto a bactéria consumiu sensivelmente os ácidos porque não havia açúcar no meio. A soma da porcentagem dos ácidos láctico e butírico, para o ensaio sob a **Condição 8**, variou entre 80 a 85%, assim como observado nos melhores resultados obtidos nos ensaios de escala reduzida e do ensaio da **Condição 1 a 3** em biorreator de 1,5 L.

O ácido propiônico aumentou aproximadamente 2,5 vezes em relação ao seu valor inicial no decorrer do processo, apresentando um valor de 6,25 g/L em 524 h e, em seguida, sofreu um declínio de 40% com o valor final de 3,74 g/L em 787 h.

Verifica-se ainda houve uma baixa produção do ácido fórmico até 84 h (1,67 g/L) e, posteriormente, ao longo do ensaio este ácido foi consumido apresentando uma concentração

final de até 0,63 g/L em 787 h. A concentração do ácido acético oscilou durante a fotofermentação apresentou picos de concentração, mas de forma geral, sua concentração oscilou entre 1,21 g/L, inicialmente, e 3,75 g/L em 787 h de processo. O teor de etanol variou na faixa entre 2,29 a 3,26 g/L durante a fotofermentação.

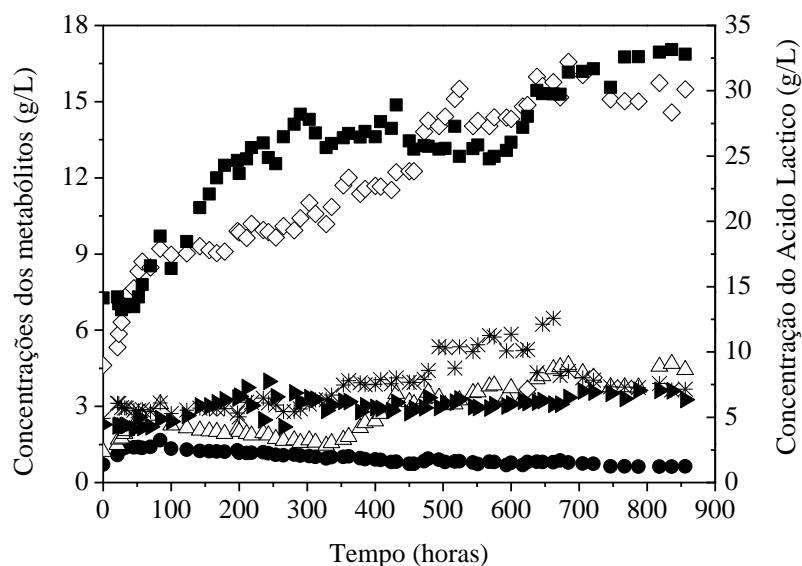


Figura 5.37 Perfil da concentração de ácido fórmico (●), etanol (►), ácido acético (Δ), ácido propiônico (*), ácido butírico (◊) e ácido láctico (■) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*, com alteração do tipo de açúcar (lactose e glicose) alimentado periodicamente ao meio, temperatura de $35 \pm 3^\circ\text{C}$.

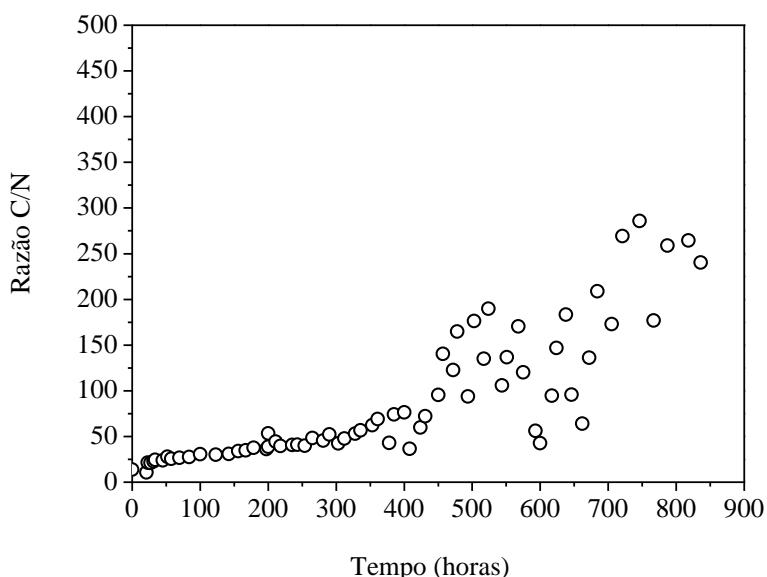


Figura 5.38 Perfil da razão C/N (○) em função de tempo no ensaio de fotofermentação por *R. capsulatus*, com alteração do tipo de açúcar (lactose e glicose) alimentado periodicamente ao meio, temperatura de $35 \pm 3^\circ\text{C}$.

Ao analisar a Figura 5.37, observa-se que a razão C/N apresenta uma razão na faixa de 25 a 50 (mg/mg) até 350 h e após este período os valores oscilaram consideravelmente, mas se observa uma tendência no aumento deste parâmetro. A relação de C/N, após 500 h atingiu valores altos de 100 (mg/mg). Ao contrário do descrito por Özgur et al. (2010 a) que observaram que a maior produção encontrada foi na razão C/N de 35, e que altas razões C/N inibem a produção de hidrogênio, neste ensaio, mesmo com altos valores, houve a manutenção da formação de hidrogênio por um período longo de tempo. O incremento da relação C/N durante a fermentação é fundamental para a produção de hidrogênio por bactérias fotossintetizantes (EROGLU, et al. (1999). De acordo com a literatura, não há uma definição sobre o valor exato da razão C/N. Conforme indicado anteriormente, o melhor resultado para Eroglu et al. (2011) foi de 15/2 (7,5) e para Sasikala et al. (1995) foi de 30/2 (15). Já para Androga (2009), a ótima relação foi de 20 em operações contínuas por *R. capsulatus hup*. Nestas condições, a amônia presente no efluente da fermentação escura foi completamente utilizada e nenhuma inibição amoníaco foi observada. Para obter alta produtividade em hidrogênio é essencial que nas fermentações o efluente tenha baixo teor de amoníaco uma vez que a amônia é o forte inibidor do enzima nitrogenase (OZGUR et al., 2010a).

Os resultados da Tabela 5.12 e das Figuras 5.34 e 5.35 mostram que inicialmente ocorreu um aumento acentuado na produção de hidrogênio, no volume de gás, na produção de ácido butírico até 70 h de processo. A produtividade volumétrica e específica atingiu valores máximos neste intervalo de tempo. Neste período observa-se que houve também acentuada produção de célula, produção de ácido acético e a produção de ácido lático e propiônico permaneceram praticamente constantes.

Entre 70 e 200 h a produção de hidrogênio e de gás aumentou muito pouco, observou-se que as concentrações de célula e de ácido butírico permaneceram praticamente constantes, a produção de ácido acético diminuiu enquanto a produção de ácido lático aumentou. Entre o intervalo de 200 à 550 h nota-se que a produção de hidrogênio, de gás e de ácido butírico aumentam numa taxa menor que a inicial, sugerindo que houve mudança na cinética de produção destes bioproductos. A produção de ácido acético volta a aumentar após 320 h, a do ácido lático permanece constante, a do ácido propiônico aumenta e a célula retorna a crescer após 300 h de processo. Neste intervalo de tempo as produtividades volumétrica e específica diminuíram lentamente e permaneceram constantes, após 300 h de processo. Após 550 h a produção de hidrogênio, de gás e de ácido butírico aumenta ainda mais lentamente e tende a um patamar 15 g/L após 700 h de processo. As produtividades volumétricas e específicas diminuem, a produção de ácido lático volta a aumentar, a do ácido acético e propiônico

diminuem após 700 h e a concentração de células permanece constante. Esta análise mostra que o ácido que acompanhou o comportamento da produção de hidrogênio e de gás foi o butírico, evidenciando que nestes ensaios este ácido foi importante para a manutenção da produção de hidrogênio por um longo tempo de processo. O aumento do ácido láctico não favoreceu a produção de hidrogênio. O crescimento celular e a aumento na produção de ácido acético foi importante em vários intervalos de tempo. A técnica de alternância dos açúcares foi importante para a manutenção da produção de hidrogênio por um maior período de tempo de processo e os resultados obtidos indicam que, este procedimento, alterou o metabolismo da bactéria.

Por este trabalho, foi possível aperfeiçoar a produção de hidrogênio empregando efluente da fermentação escura, obtendo-se valores de produtividade de hidrogênio consideravelmente superiores as da literatura, como pode ser verificado nos resultados dos trabalhos descritos a seguir.

Özgür et al. (2010b) avaliaram a fotofermentação por *R.capsulatus* usando como substrato os efluentes da fermentação escura de melaço de beterraba, glicose e hidrolisados de casca de batata a vapor. Os parâmetros avaliados foram a correção do meio com ferro (0,1 mM de citrato de Fe), molibdênio (0,16 µM Na₂MoO₄·2H₂O) e tampão (20 mM de fosfato de potássio, pH 6,4)e o efeito da diluição do meio para reduzir a concentração inicial de acetato. Iluminação de 150 – 200 W/m² a 30°C. A composição inicial de cada efluente foi a seguinte: efluente de glicose, ácido acético 114 mM, ácido láctico 6 mM, glicose não convertida 34mM e amônia 1mM; efluente de melaço, ácido acético 86 mM, ácido láctico 69 mM, razão C/N de 34, sacarose não convertida 2,7 mM e sem amônia; e para o efluente de hidrolisados de casca de batata a vapor ácido acético 102 mM, ácido láctico 28 mM, sacarose não convertida 2,7 mM e amônia 4 mM. Os autores observaram que a maior produtividade de H₂ ocorreu para condições em que a concentração de ácido acético foi ajustada para 30 – 40 mM, concentração de amônia menor que 1mM e para o meio com adição de ferro e molibdênio. Eles destacam que para os efluentes do hidrolisado e de melaço de beterraba foi necessária a adição de tampão para evitar queda de pH e mantê-lo estável em torno de 6,8 – 7,4. Os valores de produtividade volumétrica obtidos foram de 9,6 mmolH₂/L·dia, 26,4 mmolH₂/L·dia, 13,2 mmolH₂/L·dia para os efluentes de glicose, melaço de beterraba e hidrolisado de casca de batata, respectivamente.

Boran et al. (2012) avaliaram a produção de H₂ em escala piloto (90 L), com temperatura abaixo de 35°C, em processo contínuo usando efluente de fermentação escura, sendo a composição do meio corrigida com citrato de Fe (0,102 mM), molibdênio (0,165 µM Na₂MoO₄·2H₂O) e tampão (22 mM de fosfato de potássio e o pH da alimentação de 6,4. O meio foi diluído de forma a se ter uma concentração inicial de ácido acético de 30-40 mM. Após o

início da produção de H₂ (fase exponencial), o biorreator foi operado em batelada alimentada (10 L/dia), sendo que todos os dias o meio foi renovado (retirando 10 L) com o intuito de manter a concentração de células de 1 g/L, suplementar fonte de C e N e manter a razão C/N e outros nutrientes. A produtividade média de H₂ foi de 3,6 mmol H₂/L·dia, contendo 95% de H₂ e 5% de CO₂. Os autores justificam um valor baixo da produtividade em virtude da permeabilidade de H₂ pela PEBD. Quanto aos demais elementos, os autores verificaram que a razão C/N aumentou de 16 para 42 e, neste máximo, houve produção de PHB (0,1 g PHB/g massa seca); a concentração de amônia reduziu de 3,6 mM e se manteve abaixo de 1 mM durante a produção de H₂, de molibdênio de 0,17 para 0,11 µM; de Fe de 102 para abaixo de 5,5 mM; de etanol permaneceu constante e ácido glutâmico de 0,77 mM para 0,05 mM. Com relação a fonte de C principal, a concentração de ácido acético reduziu continuamente durante os 9 dias (de 30 mM para abaixo de 2 mM) e a produção de outros ácidos orgânicos foi desprezível.

Argun et al. (2008) analisaram o potencial de três cepas de *Rhodobacter sphaeroides* na produção de H₂, a partir do efluente da fermentação escura de solução de trigo em pó, e verificaram que o ensaio com o inóculo composto pelas três levou a melhores resultados que os ensaios com cultura pura. Com a cultura mista os pesquisadores investigaram o efeito da concentração total de ácidos orgânicos e de amônia no efluente. As condições iniciais foram pH 7,45 e mantido entre 7,2 – 7,5 e concentração de célula de 0,55 g/L. A fotofermentação ocorreu sob 30°C e intensidade luminosa de 5500 lux. As concentrações de ácidos orgânicos totais e amônia variaram de 1.200 a 5.800 mg/L e de 18 a 185 mg/L, respectivamente. Neste estudo, constatou-se que abaixo ou acima de 2350 mg/L de ácidos orgânicos totais ocorreu limitação de substrato ou inibição da produção de H₂, respectivamente. No entanto, a fase lag foi a mais longa com 99 h. Nesta mesma condição, a concentração de NH₄⁺ foi de 50 mg/L (2,7 mM) e volume máximo de H₂ obtido foi de 63,5 mL em cerca de 170 h.

Afsar et al. (2011) avaliaram a produtividade volumétrica de diferentes bactérias fotossintéticas, a fonte carbono utilizada foi efluente da fermentação escura onde utilizou-se glicose como substrato. A fotofermentação foi realizada em biorreatores de 55 mL, mantendo o meio anaeróbio, com uma intensidade de luz de 150 e 200 W / m² na superfície. Em uma temperatura de 30° C. Continha no meio da fermentação escura acetato, lactato, como ácidos orgânicos e glicose como açúcar.

Os resultados referentes a produtividade em mmol H₂/L.dia foram: 10,32 (*Rb. capsulatus*), 14,88 (*Rb. capsulatus hup⁻*), 28,32 (*Rb. Sphaeroides*), 20,16 (*Rb. sphaeroides hup⁻*), 7,92 (*Rb. palustris*).

Özgür e Peksel (2013) utilizaram dois diferentes efluentes da fermentação escura, realizando a fermentação com ou sem adição de extrato de levedura (YE). Avaliaram os efeitos da adição de YE durante a fermentação escura e a suplementação Fe/Mo para o meio da fotofermentação. A fotofermentação foi realizada em biorreatores de 55 mL, mantendo o meio anaeróbio, com uma intensidade de luz de 114 W/m² na superfície. Em uma temperatura de 30° C. As produtividades volumétricas para *R. capsulatus* DSM1710 e *Rb. capsulatus* hup⁻ Y03 foram: 11,76 e 13,92 mmol H₂/L.dia, respectivamente.

CONDIÇÕES DE FOTOFERMENTAÇÃO						
Referências	Substrato	V _{biorreator} (L)	T (°C)	Micro-organismo	I.L. (W/m ²)	Produtividade (mmol H ₂ /L.dia)
Özgür et al. (2010b)	Acetato + efluente da fermentação escura de melaço de beterraba	0,055	30	<i>Rhodobacter capsulatus</i> (DSM1710)	200	26,4
	Acetato + glicose					9,6
	Acetato + hidrolisados de casca de batata a vapor					13,2
Afsar et al. (2011)	Acetato, lactato e glicose como açúcar.	0,055	30	<i>(Rb. capsulatus)</i>	150 - 200	10,32
				<i>(Rb. capsulatus hup⁻)</i>		14,88
				<i>(Rb. Sphaeroides)</i>		28,32
				<i>(Rb. sphaeroides hup⁻)</i>		20,16
				<i>(Rb. palustris)</i>		7,92
Özgür et al. (2010c)	Acetato, Lactato, Sacarose (melaço de beterraba).	0,055	30 ± 3	<i>(Rb. Capsulatus DSM1710)</i>	150 - 200	26,40
				<i>(Rb. capsulatus hup⁻ Y03)</i>		32,88
				<i>(Rb. palustris)</i>		27,84
Ozgur e Peksel (2013)	Efluente de fermentação escura, produzido a partir de palha hidrolisada de cevada, com e sem adição de extrato de levedura.	0,055	30	<i>(R. capsulatus DSM1710)</i>	114	11,76
				<i>(Rb. capsulatus hup⁻ Y03)</i>		13,92
Este estudo	Lactose e Ácidos Láctico, Acético, Propiônico e Butírico.	0,055	30	<i>Rhodobacter capsulatus</i> (DSM1710)	150	37,23
Este estudo	Lactose e Glicose e Ácidos Láctico, Acético, Propiônico e Butírico	1,5	35 ± 3	<i>Rhodobacter capsulatus</i> (DSM1710)	338	208,4

V_{biorreator}: volume do biorreator; T: temperatura; I.L.: Intensidade de luz

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que a utilização da fotofermentação empregando efluente da fermentação escura é uma alternativa com grande potencial para a produção de hidrogênio, sendo que:

Nos ensaios em escala reduzida;

- ✓ As menores produções de H₂ ocorreram nos Ensaios em que houve a maior produção de ácido propiônico;
- ✓ Nas condições em que obteve-se maior produção de hidrogênio, os ácidos láctico e butírico foram os principais metabólitos produzidos, quando a soma de ambos compostos foi superior a 84% do total dos metabólitos;
- ✓ Os resultados dos ensaios comprovaram a necessidade de fornecer uma fonte de açúcar para a bactéria púrpura não sulfurosa *Rhodobacter capsulatus*, visto que na ausência de lactose a produção de H₂ foi desprezível.

Nos ensaios em escala ampliada;

- ✓ Com relação à composição final de metabólitos, a maior produtividade de hidrogênio também foi encontrada quando a soma da porcentagem dos ácidos láctico e butírico foi alta, superior a 80%;
- ✓ Foi verificado que há a necessidade de suplementação do efluente proveniente da fermentação escura com uma segunda fonte de carbono, sendo ela lactose ou glicose. Além disso, somente a utilização do açúcar como substrato para a *R. capsulatus* também não favoreceu a formação de hidrogênio;
- ✓ A *R. capsulatus* apresentou maior potencial de síntese do hidrogênio nos ensaios que continham a lactose, inicialmente, como tipo de açúcar suplementada ao meio da fotofermentação;
- ✓ A suplementação do meio durante o processo de fotofermentação, de forma a alternar o tipo de açúcar adicionado, (lactose/glicose) promoveu consideravelmente o aumento da produtividade de hidrogênio, atingindo a produtividade máxima de 208,4 mmol H₂/L.dia. Além disso, possibilitou manter ativa a cultura por até 787 h.

- ✓ Com relação ao perfil dos metabólitos, verificou-se que nos ensaios com maior produção de hidrogênio, a rota metabólica predominante foi a de produção do ácido butírico, sendo que a variação da concentração deste ácido apresentou a mesma tendência observada no perfil de hidrogênio acumulado;
- ✓ O aumento da produção de hidrogênio também foi influenciado pela alteração da rota metabólica que induziu o consumo de ácido láctico. A rota de síntese deste metabólito não leva à formação de hidrogênio, sendo que os ensaios de baixa produtividade de H₂ apresentaram altas concentrações de ácido láctico. No entanto, a adição alternada do tipo de açúcar, seguida de um período sem suplementação de lactose ou glicose, levou ao consumo do ácido láctico como fonte de carbono. Nesta condição, obteve-se maior produção de hidrogênio;
- ✓ No ensaio de maior produção de hidrogênio, verificou-se um aumento da razão C/N de 13,8 para 198 (mg/mg), sendo que este aumento pode ser justificado pela adição periódica de fonte de carbono, que foi convertida em ácidos orgânicos, e pela redução gradativa da concentração de fonte de nitrogênio.

6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Analisar a síntese de hidrogênio utilizando como inoculo *R. palustris*;
- ✓ Estudar a influência de outras fontes de substrato na produção de hidrogênio por *R. capsulatus*;
- ✓ Avaliar a produção de hidrogênio utilizando como inoculo uma co-cultura (*R. capsulatus* e *R. palustris*);
- ✓ Estudar a produção de hidrogênio por fotofermentação empregando processo contínuo;

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFSAR, N.; ÖZGÜR , E.; GÜRGAN, M.; AKKÖSE, S.; YÜCEL, M.; GÜNDÜZ, U.; EROGLU, I. Hydrogen productivity of photosynthetic bacteria on dark fermenter effluent of potato steampeels hydrolysate. *International Journal of Hydrogen Energy*.v.36.p.432-438, 2011.

AMORIM, E. L. C. Efeito da concentração de glicose e da alcalinidade na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, USP, 192p, 2009.

ANDRADE, A.C.F.F. Avaliação da produção de hidrogênio por bactéria fototrófica púrpura não sulfurosa em reator batelada. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ANDROGA, D. D. Biological hydrogen production on acetate incontinuous panel photobioreactors using *Rhodobacter capsulatus*. Turkey: Chemical Engineering Department of Middle East Technical University, Master of Science thesis. 2009.

ARGUN, H., KARGI, F., KAPDAN, I.K. Light fermentation of dark fermentation effluent for bio-hydrogen production by different *Rhodobacter* speciesat different initial volatile fatty acid (VFA) concentrations. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33.7405-7412, 2008.

AVCIOGLU, S. G.; OZGUR, E.; EROGLU, I.; YUCEL, M.; GUNDUZ, U. Biohydrogen Production in an Outdoor Panel Photobioreactor on Dark Fermentation Effluent of Molasses, *International Journal of Hydrogen Energy*, v.36, p. 11360-11368, 2011.

BARBOSA, M. J.; ROCHA, J.M.S.; 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.

BEJAN, A. Advanced Engineering Thermodynamics. New York: Wiley, 1988.

BIANCHI, L.; MANELLI, F.; VITI, C.; ADESSI, A.; PHILIPPIS, R. Hydrogen producing purple non-sulfur bacteria isolated from the trophic lake Averno (Naples, Italy). *International Journal of Hydrogen Energy*, v.35, p. 12216-12223, 2010.

BORAN, E, ÖZGÜR, E., YÜCEL, M., GÜNDÜZ, U., EROGLU, I. Biohydrogen production by *Rhodobacter capsulatus* in solar tubular photobioreactor on thick juice dark fermenter effluent. *Journal of Cleaner Production*. v. 31, 150-157, 2012.

BORGES, J. E. Produção Biológica de Hidrogênio. Monografia de graduação do curso de Engenharia Química - Universidade Federal de Uberlândia, UFU, 25 p., 2008.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Resenha Energética Brasileira – REB. Brasília: MME, 2013.

CASTRO, N. J.; Coordenador do Grupo de Estudos do Setor de Energia Elétrica do Instituto de Economia da UFRJ (Gesel), 2014.

CHEN, C.Y.; LIU, C. H.; LO, Y C.; CHAN, J. S. Perspectives on Cultivation Strategies and Photobioreactor Designs for Photo-fermentative Hydrogen Production. *Bioresource Technology*, v. 102, pp. 8484–8492, 2011.

CHEN, C.Y.; YANG, M. H.; YEH, K. L.; LIU, C. H.; CHANG, J. S. Biohydrogen production using sequential two-stage dark and photo fermentation processes. *International Journal of Hydrogen Energy*. v.33. p. 4755 – 4762, 2008.

CHONG, M.L., RAHMAN, N.A., YEE, P. L., AZIZ, S.A., RAHIM, R.A., SHIRAI, Y., HASSAN, M. A.. Effects of pH, glucose and iron sulfate concentration on the yield of biohydrogen by *Clostridium butyricum* EB6. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, 8859 – 8865, 2009.

CLESCERI, L. S. Standard. Methods for the Examination of Water and Wastewater. Clesceri, Lenore S., Eaton, Andrew D., Greenberg, Arnold E. ed. 20th ed. *American Public Health Association*, D.C, 1220p, 1998.

Confederação Nacional da Indústria (CNI). Matriz Energética: Cenários, Oportunidades e Desafios. Brasília, 2007. Disponível em: <<http://www.cni.org.br/portal/data/files/00/8A9015D015A0F71F0115AE4B9A37466D/Matriz%20Energ%C3%A9tica.pdf>>. Acesso em 22 Nov. 2014.

CORREIA, R. M. de S. C. Produção de biohidrogênio por fermentação anaeróbia, a partir de resíduos fermentescíveis. (Tese para a obtenção do grau de Mestre em Energia e Ambiente, ULFC, Lisboa), 2009.

COSTA, F. O Papel dos Micro-organismos no Futuro dos Biocombustíveis. Instituto Nacional da Propriedade industrial, 2011.

DAS, D.; VEZIROGLU, T.N. Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 6046-6057, 2008.

DAS, D.; VEZIROGLU, T.N. Hydrogen Production by Biological Processes: a Survey of Literature, *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 26, pp. 13-28, 2001.

DASGUPTA, C. N.; GILBERT, J. J; LINDBLAD, P.; HEIDORN, T.; BORGVANG, S. A.; SKJANES, K.; C, DAS, D. Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, 10218 - 10238, 2010.

Empresa de Pesquisa Energética – EPE. *Balanço Energético Nacional 2014: Ano base 2013 – Rio de Janeiro: 2014.*

EROGLU E.; GUNDUZ U.; YUCEL M.; EROGLU, I. Effect of iron and molybdenum addition on photofermentative Xhydrogen production from olive mill wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*; 36: 5895 – 5903, 2011.

- EROGLU I, ASLAN K, GUNDUZ U, YUCEL M, TURKER L. Substrate consumption rates for hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* in a column photobioreactor. *J Biotechnol*; 70:103-13, 1999.
- FANG, H. P., LIU H., Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture, *Bioresource Tecnology*, v. 82, p. 87-92, 2002.
- FERNANDES, B. Produção de Hidrogênio em reator Anaeróbio de leito fixo. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, USP, 115 p, 2008.
- HALLENBECK, P. C.; GHOSH, D. Advances in fermentative biohydrogen. *Trends In Biotechnology*, v. 05, n. 27, p.287-297, 2009.
- HALLENBECK, P.C.; BENEMANN, J. R. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*,v.27, p. 1185-1193, 2002.
- HONGLIANG, H.; BIQIAN, L.; HAIJUN, Y.; JIANQUAN, S. Effect of Carbon Sources on the Photobiological Production of Hydrogen Using *Rhodobacter sphaeroides* RV. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 12167–12174, 2012.
- KARGI, F; OZMIHCI, S. Bio-hydrogen production by photo-fermentation of dark fermentation effluent with intermittent feeding and effluent removal, *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, pp. 6674 - 6680, 2010.
- KARS G.;GUNDUZ U.; YUCEL M.; TURKER L.; EROGLU I. Hydrogen production and transcriptional analysis of nifD, nifK and hupS genes in *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 grown in media with different concentrations of molybdenum and iron. *Int J Hydrogen Energy*; v. 31 ;1536 – 44, 2006.
- KESKIN, T., HALLENBECK, P.C., Hydrogen production from sugar industry wastes usingsingle-stage photofermentation. *Bioresource Tecnology*, v. 112, p. 131-136, 2012.
- KIM, M. S.; BAEK, J. S.; SUYUN, Y.; SIM, S. J.; PARK, S.; KIM, S. C. Hydrogen production from *Chlamydomonas reinhardtii* biomass using a two-step conversion process: Anaerobic conversionz and photosynthetic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.31, p. 812 - 816, 2006.
- KLEEREBEZEM, R.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Mixed culture biotechnology for bioenergy production. *Curr. Opin. Biotechnol.*18, 207–212, 2007.
- KOKU, H.; EROGLU I.;GUNDUZ U.;YUCELB M.;TURKE, L. Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. *Int J Hydrogen Energy*; v. 27, p. 1315 - 1329; 2002.
- KOKU, H.; EROGLU, I.; GUNDUZ, U.; YUCELB, M.; TURKE, L. Kinetics of biological hydrogen production by the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. *Int J Hydrogen Energy*; v. 28, p. 381 - 388; 2003.

LÁZARO, C. Z. Obtenção e Caracterização Filogenética de Consórcio de Bactérias Fototrópicas Púrpuras Não-Sulfuroosas Consumidoras de Ácidos Orgânicos Visando a Produção de Hidrogênio em Reator Anaeróbio de Batelada. Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia de São Carlos, 2009.

LÁZARO, C. Z.; VICH, D. V.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B. A. Hydrogen Production and Consumption of Organic Acids by A Phototrophic Microbial Consortium. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, pp. 11691 – 11700, 2012.

LEITE, T. L. *Produção de bio-hidrogênio a partir do efluente da parboilização do arroz*. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, 2010.

LIN C. Y, LAY C. H. A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*; 30, 285–92. 2005.

LIU, B.F.; REN, N.O.; TANG, J.; DING, J.; LIU, W.Z.; XU, J.F.; CAO, G.L.; GUO, W.Q.; XIE, G.J. Bio-hydrogen production by mixed culture of photo and dark fermentation bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.35, p.2858-2862, 2010.

LONGO, M. A. V., LAZZARIN, N., MIGUEZ, T. A. Produção Biológica de Hidrogênio. Apostila, Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

LOSS, R. A. Avaliação da produção de hidrogênio por consórcio bacteriano fotoheterotrófico. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

MANISH, S.; BANERJEE, R. Comparison of biohydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.33, p.279-286, 2008.

MARTIN, K.B.; GRASMAM, S.E. An assessment of wind-hydrogen systems for light duty vehicles. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.34, p.6581-6588, 2009.

MATHEWS, J.; WANG, G. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.34, p.7404-7416, 2009.

MEYER, J. [FeFe] hydrogenases and their evolution: a genomic perspective. *Cell. Mol. Life Sci*, v. 64, p. 1063–1084, 2007.

MICROBEWIKI (Org.). A Microbial Biorealm page on the genus Rhodobacter. 2010. Disponível em: <<http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Rhodobacter>>. Acesso em: 26 Nov. 2014.

MIRA, M. M. V. P. *Produção de biohidrogênio a partir de diferentes fontes de carbono, por fermentação anaeróbia*. Dissertação (Mestrado) em Energia e Bioenergia. Universidade Nova de Lisboa, 2012.

MIYAKE, J.; MAO, X.Y. KAWAMURA, S. Photoproduction of hydrogen from glucose by a co-culture of a photosynthetic bacterium and *Clostridium butyricum*. *J. Ferment. Technol.* v. 62, 531 – 535, 1984.

- MOMIRLAN M; VEZIROGLU T. N. Current status of hydrogen energy. *Renewable Sustainable Energy*; 6 (1-2); 141-179, 2002.
- MUCCILLO, D. Estudos *in silico* para a produção bacteriana de hidrogênio. Dissertação de Mestrado na área de Processos Químicos e Biotecnológicos. Universidade Federal de Santa Catarina / Florianópolis –SC. 2007.
- NASCIMBENI, F. A. Evaluation of biological hydrogen production in batch reactor under thermophilic condition – Monograph (Bachelor Thesis –School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo, 2013.
- NATH K, DAS, D. Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. *Appl Microbial Biotechnol*, 65, 520-529. 2004.
- NAVARRO, T. Fonte de energias práticas e Alternativas não poluentes II. Jornal ITEIA. 2013. Disponível em: <<http://www.iteia.org.br/jornal/fonte-de-energias-praticas-e-alternativas-nao-poluentes-ii>>. Acesso em: 14 Nov. 2014
- NEVES, L.M.V. Produção de biohidrogênio por bactérias a partir de resíduos fermentescíveis. Dissertação de Engenharia Química e Bioquímica. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2009.
- ODA, Y.; SAMANTA, S.K.; REY, F.E.; WU, L.; LIU, X.; YAN, T.; ZHOU, J.; HARWOOD, C.S. Functional genomic analysis of three nitrogenase isozymes in the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas palustris*. *Journal of Bacteriology*, v. 187, p. 7784–7794, 2005.
- OH, Y.K.; SEOL, E.H.; KIM M.S.; PARK, S. Photoproduction of hydrogen from acetate by a chemoheterotrophic bacterium *Rhodopseudomonas palustris* P4. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 29, pp.1115-1121, 2004.
- OLIVEIRA, A. C. R.; FERNADES, N. G. S.; MOREIRA, M. A.; SILVA, R. M. **O Uso do Hidrogênio como fonte energética**. XXXI Encontro Nacional de Engenharia de Produção. Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual: Desafios da Engenharia de Produção na Consolidação do Brasil no Cenário Econômico Mundial. Belo Horizonte - MG, Brasil. 2011.
- OLIVEIRA, T. V. Avaliação da produção de hidrogênio empregando bactérias fotossintetizantes. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, UFU, 91 p., 2014.
- ÖZGÜR, E., AFSAR, N., VRIJE, T., YÜCEL, M., GÜNDÜZ, U., CLAASSEN, P.A.M., EROGLU, I. Potential use of thermophilic dark fermentation effluents in photofermentative hydrogen production by *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Cleaner Production*. v. 18 S23-S28, 2010a.
- ÖZGÜR, E., UYAR, B., ÖZTÜRK, Y., YÜCEL, M., GÜNDÜZ, U., EROGLU, I. Biohydrogen production by *Rhodobacter capsulatus* on acetate at fluctuating temperatures. *Resour. Conserv. Recy.* n. 54, p. 310–314, 2010b.

ÖZGÜR, E., MARS, A. E.; PEKSEL, B.; LOUWERSE, A.; YÜCEL, M., GÜNDÜZ, U., CLAASSEN, P. A. M., EROGLU, I. Biohydrogen production from beet molasses by sequential dark and photofermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, pp.511-517, 2010c.

ÖZGÜR, E., PEKSEL, B. Biohydrogen production from barley straw hydrolysate through sequential dark and photofermentation. *Journal of Cleaner Production*. v. 52 S14-S20, 2013.

OZTEKIN, R., KAPDAN, I. K., KARGI, F., ARGUN, H. Optimization of media composition for hydrogen gas production from hydrolyzed wheat starch by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy* .v. 33, p. 4083 - 4090, 2008.

PAMPLONA, N. País tem energia mais suja e menos renovável. Jornal Brasil Econômico. Disponível em:<<http://brasileconomico.ig.com.br/brasil/economia/2014-06-05/pais-tem-energia-mais-suja-e-menos-renovavel.html>>. Acesso em 14 Nov. 2014.

PEIXOTO, G.; Produção de Hidrogênio em Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado e fluxo ascendente a partir de água resíduária da indústria de refrigerantes. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, USP, 123 p, 2008.

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

REDWOOD, M.D.; MACASKIE,L.E. A two-stage, two-organism process for biohydrogen from glucose. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.31, p.1514-1521, 2006.

ROJAS, M. D. P. A. Influência da relação C/N na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo. Dissertação (Mestrado - Engenharia Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2010.

ROMÃO, B.; BATISTA, F. R. X.; FERREIRA, J. S.; RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. L.; COSTA, H. C. B.; Biohydrogen Production Through Dark Fermentationby a Microbial Consortium Using Whey Permeateas Substrate. *Appl Biochem Biotechnol*.172:3670–3685, 2014.

SACRAMENTO, E.M.; LIMA L.C.; CARVALHO, P.C. Estudo da arte da tecnologia em um sistema hidrogênio-solar-eólico. *Rev. Tecnol. Fortaleza*, v. 27, n.2, p.150-162, 2006.

SANTOS, K. G.; ROSSI, E.; KUGELMEIER, C. L.; TIETZ, C. M.; ALVES, H. J. Fermentação anaeróbia: uma alternativa para a produção de hidrogênio. *Revista Brasileira de Energias Renováveis*. v. 1, p. 1-12, 2013.

SASIKALA, K.; RAMANA, CH.V.; RAO, P.R. Regulation of simultaneous hydrogen photoproduction during growth by pH and glutamate in *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.20, p.123-126 (1995).

- SCHNEIDER, K.; MULLER A.; SCHRAMM U.; KLIPP, W. Demonstration of a molybdenum- and vanadium-independent nitrogenase in a nifHDK deletion mutant of *Rhodobacter capsulatus*. *Eur. J. Biochem.* v. 195; p. 653–661, 1991.
- SEVINC, P.; GÜNDÜZ, U.; EROGLU, I.; YUCEL, M. Kinetic Analysis of Photosynthetic Growth, Hydrogen Production and Dual Substrate Utilization by *Rhodobacter capsulatus*. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.37, pp.16430-16436, 2012.
- SIKORA, A.; BLASZCZYK, M.; JURKOWSKI,M. ZIELENKIEWICZ, U. Lactic Acid Bacteria in Hidrogen-Producing Consortia: On purpose or by coincidence? In: KONGO, M. (Org.) Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, *Health and Livestock Purposes*. Croatia: InTech. Chapter 21. p. 487-514, 2013.
- SILVA, G. M.; SILVA, L. G. M.; OIKNINE, L.; DASSOLER, T. S. Produção biotecnológica de hidrogênio. Universidade Federal de Santa Catarina - Departamento de Engenharia Química e Alimentos. Florianópolis, 2009.
- SOUZA, M.M.V.M.; Tecnologia do hidrogênio. Rio de Janeiro: Synergia Editora, 2009
- SU, H.; CHENG, J.; ZHOU, J.; SONG, W.; CEN, K. Combination of dark and photo fermentation to enhance hydrogen production and energy conversion efficiency. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.34, p.8846-8853, 2009.
- TIAN. X.; LIAO.Q.; ZHU.X.; WANG.Y., ZHANG.P.; LI. J.; WANG. H. Characteristics of a biofilm photobioreactor as applied to photo-hydrogen production. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 977–983, 2010.
- VALDEZ –VALDEZ, I.; POGGI-VARALDO, H.M. Hydrogen production by fermentative consortia, *Renewable and sustainable Energy Reviews*, 2008.
- VAN GINKEL S, LOGAN BE. Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids. *Environmental Science and Technology*.39, 9351–6, 2005.
- VAN GINKEL S, SUNG S. W,LAY J. J. 2001. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environmental Science and Technology*. 35 (24), 4719-4725, 2001.
- VARDAR-SCHARA, G.; MAEDA T.; WOOD, T. K. Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via fermentation. *Microbial Biotechnology*, v. 1, n. 2, p. 107-125, 2008.
- VARGAS, J. V. C. Modelagem e simulação de processo de geração de hidrogênio via cultivo de microalgas em fotobioreatores compactos. Monografia do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2013.
- VASCONCELOS de SÁ; CAMMAROTA, M. C.; LEITÃO, V.S.F. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia – aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. *Quim.Nova*, Vol. 37, No. 5, 857-867, 2014.
- VIGNAIS, P.M., COLBEAU. A. Molecular biology of microbial hydrogenases. *Mol. Biol.*, v. 6, p. 159–188, 2004.

- WANG, J.; WAN, W. Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 53-92, 2008.
- WANG, J.; WAN, W.; Int. J. Hydrogen Energy. 2008, 30 (12), 2934.Li, Chenlin.; Fang, H. H. P.; Environ. Sci. Technol. 37, 1, 2007.
- WANG, J., WAN, W.; Factors influencing fermentative hydrogen production: a review, *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 799-811, 2009.
- WEAVER, P. F.; WALL, J. D.; GEST, H. Characterization of *Rhodopseudomonas capsulate*. *Archives of Microbiology*, v. 105, p. 207-216, 1975.
- XIN M. G.; TRABLY; E.; LATRILLE; E.; CARRERE; H.; STEYER; JP. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review, *International Journal of Hydrogen Energy* , p. 1-14.2010.
- ZHU; H.; FANG; H. H. P.; ZHANG; T.; BEAUDETTE; L. A. Effect of ferrous ion on photo heterotrophic hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* / *International Journal of Hydrogen Energy* 32: 4112 – 4118. (2007)

APÊNDICE A

Curva de calibração para quantificação celular

A determinação da concentração de sólidos voláteis (SV) foi realizada através do método gravimétrico. Na determinação da curva de calibração, a densidade óptica a 660 nm (OD660) foi medida em um espectrofotômetro (GENESYS) e convertida em g/L pela equação de correlação entre OD660 e g de SV/L (CLESERI et al., 1998). A curva-padrão de crescimento celular para a cepa *R. capsulatus* apresenta-se na figura A.1. A equação A.1 apresenta a curva de calibração para *R. capsulatus*(OLIVEIRA,2014).

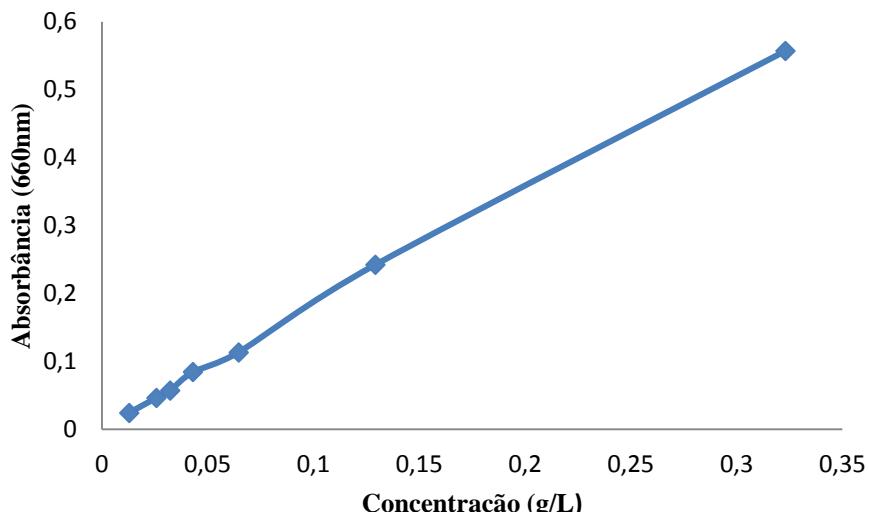


Figura A.1 - Curva de calibração utilizada na determinação da concentração celular para a cepa *R. capsulatus*. $R^2=0,998$.

$$ABS(660nm) = 1,7238 \cdot x(g\ de\ \frac{SV}{L}) + 0,0051 \quad (A.1)$$