



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



GUSTAVO TOTTOLI

Investigação da produção de hidrogênio por fotofermentação utilizando as bactérias
fototróficas *Rhodobacter capsulatus* e *Rhodospirillum rubrum*

Uberlândia - MG

2022

GUSTAVO TOTTOLI

Investigação da produção de hidrogênio por fotofermentação utilizando as bactérias
fototróficas *Rhodobacter capsulatus* e *Rhodospirillum rubrum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Área de concentração: Processos biotecnológicos

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

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

Uberlândia - MG

2022

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

F383
2022 Ferreira, Gustavo Machado Tottoli, 1996-
Investigação da produção de hidrogênio por
fotofermentação utilizando as bactérias fototróficas
Rhodobacter capsulatus e Rhodospirillum rubrum [recurso
eletrônico] / Gustavo Machado Tottoli Ferreira. - 2022.

Orientadora: Fabiana Regina Batista Xavier .

Coorientadora: Vicelma Luiz Cardoso.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Engenharia Química.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.66>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Engenharia química. I. , Fabiana Regina Batista
Xavier,1976-, (Orient.). II. Cardoso, Vicelma Luiz ,
1960-, (Coorient.). III. Universidade Federal de
Uberlândia. Pós-graduação em Engenharia Química. IV.
Título.

CDU: 66.0

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

GUSTAVO TOTTOLI

Investigação da produção de hidrogênio por fotofermentação utilizando as bactérias
fototróficas *Rhodobacter capsulatus* e *Rhodospirillum rubrum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Área de concentração: Processos biotecnológicos

Uberlândia – MG, 17 de fevereiro de 2022.

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Fabiana Regina Xavier Batista (PPGEQ/UFU)
Orientadora

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

Prof^ª. Dr^ª. Miriam Maria de Resende (PPGEQ/UFU)

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

Dr. Felipe Santos Moreira (PPGEQ/UFU)

Prof^ª. Dr^ª. Cristiane Sanchez Farinas (EMBRAPA)

Dedico este trabalho à toda minha família,
sobretudo minha mãe.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química
 Av. João Naves de Abreu, 2153, Bloco 5E, Sala 206 - Bairro Santa Mônica, Uberlândia MG, CEP 38400-903
 Telefone: (34)3131-4249 - www.pgpeq/ufu.br - seipgpeq@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Engenharia Química		
Defesa de:	Mestrado Acadêmico, 05/2022, PPGEQ		
Data:	17 de fevereiro de 2022	Hora de início:	08:00
Matrícula do Discente:	12012103000	Hora de encerramento:	11:20
Nome do Discente:	Guilherme Machado Totoli Ferreira		
Título do Trabalho:	Investigação da produção de Hidrogênio por fotoferrmentação utilizando as bactérias fototróficas <i>Rhodospirillum rubrum</i> e <i>Rhodospirillum rubrum</i>		
Área de concentração:	Desenvolvimento de Processos Químicos		
Linha de pesquisa:	Engenharia Bioquímica		
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Produção de Biohidrogênio e de Biotéio		

Realizou-se por meio de videoconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, assim composta: Professores Doutores: Cristiane Sanchez Farinas - Embrapa Instrumentação/São Carlos; Felipe Santos Moreira - PPG/UFU; Juliana de Souza Ferreira - PPGEQ/UFU; Miriam Maria de Resende - PPGEQ/UFU; Vitoria Lutz Cardoso - PPGEQ/UFU, orientadora e Fabiana Regina Xavier Batista - PPGEQ/UFU, orientadora do candidato.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Profa. Dra. Fabiana Regina Xavier Batista, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir, a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente aos examinadores, que passaram a arguir o candidato. Ultrapassada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o candidato:

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por Felipe Santos Moreira, Usuário Externo, em 17/02/2022, às 11:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Vitoria Lutz Cardoso, Professor(a) do Magistério Superior, em 17/02/2022, às 11:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Miriam Maria de Resende, Professor(a) Substituto(a) do Magistério Superior, em 17/02/2022, às 11:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Fabiana Regina Xavier Batista, Professor(a) do Magistério Superior, em 17/02/2022, às 11:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Cristiane Sanchez Farinas, Usuário Externo, em 17/02/2022, às 11:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Juliana de Souza Ferreira, Professor(a) do Magistério Superior, em 17/02/2022, às 11:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/inf/controleador_interno.php?acao=documento_confirma&id_documento=3372081, informando o código verificador 3372081 e o código CRC 3AD790F3.

AGRADECIMENTOS

Gratidão é um sentimento de reconhecimento, uma emoção por saber que alguém fez uma boa ação, um auxílio, em favor de outra. Assim sendo, agradeço a Deus. Agradeço à família: Minha mãe, pelo amor incondicional, pela vida, pelo esforço e horas de preocupação que não vão embora com o tempo. Meu pai, pelo companheirismo. Minhas irmãs, colegas, parceiras e amigas.

Às minhas orientadoras, prof.^a. Dr.^a. Fabiana Regina Xavier Batista pelos conhecimentos transmitidos, por estar sempre disposta a ajudar, pelo incentivo e motivação. Prof.^a. Dr.^a. Vicelma Luís Cardoso, por todo apoio e disponibilidade.

Ao Felipe, pela paciência, pela ajuda com o funcionamento de equipamentos complexos, pelas dúvidas sanadas que surgiram aos sábados, domingos e feriados e pela ajuda com minha vidraria suja quando eu não pude lavar.

Aos “migos” e “migas” do NUCBIO, pelo companheirismo durante esse tempo de mestrado. Em especial, aos amigos Mayara, Larissa e Erisson. Compartilhar os prazeres e as dificuldades vividas durante o tempo que passamos juntos foi essencial. Agradeço por terem a paciência que é precisa para ouvir minhas reclamações, lamentos, choros, murmúrios e queixas por um ano inteiro.

À Prof.^a. Dr.^a Miriam Maria de Resende, pelo apoio e pela presença no laboratório do NUCBIO dia após dia disposta a ajudar e a ensinar.

Ao Heitor, aluno de iniciação científica, pela ajuda “virtual” dada com trabalhos, resumos e artigos e, eventualmente, pela amizade.

Aos órgãos de fomento CNPq, FAPEMIG e Capes, pelo auxílio financeiro que permitiu a boa realização desse trabalho.

À Vale S.A., pela concessão de recursos financeiros proporcionados.

À UFU, à FEQUI e ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade concedida e estrutura proporcionada.

“And if you never bleed, you're never gonna
grow.”

(Taylor Swift)

RESUMO

O hidrogênio é uma fonte de energia limpa tida capaz de conter o aumento excessivo da temperatura da Terra em decorrência do uso exagerado dos combustíveis fósseis. A produção de hidrogênio biológico por fotofermentação tem recebido atenção nos últimos anos por se mostrar vantajosa e por oferecer grande potencial. No presente trabalho, estudou-se a produção biológica de hidrogênio por fotofermentação utilizando as bactérias púrpuras não-sulfurosas *Rhodobacter capsulatus* e *Rhodospirillum rubrum* cultivadas em meio basal RCV. Avaliou-se a lactose proveniente do permeado de soro de leite em pó, um co-produto da agroindústria, como fonte de carbono na concentração de 10 g/L. A produção de biohidrogênio foi avaliada em duas escalas distintas: ensaios em escala reduzida com reatores de 50 mL e ensaios em escala ampliada em reatores de tanque agitado de 1,5 L. Os ensaios em escala reduzida verificaram em um primeiro momento o desempenho de culturas puras e, em sequência, de co-culturas das espécies em diferentes proporções (1:1; 1:3; 3:1, em massa). Verificou-se que a combinação das duas espécies em co-cultura, em especial, na proporção 1:1 (m/m) apresentou desempenho com produtividade máxima de 7,51 mmol H₂/L.dia. A fim de verificar a influência da lactose como fonte de açúcar, os ensaios em escala reduzida foram replicados empregando o próprio meio basal RCV como meio fermentescível. Os ensaios em escala ampliada estudaram o efeito da chamada revitalização do meio reacional. Em intervalos de tempo determinados, era realizada a retirada de uma fração do meio reacional e o reator era preenchido com meio fresco de forma que a concentração de lactose se mantivesse na mesma faixa. A revitalização permitiu a retirada dos ácidos orgânicos produzidos pelo sistema como resultado do metabolismo celular de forma que os mesmos não se acumulassem. A revitalização do meio reacional garantiu um funcionamento estável e de longo prazo do sistema atingindo a produtividade máxima de 278,05 mmol H₂/L.dia por um período de 42 dias para o inóculo de co-cultura 1:1. Um ensaio subsequente foi realizado empregando as mesmas condições iniciais sem a revitalização do meio reacional. Observou-se um acúmulo dos ácidos orgânicos e uma produtividade máxima inferior (104,47 mmol H₂/L.dia) com tendência de queda. Os principais ácidos orgânicos detectados foram os ácidos láctico, acético, propiônico e butírico.

Palavras-chave: Hidrogênio, fotofermentação *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodospirillum rubrum*., co-cultura e batelada sequencial.

ABSTRACT

Hydrogen is a clean energy source said to be able to contain the increase in the Earth's temperature as a result of the exaggerated use of fossil fuels. The production of biological hydrogen by photo fermentation has received much attention in recent years as it offers great potential. In the current research, the biological production of hydrogen by photo fermentation was evaluated using the purple non-sulfur bacteria *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodospirillum rubrum* cultivated in RCV medium. Lactose from whey permeate, an agro-industrial residue, was used as a carbon source at a starting concentration of 10 g/L. Assays were carried out in 50 mL reactors (small-scale assays) and on a 1.5 L stirred tank reactor (large-scale assays). Initially, the assays carried out on the 50 mL reactors evaluated the use of pure bacterial cultures and were compared with the use of co-cultures formed by different proportions of the species. It was found that the combination of the two species in co-culture formed by the proportion 1:1 (w/w) had shown a maximum productivity of 7.51 mmol H₂/L.day. To verify the influence of lactose as a source of carbon, the small-scale assays were replicated using the basal RCV medium as the fermentable medium. The large-scale assays were carried out with medium renewal. Within specified time intervals, a fraction of the reaction medium was removed and the reactor was refilled with fresh medium so that the lactose concentration remained approximately in the same range. The medium renewal allowed the removal of organic acids produced as a result of cellular metabolism so that they would not accumulate. This ensured a stable and long-term hydrogen production, reaching a peak productivity of 278.05 mmol H₂/L.day. A subsequent assay was carried out employing the same initial conditions without medium renewal. It was observed an accumulation of organic acids resulted in lower peak productivity. The main organic acids detected were lactic, acetic, propionic and butyric acids.

Keywords: Hydrogen, photo fermentation, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodospirillum rubrum*., co-culture and sequential batch.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1 - Oferta de Energia Inteira brasileira 2021 (ano base 2020).....	15
Figura 3.2 - Esquema representativo biofotólise direta.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 3.3 – Esquema representativo da produção de biohidrogênio por fotofermentação.....	28
Figura 4.1 - Esquema representativo dos ensaios realizados.....	33
Figura 4.2 - Esquema operacional unidade de escala ampliada.....	39
Figura 5.1 - Perfil de (a) concentração sólidos voláteis; (b) Produtividade (●) /Conversão (■); (c) Concentração lactose; (d) pH; (e) Concentração ác. orgânicos: Ácido lático (●); Ácido acético (★); Ácido propiônico (◆) para <i>R. capsulatus</i>	43
Figura 5.2 - Perfil de (a) concentração sólidos voláteis; (b) Produtividade (●) /Conversão (■); (c) Concentração lactose; (d) pH; (e) Concentração ác. orgânicos: Ácido lático (●); Ácido acético (★); Ácido propiônico (◆) para <i>R. rubrum</i>	44
Figura 5.3 - Perfil de (a) concentração sólidos voláteis; (b) Produtividade (●) /Conversão (■); (c) Concentração lactose; (d) pH; (e) Concentração ác. orgânicos: Ácido lático (●); Ácido acético (★); Ácido propiônico (◆) para Co-cultura 1:1.....	48
Figura 5.4 - Perfil de (a) concentração sólidos voláteis; (b) Produtividade (●) /Conversão (■); (c) Concentração lactose; (d) pH; (e) Concentração ác. orgânicos: Ácido lático (●); Ácido acético (★); Ácido propiônico (◆) para Co-cultura 1:3.....	49
Figura 5.5 - Perfil de (a) concentração sólidos voláteis; (b) Produtividade (●) /Conversão (■); (c) Concentração lactose; (d) pH; (e) Concentração ác. orgânicos: Ácido lático (●); Ácido acético (★); Ácido propiônico (◆) para Co-cultura 3:1.....	50
Figura 5.6 - Perfil de concentração de substrato Ensaio 9.....	53
Figura 5.7 - Perfil de concentração sólidos voláteis Ensaio 9.....	54
Figura 5.8 - Perfils de Produtividade (●) /Conversão (●) (a) e Mol de H ₂ acum. (b) E.9.....	55
Figura 5.9 - Perfil de pH - Ensaio 9.....	57
Figura 5.10 - Perfils de concentração de ácidos orgânicos produzidos Ensaio 9: (a) ácido lático; (b) ácido acético; (c) ácido propiônico; (d) ácido butírico.....	58
Figura 5.11 - Perfil de concentração de substrato Ensaio 10.....	59
Figura 5.12 - Perfil de concentração sólidos voláteis Ensaio 10.....	60
Figura 5.13 - Perfils de Produtividade (●) /Conversão (●) (a) e Mol de H ₂ acum. (b) –E.10....	61
Figura 5.14 - Perfils de concentração de ácidos orgânicos produzidos Ensaio 10: (a) ácido lático; (b) ácido acético; (c) ácido propiônico; (d) ácido butírico.....	61

Figura 5.15 - Perfil de pH - Ensaio 10.....	62
Figura 5.16 - Perfil de concentração de substrato Ensaio 11.....	64
Figura 5.17 - Perfil de concentração sólidos voláteis Ensaio 11	64
Figura 5.18 - Perfils de Produtividade (•) /Conversão (•) (a) e Mol de H2 acum. (b) – E.12 ..	65
Figura 5.19 - Perfil de pH - Ensaio 11.....	65
Figura 5.20 - Perfils de concentração de ácidos orgânicos produzidos Ensaio 11: (a) ácido láctico; (b) ácido acético; (c) ácido propiônico; (d) ácido butírico	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Aplicações do hidrogênio em diversos seguimentos da indústria.....	17
Tabela 3.2 - Custo de produção de hidrogênio por diferentes métodos	18
Tabela 3.3 - Tecnologias para a produção de biohidrogênio.....	21
Tabela 4.1 - Componentes do meio RCV.....	34
Tabela 4.2 - Componentes da solução de micronutrientes utilizada no meio RCV	34
Tabela 4.3 - Caracterização Permeado de soro de leite em pó segundo fabricante.....	35
Tabela 4.4 - Esquema de ensaios realizados em escala reduzida	37
Tabela 4.5 – Esquema de ensaios realizados em escala ampliada.....	39
Tabela 6.1 - Consolidado respostas produtividade (mmol H ₂ /L.dia) e conversão (mol H ₂ /mol de substrato consumido) escala reduzida.....	51
Tabela 5.2 - Consolidado respostas produtividade (mmol H ₂ /L.dia) e conversão (mol H ₂ /mol de substrato consumido).	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – Adenosina Trifosfato

BS – Batelada Sequencial

$C_6H_{12}O_6$ – Glicose

CaC – Célula a Combustível

CH_4 – Metano

CO – Monóxido de Carbono

CO_2 – Dióxido de Carbono

DSMZ – *German Collection of Microorganisms and Cell Culture*

Fd – Ferredoxina

FS I – Fotossistema I

FS II – Fotossistema II

gsv/L – Gramas de sólidos voláteis por litro

H_2 – Hidrogênio

H_2O – Água

HFL – Hidrogênio Formiato Liase

NADP – Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

NADPH – Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida forma reduzida

NaOH – Hidróxido de sódio

OEI – Oferta de Energia Interna

PEM – *Proton Exchange Membrane*

PFL – Piruvato Formiato Liase

pH – Potencial hidrogeniônico

PNS – Bactérias Púrpuras Não Sulfurosas

PSL – Permeado de Soro de Leite

RCV - *Rhodobacter capsulatus V minimal médium*

rpm – Rotações por minuto

TEP – Toneladas Equivalentes de Petróleo

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	12
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS	14
2.1 – Objetivos específicos	14
CAPÍTULO 3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 - Balanço energético mundial e uso dos combustíveis fósseis	15
3.2 – Hidrogênio como fonte energética	16
3.3 – Produção Industrial de hidrogênio	18
3.4 – Produção biológica de hidrogênio	20
3.4.1 – Biofotólise direta.....	20
3.4.2 – Biofotólise Indireta.....	23
3.4.3 – Fermentação escura.....	24
3.4.4 – Fotofermentação.....	26
3.4.5 – Sistemas híbridos.....	29
3.4.6 – Produção de hidrogênio a partir de co-produtos da agroindústria.....	30
3.5 – Microrganismos para a produção biológica de hidrogênio	31
3.5.1 – Bactérias Púrpuras Não Sulfurosas.....	31
3.5.2 – Co-culturas.....	31
CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 – Bactérias fotofermentativas: <i>R. capsulatus</i> e <i>R. rubrum</i>	34
4.2 – Substrato: Lactose proveniente do permeado de soro de leite em pó	35
4.3 – Condições dos ensaios realizados em escala reduzida: reatores de 50 mL	36
4.4 – Condições dos ensaios realizados em escala ampliada: reator de 1,5 L	37
4.5 – Metodologia analítica e respostas de interesse	39
4.5.1 – Determinação da concentração de sólidos voláteis.....	39
4.5.2. – Quantificação de açúcar e metabólitos.....	40
4.5.3 – Quantificação do hidrogênio.....	41
4.5.4. – Determinação do pH.....	41
4.5.5 – Conversão e produtividade.....	41

CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 – Resultados dos ensaios realizados em escala reduzida: reatores de 50 mL..	42
5.1.1 – Ensaio 1 e 2: sistemas de cultura pura.	42
5.1.2 – Ensaio 3, 4 e 5: sistemas de co-cultura.	47
5.2 – Resultado dos ensaios realizados em escala ampliada: reator de 1,5 L.....	52
5.2.1 – Ensaio 9: Inóculo co-cultura 1:1 com revitalização do meio reacional....	52
5.2.2 – Ensaio 10: Inóculo co-cultura 1:1 sem revitalização do meio reacional. .	59
5.2.3 – Ensaio 11: Inóculo de <i>R. rubrum</i> com revitalização do meio reacional...63	
5.3. – Consolidado dos resultados obtidos	67
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÃO E SUGESTÕES	69
6.1 – Conclusões acerca dos ensaios realizados em escala reduzida	69
6.2 – Conclusões acerca dos ensaios realizados em escala ampliada	69
6.3 – Sugestões para trabalhos futuros.	70
CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

O estudo da produção de energia pelo uso de tecnologias limpas intensificou-se nos últimos anos em razão da crescente preocupação com o uso de combustíveis fósseis que, por serem muito poluentes, representam uma ameaça para o equilíbrio do planeta. Nesse contexto destaca-se o hidrogênio: uma fonte de energia limpa e renovável, sendo o combustível mais promissor para a substituição dos combustíveis fósseis. O hidrogênio é um dos elementos mais abundantes no universo. É um gás inodoro, incolor e atóxico (JOHNSTON et al. 2005). Como fonte energética se destaca por possuir o mais alto teor de energia por unidade em peso do que qualquer outro combustível (248 kJ/mol). O chamado biohidrogênio, nome dado ao hidrogênio produzido por processos biológicos, mostra-se ainda mais interessante pois ele oferece diversas vantagens em comparação aos outros processos de obtenção deste combustível já que ele pode ser obtido por processos realizados em temperatura e pressão ambiente e que possibilitam o reaproveitamento de materiais residuais, diminuindo assim a quantidade de subprodutos gerados nas indústrias (WU et al., 2009; SARMA et al., 2012).

O biohidrogênio pode ser produzido por meio dos seguintes processos: biofotólise direta ou indireta da água, fotofermentação, fermentação escura e sistemas híbridos. A fotofermentação é um processo que emprega bactérias fotossintéticas capazes de converter substratos orgânicos em hidrogênio em condições anaeróbias e sob iluminação. Destaca-se entre os substratos orgânicos empregados no processo fotofermentativos o uso de ácidos orgânicos como os ácidos láctico, acético, butírico e propiônico. As espécies fotossintéticas são também capazes de converter açúcares simples e complexos em hidrogênio. O permeado de soro de leite em pó é um coproduto da produção do concentrado proteico do soro do leite rico em lactose que pode ser empregado como substrato em um processo fotossintético. Embora a produção de hidrogênio por fotofermentação seja promissora, tem-se relatado que os ácidos orgânicos voláteis produzidos durante o metabolismo celular em paralelo ao hidrogênio podem inibir a produção de biohidrogênio (KESKIN et al., 2011; KAPDAN et al., 2009). Com isso, existe a necessidade de contornar o efeito inibitório dos metabólitos para garantir uma produtividade de biogás estável e de longo prazo.

Algumas espécies de bactérias fotossintéticas tem-se destacado nos processos fotofermentativos. Em especial o filo das púrpuras não sulfurosas (PNS) o qual inclui as espécies *Rhodobacter capsulatus* e *Rhodospirillum rubrum* capazes de realizar a transformação de matéria orgânica em hidrogênio em condições de anaerobiose e na presença de luz.

O grupo de pesquisas do Núcleo de Processos Biotecnológicos (NUCBIO) da Universidade Federal de Uberlândia possui uma linha de pesquisa voltada para a produção biológica de hidrogênio. Alguns trabalhos de destaque são apresentados abaixo.

- [OLIVEIRA et al. \(2014\)](#) verificaram a produção de hidrogênio por cepas de *Rhodopseudomonas palustris* e *Rhodobacter capsulatus*. Foi avaliada pelos autores a influência de diferentes fontes de carbono como ácidos orgânicos e lactose e diferentes fontes de nitrogênio como glutamato de sódio e extrato de levedura. Os autores verificaram que o ácido málico e a glutamato de sódio favoreceram a produção de hidrogênio.
- [MOREIRA et al. \(2017\)](#) estudaram a produção biológica de hidrogênio empregando diferentes tipos de fonte de carbono como substrato em um sistema híbrido combinando uma etapa inicial de fermentação escura por consórcio microbiano e fotofermentação por bactérias púrpuras não sulfurosas. Os substratos utilizados durante os processos fermentativos foram glicose, lactose proveniente do permeado de soro de leite em pó. Os autores observaram que a fermentação em que a glicose e lactose foi alimentada de forma simultânea ao meio promoveu a maior produtividade de hidrogênio.
- [MACHADO et al. \(2018\)](#) avaliaram a produção do biogás empregando um sistema de co-cultura das espécies *Rhodopseudomonas palustris* e *Rhodobacter capsulatus*. Foi estudada a influência dos açúcares glicose e a lactose suplementados no efluente da fermentação escura. Os autores observaram o que a fotofermentação empregando o sistema de co-cultura das espécies é uma rota biológica viável para a produção de hidrogênio.

Em face ao exposto, esse trabalho foi realizado com o intuito de estudar a produção de hidrogênio por fotofermentação, empregando bactérias fotossintetizantes púrpuras não sulfurosas *Rhodobacter capsulatus* e *Rhodospirillum rubrum* em sistemas de cultura pura e co-cultura. Foram utilizados biorreatores de 50 mL (escala reduzida) e reator de tanque agitado de 1,5 L (escala ampliada) empregando como substrato a lactose proveniente do permeado de soro de leite em pó na concentração de 10 g/L. Em escala ampliada o modo de operação foi a batelada sequencial que substitui periodicamente o meio reacional permitindo que os metabólitos não se acumulem.

CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS

Avaliar a produção biológica de hidrogênio por fotofermentação em escala reduzida, com reatores de 50 mL e em escala ampliada, com reator de tanque agitado de 1,5 L em batelada sequencial empregando a lactose proveniente do permeado de soro de leite em pó como fonte de carbono e utilizando sistemas de cultura pura de *Rhodobacter capsulatus* e *Rhodospirillum rubrum* e co-cultura dessas espécies.

2.1 – Objetivos específicos.

- Investigar o uso da lactose proveniente do permeado de soro de leite como fonte de carbono para bactérias fototróficas produtoras de hidrogênio;
- Estudar as cinéticas dos processos fotofermentativos quanto à produção de biomassa, à evolução de ácidos orgânicos e à síntese de hidrogênio;
- Verificar o desempenho de culturas puras de *R. capsulatus* e *R. rubrum* e avaliar o uso de co-culturas dessas cepas na produção de hidrogênio; e
- Avaliar a eficiência do uso do sistema batelada sequencial em reator de tanque agitado (1,5 L) visando aumento da produção de hidrogênio.

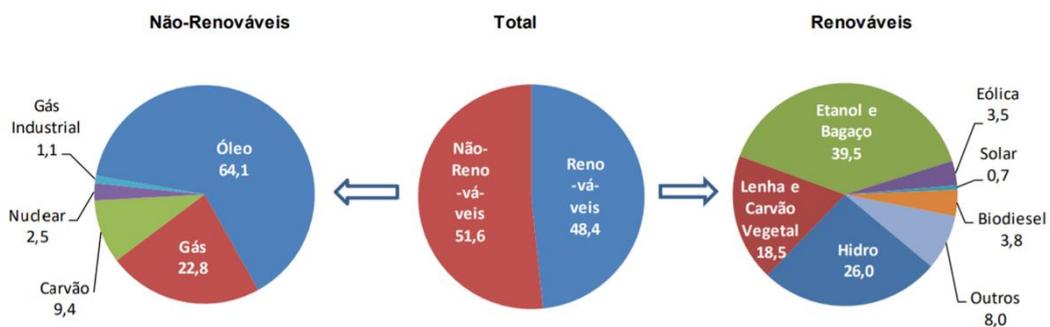
CAPÍTULO 3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 - Balanço energético mundial e uso dos combustíveis fósseis.

Nos últimos 47 anos, a Matriz Energética mundial apresentou significativas alterações estruturais (Resenha Energética Brasileira, 2021). Destaca-se um forte recuo na participação de derivados de petróleo e um aumento no uso de energias renováveis. A redução no uso do petróleo e derivados na matriz energética mundial reflete o esforço de substituição desses produtos cuja a queima resulta na produção de gases do efeito estufa, em especial o CO₂, que direta ou indiretamente é um agente causador do aquecimento global. A pandemia do COVID-19 também afetou o consumo de derivados de petróleo com uma previsão de queda de 9,3% no Brasil em 2020 de acordo com a Resenha Energética Brasileira de 2021 (ano base 2020). Embora a participação dos derivados do petróleo frente a Matriz energética mundial tenha decrescido, a parcela correspondente aos combustíveis fósseis no consumo global de energia foi apenas sete pontos percentuais menor no ano de 2018 do que em 1978 sendo 85% do consumo total oriundo do carvão, petróleo e gás natural (KOBBER et al. 2020).

Ainda segundo a Resenha Energética Brasileira, a Oferta de Energia Interna (OEI) brasileira em 2020 foi de 287,6 milhões de TEP (Toneladas Equivalentes de Petróleo) mostrando recuo de 2,2% em relação a 2019. As fontes renováveis de energia apresentaram alta de 2,5%, sustentada por altas em produtos da cana e do biodiesel. A oferta hidráulica, entretanto, foi afetada negativamente devido ao baixo regime de chuvas no período enquanto os combustíveis fósseis foram afetados pela pandemia do COVID-19 com maior contribuição da diminuição do uso dos transportes aéreo e de veículos leves. A Figura 3.1 ilustra resumidamente os dados da OEI no Brasil:

Figura 3.1 - Oferta de Energia Inteira brasileira 2021 (ano base 2020)



FONTE: Resenha Energética Brasileira 2021

Baird et al. (2011) citam os combustíveis fósseis como grandes responsáveis pela degradação ambiental na atualidade atribuindo seu uso a complicações relacionadas ao efeito estufa e o aquecimento global. O uso dos combustíveis fósseis acarreta também danos a vegetação e ao ecossistema aquático do planeta além da liberação de gases de combustão como os óxidos de carbono, nitrogênio e enxofre prejudiciais a camada de ozônio e causadores do fenômeno chuva ácida (VALDEZ-VAZQUEZ; POGGI-VARALDO, 2009). As reservas limitadas destas fontes e os danos ambientais causados pela extração e queima dos combustíveis fósseis motivam pesquisadores e empresas a buscarem alternativas viáveis as fontes não renováveis (VERZIRO et al. 1992; LONG et al. 2015). Segundo Adua et al. (2021) um aumento no uso da energia renovável em 1% resulta em uma redução de 0,69% no CO₂ liberado na atmosfera.

3.2 – Hidrogênio como fonte energética.

O hidrogênio é um dos elementos mais abundantes no universo encontrado, em sua maior parte, na forma de compostos, geralmente, ligado a moléculas de água e hidrocarbonetos. Existe naturalmente na forma de dois átomos de hidrogênio ligados pelo compartilhamento de elétrons (ligação covalente) (VARGAS, 2006). É um gás inodoro, incolor e atóxico (JOHNSTON et al. 2005). Trata-se do elemento químico mais leve da tabela periódica com massa molar de 1,0079 g/mol e uma densidade de 0,09 g/cm³. Em condições normais de temperatura e pressão, o hidrogênio molecular apresenta-se no estado gasoso (MIRA, 2012). Como fonte energética se destaca por possuir o mais alto teor de energia por unidade em peso do que qualquer outro combustível (248 kJ/mol) (HAY, 2013). Em razão disso, o hidrogênio é visto por vários pesquisadores como a energia do futuro pois além de possuir um excelente potencial energético, a sua queima resulta na produção somente de água, já que a molécula de hidrogênio não é quimicamente ligada a nenhum átomo de carbono não produzindo nenhum gás tóxico ou causador do efeito estufa (DAS e VEZIROGLU, 2008). Destacam-se como fontes naturais de hidrogênio: gás natural, metanol, água, biomassa e metano (KORDESCH, 1996).

Em um sistema de Célula a Combustível (CaC), emprega-se o hidrogênio no papel de agente redutor que se torna capaz de fornecer uma produção contínua de energia. A transformação da energia de Gibbs da reação em energia elétrica é dada por meio da geração de uma corrente e ocorre com a oxidação do hidrogênio e a redução do oxigênio (APPLEBY, 1994). A equação global do processo é apresentada pela Equação 3.1:



Embora permitam a utilização de inúmeros combustíveis, a utilização do hidrogênio puro empregada em sistemas de células a combustível traz vantagens como não necessitar de reformadores diminuindo o tamanho e custo do sistema, além de não contaminar as membranas e eletrodos que são sensíveis a alguns compostos (VARGAS, 2006). Usualmente as células a combustível classificam-se pelo tipo de eletrólito utilizado e pela temperatura de operação (VIELSTICH et al., 2003).

O uso de células a combustível a hidrogênio tem crescido a passos largos (NICOLAY et al., 2021; LI, 2022). A tecnologia CaC mais pesquisada e implantada hoje é a PEM (*Proton Exchange Membrane*), que usa uma membrana de ácido sulfônico e material catalisador de metal nobre revestido nos eletrodos operando tradicionalmente a cerca de 80 °C, sendo consideradas uma entre as mais promissoras como alternativa para a substituição aos motores a combustão interna. Embora um progresso expressivo tenha sido feito nas últimas décadas, ainda existem várias questões críticas de materiais relacionadas a custos e durabilidade que devem ser superadas, especialmente para aplicações automotivas. As camadas de eletro catalisador são um componente chave de custo e desempenho, onde há uma necessidade atual de maior desempenho e materiais mais duráveis (LIPMAN; WEBER, 2019).

O uso de hidrogênio não se limita à aplicação como combustível. De acordo com Das e Veziroglu (2008), as indústrias de fertilizantes e do petróleo representam as maiores consumidoras de hidrogênio em nível mundial com parcelas de respectivamente 50% e 37% do consumo total sendo empregado na fabricação de fertilizantes derivados de amônia e no tratamento do petróleo bruto. A Tabela 3.1 apresenta as aplicações do hidrogênio na indústria (FONTE: Adaptado de CRUZ, 2010).

Tabela 3.1 - Aplicações do hidrogênio em diversos seguimentos da indústria.

Seguimento	Aplicações
Processos Químicos	Fabricação de amônia, metanol, cloro e soda cáustica
Indústria do Petróleo	Remoção de enxofre dos combustíveis e hidrocraqueamento
Indústria Farmacêutica	Fabricação de Sorbitol usado em cosméticos e vitaminas
Indústria alimentícia	Hidrogenação de óleos e saturação de gorduras
Geração de energia	Fonte de energia térmica em queimadores ou insumo de CaC

3.3 – Produção Industrial de hidrogênio.

Grande parte do hidrogênio produzido no mundo, especialmente para a indústria petroquímica, é obtida a partir do gás natural, através da reforma catalisada a vapor de metano (MOMIRLAN; VEZIROGLU, 2002). Segundo Neves (2009), 40% da produção mundial do hidrogênio é realizada a partir da reforma do metano. Destaca-se igualmente 30% da produção mundial a partir da oxidação parcial de hidrocarbonetos pesados, 18% da gaseificação do carvão e 5% a partir de eletrólise da água. A Tabela 3.2 resume o custo de operação dos métodos empregados para a produção de hidrogênio (FONTE: KAYFECCI et al., 2019).

Tabela 3.2 - Custo de produção de hidrogênio por diferentes métodos

Método	US\$.kmol ⁻¹
Reforma a vapor de metano	4,54
Oxidação parcial de hidrocarbonetos	2,96
Gaseificação do carvão mineral	2,68
Eletrólise solar da água	10,20 – 20,98

Na reforma a vapor, o metano reage com o vapor de água na presença de um catalizador (usualmente de níquel), produzindo gás hidrogênio e monóxido de carbono, em temperaturas de 750 – 1000 °C. Em se tratando de uma reação altamente endotérmica ($\Delta H^\circ_{298k} = + 206,2$ kJ/mol), a reação requer calor para que aconteça. A reforma do metano é apresentada pela Equação 3.2 (HOLLADAY et al., 2009).



A corrente de gás reformada contém monóxido de carbono em excesso podendo ser convertido em hidrogênio e dióxido de carbono pela reação de deslocamento da água aumentando, assim, o rendimento do processo em hidrogênio (KAYFECCI et al. 2019). A reação de deslocamento do vapor d'água é apresentada pela Equação 3.3:



A oxidação parcial de hidrocarbonetos (notavelmente metano) é proposta como alternativa a reforma a vapor pois permite uso de sistemas mais compactos e de baixo custo de investimento já que a reação de oxidação é exotérmica ($\Delta H^\circ_{298k} = -36 \text{ kJ/mol}$) o que permite uso de reatores menos robustos e um tempo de resposta mais curto para variações na carga (CORTEZ, 2008). A reação direta da oxidação parcial catalítica é apresentada pela Equação 3.4:



Para maximizar a produção de hidrogênio submete-se o gás de síntese formado pela oxidação parcial do metano à reação de deslocamento da água, assim como na reforma a vapor (CHAUBEY et al., 2013).

A gaseificação do carvão é uma das tecnologias mais maduras de produção de hidrogênio (RIBEIRO; PARIZZI, 2013). Tais reações consistem na decomposição térmica de um material carbonáceo formando o gás de síntese (CO_2 , CO , H_2 , CH_4 , H_2O) e alguns particulados como alcatrão, cinzas e carvão. A gaseificação ocorre em altas temperaturas, variando de $500 \text{ }^\circ\text{C}$ à $1400 \text{ }^\circ\text{C}$, e em pressões atmosféricas ou superiores, podendo chegar à 33 bar (HERNÁNDEZ et al., 2013).

O processo que quebra a molécula da água em hidrogênio e oxigênio é denominado eletrólise da água. Trata-se de um sistema onde há o fornecimento de corrente contínua entre os eletrodos, sendo os mesmos separados por um eletrólito com boa condutividade iônica (NETO; MOREIRA, 2007). A formação do hidrogênio pelo processo de eletrólise da água é indicada pela Equação 3.5:



O método por eletrólise apresenta alto custo quando comparado a reforma a vapor uma vez que a reação é muito endotérmica e requer, portanto, fornecimento de energia (KAYFECI et al., 2019). Entretanto, obtém-se uma alta pureza de hidrogênio necessária em algumas aplicações fator, o qual justifica a participação da eletrólise no mercado (SØRESEN et al., 2004).

Nota-se que as rotas convencionais para a produção de hidrogênio podem ser potencialmente onerosas em função das condições operacionais e custos de operação. Os

processos tornam-se comercialmente desinteressantes levando em consideração também rotas termoquímicas que fazem uso de combustíveis fósseis que, conforme já estabelecido, são os grandes responsáveis pela degradação ambiental apresentando complicações relacionadas ao efeito estufa e o aquecimento global. Uma alternativa surge na produção biológica do hidrogênio, também chamado de biohidrogênio. Os processos biológicos de produção de hidrogênio são realizados em temperatura e pressão ambiente (DAS e VERZIROGLU, 2008). Além disso, destaca-se também a possibilidade da utilização de biomassa de resíduos como substrato o que torna o processo ainda mais atrativo de um ponto de vista ecológico.

3.4 – Produção biológica de hidrogênio.

A produção biológica de hidrogênio é o resultado da atividade metabólica de microrganismos (microalgas, cianobactérias, bactérias fotofermentativas ou fermentativas) que se resume, de forma geral, na degradação de substratos ricos em matéria orgânica para a formação de biogás. Tais substratos podem ser resíduos agroindustriais ou mesmo quaisquer outros subprodutos orgânicos de um processo industrial (LOURENÇO, 2012).

A produção do biohidrogênio é majoritariamente baseada em quatro processos principais. A biofotólise direta da água, na qual microalgas verdes têm a capacidade de capturar energia solar e gerar hidrogênio a partir da água e CO₂. Já a biofotólise indireta envolve tipicamente cianobactérias que utilizam a energia armazenada nos carboidratos oriundos da fotossíntese para gerar hidrogênio a partir da água (SÁ et al., 2014). Na fermentação escura, as bactérias anaeróbias geram o biogás empregando a matéria orgânica proveniente de resíduos agrícolas e águas residuais. E, a produção de hidrogênio por fotofermentação é realizada pela ação de bactérias púrpuras não-sulforosas (PNS) a partir de várias fontes de carbono usando energia luminosa. Destaca-se também a existência dos chamados sistemas híbridos que podem empregar dois processos biológicos realizados em sequência de forma a aumentar o rendimento global de hidrogênio. A Tabela 3.3 apresenta as principais vantagens e desvantagens dos processos biológicos mencionados.

3.4.1 – Biofotólise direta.

No processo de biofotólise direta da água, organismos fotoautotróficos convertem moléculas de água em hidrogênio com atividade catalítica da enzima hidrogenase usando energia luminosa em condições anaeróbias (TAMAGNINI et al. 2002).

Tabela 3.3 - Tecnologias para a produção de biohidrogênio

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 .	<i>Chlamydomonas reinhardii</i> ; <i>Platymonas subcordiformis</i> .
Biofotólise indireta	Produção de H ₂ a partir da água; Habilidade de fixação de N ₂ e produção de H ₂ pelas nitrogenases;	Necessita de iluminação constante; Necessidade de ATP pelas nitrogenases; CO ₂ presente no gás.	<i>Plectonema boryanum</i> ; <i>Anabaena siamensis</i> ; <i>Anabaena variabilis</i> .
Fermentação escura	Ampla variedade de fontes de carbono como substrato; Não necessita de iluminação; Produção de metabólitos intermediários de grande valor agregado.	Tratamento do efluente após fermentação; CO ₂ presente no gás.	<i>Clostridium sp.</i> ; <i>Enterobacter cloacae</i> ; <i>Escherichia coli</i> .
Foto-fermentação	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 presente no gás.	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> ; <i>Rhodobacter capsulatus</i> ; <i>Rhodospirillum rubrum</i> .

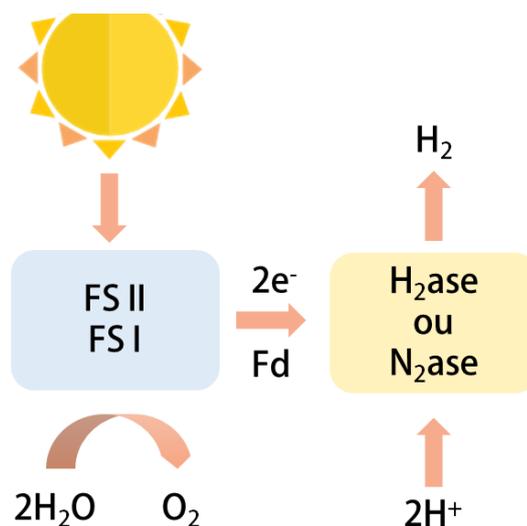
Fonte: Adaptado de [SÁ et al. 2014](#)

As Equações 3.5 e 3.6 descrevem as reações envolvidas no processo de biofotólise direta:



As cianobactérias e as algas verdes são dois grupos de microrganismos que realizam o processo de biofotólise direta. Em condições anaeróbias, as algas verdes podem produzir hidrogênio mediante iluminação ou absorver hidrogênio através do processo de fixação de CO₂ no escuro (KIM et al., 2011). Conforme indicado pela Figura 3.2, durante a biofotólise direta os fótons de luz são capazes de separar as moléculas de água em prótons (H⁺) e oxigênio através do chamado fotossistema II (FS II). Em consequência disso, elétrons são formados e ATP é gerado através dos elétrons que atravessam a membrana fotossintética que conecta o fotossistema II ao fotossistema I (FS I). Os elétrons gerados pelo sistema são transferidos à proteína ferredoxina (Fd) pelo FS I.

Figura 3.2 - Esquema representativo biofotólise direta



Fonte: Adaptado de HALLENBECK (2002)

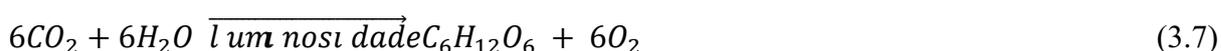
A partir daí, a ferredoxina pode doar os elétrons à enzima [Fe-Fe]-hidrogenase que catalisa a produção de hidrogênio pela ação dos microrganismos em condições de anaerobiose

ou reduzir NADP em NADPH que então é usado na fixação de CO₂ por meio do ciclo de Calvin (MCKINLAY et al. 2010). A presença de oxigênio inibe a ação da hidrogenase desfavorecendo a produção de hidrogênio já que essas enzimas são extremamente sensíveis ao O₂. De maneira oposta as algas verdes, as cianobactérias têm a enzima [NiFe]-hidrogenases que não são tão sensíveis ao oxigênio como as [FeFe]-hidrogenases (hidrogenase de algas verdes). A via de transporte de elétrons de algas verdes e cianobactérias é a mesma, exceto que, para as cianobactérias, a ferredoxina doa elétrons para a [NiFe]-hidrogenase (GHIRARDI et al. 1997). A Figura 3.2 apresenta um esquema da biofotólise realizada por algas verdes e cianobactérias.

3.4.2 – Biofotólise Indireta.

No processo de biofotólise indireta, as cianobactérias utilizam a energia armazenada nos carboidratos oriundos da fotossíntese para gerar hidrogênio a partir da água (SÁ et al. 2014). Nesse processo, carboidratos como o glicogênio são acumulados no sistema durante a fixação do CO₂ na etapa fotossintética enquanto O₂ é produzido.

Para a produção de hidrogênio, a matéria orgânica produzida na primeira etapa do processo é utilizada como substrato na segunda etapa em condições anaeróbicas (HUESEMANN et al. 2010). A sequência de reações fotoquímicas no processo de biofotólise indireta é apresentada pelas Equações 3.7 e 3.8:



Na fase clara, a luz atua como fonte de energia para que o CO₂ sofra reação química com a molécula de água gerando carboidratos (C₆H₁₂O₆) e O₂. Em uma segunda fase anaeróbia e na ausência de luz, os elétrons e prótons gerados serão utilizados para a produção de H₂ (SOUZA, 2017). Diferentemente do processo de biofotólise direta, não há inibição das hidrogenases pela presença de O₂ uma vez que a etapa de síntese de O₂ é realizada de forma separada da etapa de síntese de H₂ (EROGLU et al., 2011).

3.4.3 – Fermentação escura.

A fermentação escura é um dos processos mais empregados para a produção biológica de hidrogênio (TURON et al. 2016; BUNDHOO, 2017).

O biogás é o produto da ação de bactérias fermentativas capazes de empregar inúmeros substratos orgânicos como resíduos alimentícios, subprodutos agropecuários ou águas residuárias e os transforma em produtos mais simples tais como ácidos orgânicos voláteis (ácido lático, acético, propiônico, butírico) e hidrogênio. Em comparação aos processos baseados em fotossíntese, pode ser considerada mais vantajosa já que dispensa a disponibilidade de luz facilitando a implementação em larga escala.

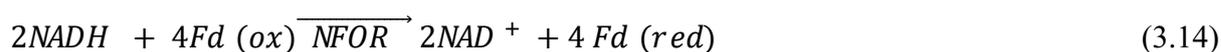
Na fermentação escura, a produção de hidrogênio é associada principalmente a ação da enzima hidrogenase. Segundo Oh et al. (2011), existem três possíveis sistemas reacionais envolvidos na fermentação escura. O primeiro sistema envolve a ação de duas enzimas: a Piruvato Formiato Liase (PFL) e a Hidrogênio Formiato Liase (HFL). O piruvato formado é separado em acetil-CoA e formiato por meio da ação catalítica da PFL sob condições de anaerobiose. Em seguida, uma vez que a concentração do formiato é grande o suficiente para ativá-la, a HFL entra em ação e o formiato é novamente quebrado para a formação de hidrogênio e dióxido de carbono. Entretanto, sob certas condições a degradação do formiato é baixa, resultando em baixas conversões. As Equações 3.9 e 3.10 apresentam o sistema reacional formado pela ação das enzimas PFL e HFL.



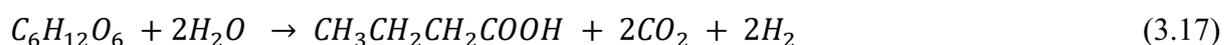
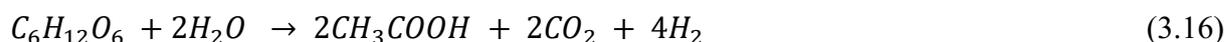
O segundo tipo de sistema reacional descrito na literatura para a produção de biohidrogênio por fermentação escura envolve a oxidação do piruvato em acetil-CoA pela redução da ferredoxina através da enzima piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFOR). A ferredoxina reduzida Fd (red) é, em seguida, oxidada em Fd (ox) e libera hidrogênio molecular. Nesse sistema, uma grande variedade de produtos reduzidos podem ser formados como butanol, etanol, e acetona a depender das condições de operação. As Equações 3.11 e 3.12 apresentam o sistema reacional formado pela ação da enzima PFOR.



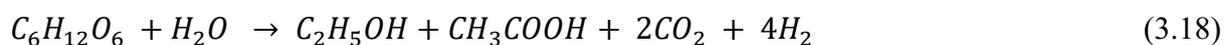
O terceiro tipo de reação, típico em muitas bactérias termofílicas e várias espécies de *Clostridium*, é catalisado pela enzima NADH: ferredoxina oxidoreductase (NFOR). Nessa reação, a Fd(ox) é reduzida pelo NADH, que é formado durante o metabolismo do carbono. Em seguida, os elétrons da Fd(red) são transferidos para prótons para formar hidrogênio molecular. As equações 3.13, 3.14 e 3.15 apresentam o sistema reacional formado pela ação da enzima NFOR.



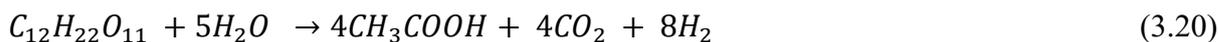
Além da produção de H₂ ocorre a formação de ácidos orgânicos voláteis (acético, propiônico, láctico, butírico), etanol e butanol. Segundo [Levin, Pitt e Love \(2004\)](#), quando o ácido acético é o produto final, o máximo rendimento teórico obtido é 4 mol H₂/mol glicose (Equação 3.16) e 2 mol H₂/mol glicose quando o produto final é o butirato (Equação 3.17).



Para uma produção final de etanol e ácido acético, o rendimento é de 2 mol H₂/mol de glicose (Equação 3.18). Obtendo como produto final o ácido propiônico, não há rendimento de hidrogênio, o consumo da glicose juntamente com o do hidrogênio produz o ácido propiônico (Equação 3.19) ([CHONG et al., 2009](#)):



Empregando a lactose como substrato, o rendimento da produção de hidrogênio depende da rota fermentativa e dos produtos finais. Nas Equações 3.20 e 3.21, pode-se notar que o rendimento teórico de hidrogênio em termos de lactose consumida pode atingir valores de 8 mol H₂/mol lactose se a rota for de formação do ácido acético e de 4 mol H₂/mol lactose se a rota for de formação do ácido butírico. (DAVILA-VAZQUEZ et al., 2011).



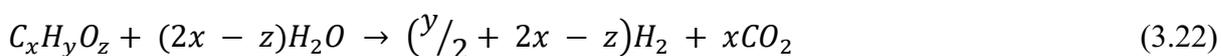
3.4.4 – Fotofermentação.

A fotofermentação é um processo que emprega bactérias fotossintéticas capazes de converter substratos orgânicos em hidrogênio e dióxido de carbono em condições anaeróbias e sob iluminação. A nitrogenase é a principal enzima envolvida no processo fotofermentativo e sua síntese é fortemente estimulada pela luz. Por outro lado, o nitrogênio é reconhecido na literatura como um inibidor da nitrogenase (GOLDING; DONG, 2010; AKKÖSE, 2009). Koku et al. (2002) observaram que uma concentração de 20 mM de amônia provou ser suficiente para inibir a atividade da nitrogenase enquanto, segundo Eroglu et al. (2011), a produção de biohidrogênio foi aumentada na ausência de sais de amônio.

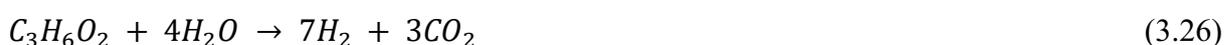
Inúmeros fatores influenciam o processo fotofermentativo dentre os quais cita-se a intensidade luminosa, idade do inóculo, tipo de substrato e temperatura (BASAK; DAS, 2007). A temperatura na qual a fermentação acontece é capaz de mudar a rota metabólica das bactérias. Segundo Basak e Das (2007) a faixa de temperatura ótima que favoreceu a produção de biohidrogênio por fotofermentação com o microrganismo *Rhodobacter sp.* foi determinada entre 31 e 36°C. Segundo Eroglu et al. (2011) espécies fotossintéticas diferentes possuem pigmentos-antena diferentes. Os pigmentos-antena são responsáveis pela captação da energia luminosa. Essa constatação justifica a importância da intensidade luminosa em um processo de fotofermentação. Além disso, a idade do inóculo foi relatada como um fator que influencia o desempenho na produção de hidrogênio. Basak e Das (2007) observaram que espécies inoculadas em meio de fermentação que estavam na fase exponencial de crescimento apresentaram melhores desempenhos quando comparadas as espécies inoculadas na fase estacionária. Liu et al. (2015), concluíram, analogamente, que a idade do inóculo afetou a

produção de hidrogênio e maior produtividade na produção de hidrogênio com um inóculo na fase exponencial.

As bactérias fotossintetizantes responsáveis pela produção de biohidrogênio são capazes de empregarem inúmeros substratos orgânicos para crescimento e produção de biogás (MATHEWS; WANG, 2009). Embora a literatura destaque o uso de ácidos orgânicos voláteis (ácido láctico, ácido málico, ácido acético, ácido butírico) como substratos, as espécies fotossintéticas são também capazes de converter açúcares simples e complexos em hidrogênio (KESKIN et al., 2011). De acordo com LOSS et al. (2009) a Equação 3.22 apresenta o rendimento teórico quando todo o substrato consumido é utilizado unicamente para a produção de hidrogênio.

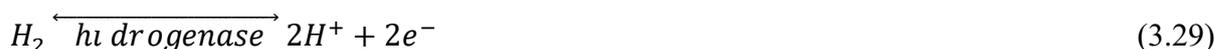


A partir da Equação 3.22 os rendimentos teóricos para o consumo dos ácidos orgânicos voláteis málico, láctico, ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico são apresentado respectivamente nas Equações 3.23 a 3.27:



O metabolismo do biohidrogênio é associado principalmente a ação das enzimas nitrogenase e hidrogenase. A nitrogenase desempenha seu papel catalisando a produção de biogás sob condições limitantes em nitrogênio (Equação 3.28) enquanto a enzima hidrogenase oxida o hidrogênio de forma a reciclar elétrons, prótons e ATP para o metabolismo energético (Equação 3.29). A ação da hidrogenase depende das condições do sistema podendo consumir hidrogênio (na presença de receptor de elétron) ou produzir hidrogênio (em condições de

anaerobiose) (Equação 3.29). Dessa forma o hidrogênio total produzido é o gás formado pela ação da nitrogenase menos aquele consumido pela ação da hidrogenase (HAY, 2013).



A reação de produção de hidrogênio pela ação da nitrogenase é irreversível e requer 4 ATP para cada mol de biogás produzido. A taxa de produção de biohidrogênio dependente de ATP diretamente proporcional à intensidade da luz até um certo nível que não iniba o crescimento celular (KOKU et al. 2002). Sob condições anaeróbias, o substrato é oxidado durante o ciclo de Krebs produzindo H^+ CO_2 e elétrons. A transferência dos elétrons produzidos pelo ciclo de Krebs para a nitrogenase é possível pela coenzima NAD e da ferredoxina. A nitrogenase então combina os elétrons com os prótons H^+ e permite a produção de hidrogênio. A Figura 3.3 apresenta uma simplificação do processo de produção de hidrogênio por fotofermentação.

Figura 3.3 – Esquema representativo da produção de biohidrogênio por fotofermentação



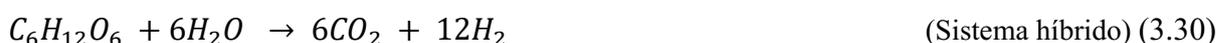
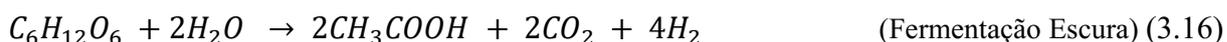
Fonte: Adaptado de GOLOMYSOVA et al., 2010

Algumas alternativas para aumentar a produtividade dos processos fotofermentativos realizados por bactérias do filo PNS tem sido desenvolvidas. Estratégias relacionadas a uma melhor distribuição de luz tem sido propostas em ensaios realizados em larga escala (ZHANG et al., 2018). Entretanto, tem-se relatado que os ácidos orgânicos voláteis produzidos durante o metabolismo celular inibem a produção de biohidrogênio (KESKIN et al., 2011; KAPDAN et al., 2009; BUNDHOO et al. 2016). A concentração acentuada de metabólitos no meio reacional tem efeito inibitório pois podem potencialmente dificultam a ação da nitrogenase. O desenvolvimento de novas tecnologias que visam aumentar a produção de biohidrogênio buscar desenvolver novas cepas de bactérias fotossintéticas que têm maior tolerância à altas concentrações de ácidos orgânicos (HAY, 2013). Outra estratégia amplamente estudada é a

combinação das etapas de fermentação escura e fotofermentação implementadas como etapas sequenciais em sistemas denominados sistemas híbridos.

3.4.5 – Sistemas híbridos.

O processo de produção de biohidrogênio híbrido combina as operações de fermentação escura e fotofermentação de forma a aumentar o rendimento e a conversão de um substrato. Os ácidos orgânicos voláteis formados como subprodutos da fermentação escura podem ser reutilizados como substrato por bactérias fotossintetizantes durante uma etapa de fotofermentação. Segundo [Basak e Das \(2007\)](#), o rendimento teórico do sistema híbrido que combina duas etapas sequenciais é de 12 mol de hidrogênio/mol de glicose consumido conforme indicado pelas Equações 3.16 (Fermentação escura), 3.25 (Fotofermentação) e 3.30 (Sistema híbrido) ([DAS e VEZIROGLU, 2008](#)).



O estudo de [Yang et al. \(2010\)](#) avaliou a produção de biohidrogênio a partir do sabugo do milho implementando sistema híbrido. A produção de biohidrogênio na primeira etapa foi atribuída pelos autores principalmente à conversão dos açúcares redutores e oligossacarídeos do sabugo de milho em biogás. Na segunda etapa, a produção de hidrogênio ocorreu devido à degradação de ácido acético, ácido butírico, álcool butílico e etanol presentes no efluente de fermentação escura.

[Kim et al. \(2006\)](#) estudaram a produção de hidrogênio por sistema híbrido empregando as espécies *Chlamydomonas reinhardtii* e *Rhodobacter sphaeroides* respectivamente nas etapas de fermentação escura e fotofermentação. Os ácidos orgânicos no efluente fermentado da biomassa de algas realizado na etapa escura foram consecutivamente transformados em hidrogênio em condição de anaerobiose. Os autores constataram que somente 80% dos ácidos orgânicos produzidos (majoritariamente ácido butírico) foi consumido. Os autores obtiveram uma conversão total de 8,30 mol H₂/mol de glicose, atingindo aproximadamente 70% da conversão teórica.

O uso de sistema híbrido empregado por [Tao et al. \(2007\)](#) garantiu um aumento expressivo no rendimento em hidrogênio. Em um primeiro momento os autores realizaram uma fermentação escura de estágio único empregando sacarose como substrato e um consórcio microbiano. Foi obtido pelos autores uma conversão de 3,67 mol de H₂/mol de sacarose consumido. Os ácidos orgânicos produzidos pela etapa escura foram majoritariamente ácido butírico e ácido acético. Em seguida, com o efluente da primeira etapa os autores realizaram um procedimento fotofermentativo empregando a espécie *Rhodobacter sphaeroides*. O rendimento final do processo teve um aumento e atingiu 6,63 mol H₂/mol de sacarose.

O estudo de [Policastro et al. \(2022\)](#) também fez uso do sistema híbrido para a produção de biohidrogênio. O processo realizado pelos autores incluiu uma primeira etapa de fermentação escura realizada por um consórcio microbiano proveniente de um efluente de vinícola. Tal consórcio produziu um efluente rico em etanol a partir de águas residuárias de uma adega. O efluente rico em etanol foi convertido em hidrogênio pela ação de microrganismos fototróficos dentre os quais os autores um consórcio de bactérias PNS. Os autores concluíram que apesar da presença de compostos inibidores, a adoção de uma cultura fototrófica mista permitiu obter bons resultados em termos de produção de hidrogênio.

3.4.6 – Produção de hidrogênio a partir de co-produtos da agroindústria.

A produção biológica de hidrogênio a partir de resíduos ganha cada vez mais destaque ([KUANG et al., 2020](#); [REZAEITAVABE et al., 2020](#)) em especial, resíduos ou co-produtos da agroindústria. As agroindústrias geram uma grande quantidade de resíduos que podem trazer impactos negativos ao meio ambiente quando não dispostos de maneira adequada ([GIRELLI; ASTOLFI; SCUTO, 2020](#)). Os resíduos como bagaço, cascas, cascas de sementes, cascas e polpa fibrosa gasta dos caules das colheitas são ricos em carbono, nitrogênio e nutrientes que podem ser usados na produção de produtos de alto valor agregado ([SARAVANAN et al. 2021](#)). Além disso, substratos como glicose, sacarose e amido tem um custo elevado, tornando o processo economicamente desfavorável.

Embora os resíduos agroindustriais sejam ricos em carboidratos e outros compostos essenciais, certas modificações ou processos de pré-tratamento são necessários para modificar e melhorar as características da matéria-prima para melhor biodegradação e conversão ([BANU, 2021](#)).

O Permeado de Soro de Leite em Pó é um coproduto da produção do concentrado proteico do soro do leite e do isolado proteico do soro do leite. Obtido durante o processo da produção do *Whey Protein*, rico em açúcar derivado do leite, pode ser utilizado para substituir outros carboidratos. Machado et al. (2018) estudaram um procedimento fotofermentativo que empregou o permeado de soro de leite pó e glicose como substratos alimentados ao sistema de forma alternada. Segundo os autores, a produtividade máxima de H₂ foi 287,39 mmol H₂/L.dia obtida com o uso alternado de glicose e permeado de soro de leite.

3.5 – Microrganismos para a produção biológica de hidrogênio.

3.5.1 – Bactérias Púrpuras Não Sulfurosas.

As bactérias fotossintetizantes responsáveis pela produção de biogás são classificadas de acordo com sua preferência pelo substrato. Segundo Longo, Lazzarin e Miguez (2009), as bactérias sulfurosas degradam compostos a base de enxofre e as bactérias não sulfurosas consomem compostos a base de carbono. Dentre as bactérias não sulfurosas destaca-se o filo das PNS (*Purple Non Sulfur*). Bactérias fotossintéticas púrpuras não-sulfurosas (PNS) constituem um grupo não taxonômico de organismos versáteis que podem crescer como fotoheterotróficos, fotoautotróficos ou quimioheterotróficos - mudando de um modo para outro dependendo das condições disponíveis, tais como: grau de anaerobiose, disponibilidade de fonte de carbono e disponibilidade de uma fonte de luz (BASAK; DAS, 2007). A pigmentação característica dessas bactérias é dada pelos pigmentos carotenoides e bacterioclorofilas, que são os responsáveis por absorver a energia luminosa (fótons) (AKKERMAN et al., 2002). As PNS apresentam algumas vantagens em relação a outros grupos de bactérias como o alto rendimento de conversão de substrato em produto e a ausência de oxigênio desejável para a produção de biohidrogênio (BASAK; DAS, 2007). Destaca-se dentro das bactérias fotossintéticas as espécies *Rhodopseudomonas sp.* (VRATI e VERMA, 1983); *Rhodopseudomonas sphaeroides* (MITSUI et al. 1979) e as espécies empregadas nesse trabalho *Rhodobacter capsulatus* e *Rhodospirillum rubrum*.

3.5.2 – Co-culturas.

O uso de co-culturas na produção de biohidrogênio é amplamente discutido na literatura. O estudo de GENG et al. (2010) avaliou a produção biológica de hidrogênio a partir

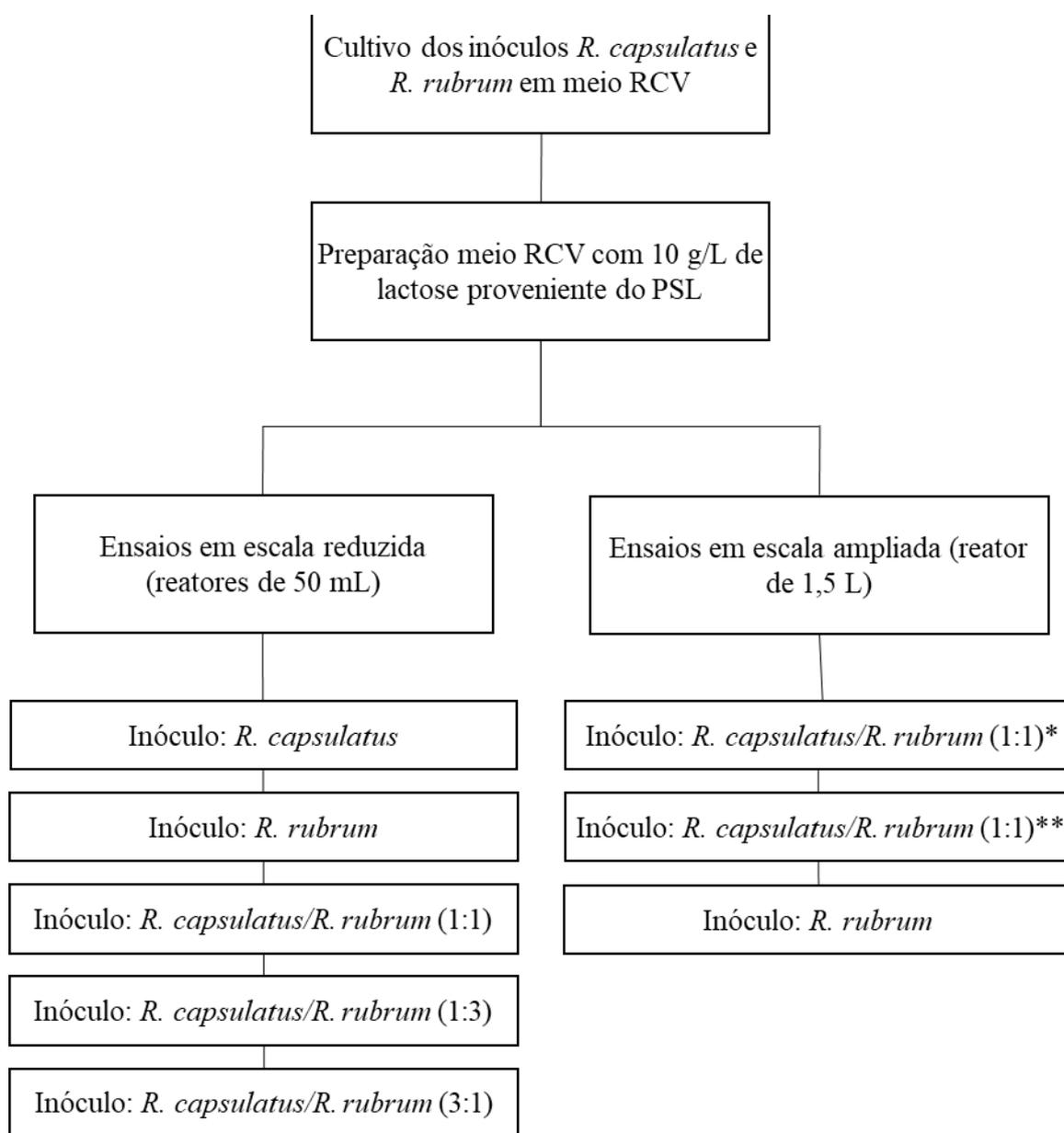
da celulose proveniente da palha de trigo por co-culturas de duas cepas identificadas pelos autores. Foi observado que, devido a atividade metabólica combinada das cepas, o sistema de co-cultura obteve uma produção de hidrogênio aproximadamente duas vezes maior quando comparada a produção de uma das cepas isoladas.

O trabalho de [Moreira et al. \(2021\)](#) estudou a produção de hidrogênio em procedimento fotofermentativo combinando a espécie fermentativa *Enterobacter cloacae* e a bactéria *Rhodobacter capsulatus* em co-cultura. Segundo os autores a combinação de espécies em um sistema iluminado e em condições de anaerobiose garante um tempo de fermentação reduzido além de altas taxas de rendimento. Os autores obtiveram com a adição alternada de glicose e permeado de soro de leite uma produtividade máxima de 319,35 mmol H₂/L.dia em 180 h de processo utilizando a co-cultura (1: 1) de *E. cloacae* e *R. capsulatus*.

CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS

O processo fotofermentativo realizado neste trabalho estudou a produção de hidrogênio em duas escalas. Os ensaios de escala reduzida foram realizados em biorreatores anaeróbios de 50 mL. Os ensaios de escala ampliada foram realizados em reator anaeróbio de tanque agitado STR de 1,5 L (volume útil 700 mL). A Figura 4.1 apresenta o fluxograma dos procedimentos realizados.

Figura 4.1 - Esquema representativo dos ensaios realizados



*Ensaio realizado com revitalização do meio

**Ensaio realizado sem revitalização do meio

4.1 – Bactérias fotofermentativas: *Rhodobacter capsulatus* e *Rhodospirillum rubrum*.

As cepas bacterianas utilizadas nesse trabalho foram as bactérias fotossintetizantes púrpuras não sulfurosas *Rhodobacter capsulatus* DSM 1710 e *Rhodospirillum rubrum* DSM 467, adquiridas da coleção alemã de microrganismos e cultura de células, a DSMZ (*German Collection of Microorganisms and Cell Culture*). O cultivo dos microrganismos foi realizado em meio basal RCV conforme descrito por Weaver et al. (1975) preparado pela dissolução dos itens apresentados nas Tabelas 4.1 e 4.2. Após a dissolução dos reagentes em água deionizada, o pH do meio basal foi ajustado para $6,8 \pm 0,2$ com NaOH (1 M) e, em seguida, esterilizado a 121 ± 1 °C, a 1 kgf/cm² por 20 min.

Tabela 4.1 - Componentes do meio RCV

Reagente	Concentração (g/L)
Ácido Málico - C ₄ H ₆ O ₅	4,02
Fosfato de potássio monobásico - KH ₂ PO ₄	0,60
Fosfato de potássio dibásico - K ₂ HPO ₄	0,90
Sulfato de magnésio - MgSO ₄ .7H ₂ O	0,12
Cloreto de cálcio - CaCl ₂ .2H ₂ O	0,075
Glutamato monossódico – C ₅ H ₈ NO ₄ Na	1,31
EDTA sal dissódico - C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ .2H ₂ O	0,02
Tiamina	0,001
Micronutrientes	1 mL

Tabela 4.2 - Componentes da solução de micronutrientes utilizada no meio RCV

Reagente	Concentração (g/L)
Ácido bórico - H ₃ BO ₃	2,80
Sulfato de manganês - MnSO ₄ .H ₂ O	1,59
Molibdato de sódio - NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,75
Sulfato de zinco - ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,24
Cloreto de cobre (II) - CuCl ₂ .2H ₂ O	0,05

As bactérias foram cultivadas em frascos *schott* (Duran) de 500 mL mantidos em câmara de germinação sob temperatura de 30 ± 2 °C e iluminação de 2500 lux. No período de 14 dias, uma fração do volume do inóculo foi descartada e era feita a reposição com meio basal RCV fresco. O conteúdo do frasco foi, em seguida, preenchido com gás argônio por 3 min para conservar as células em condições de anaerobiose.

4.2 – Substrato: Lactose proveniente do permeado de soro de leite em pó.

Nesse estudo, o substrato empregado foi a lactose proveniente do permeado de soro de leite em pó. O permeado de soro de leite em pó foi adquirido da empresa Sooro Concentrado Indústria de Produtos Lácteos Ltda cuja caracterização é apresentada na Tabela 4.3:

Tabela 4.3 - Caracterização Permeado de soro de leite em pó segundo fabricante

Parâmetro	Resultado
Teor lactose %	71,3
Acidez (%ácido láctico)	Máx. 2,0
Densidade Aparente (g/cm ³)	Mín. 0,6 a 0,8
pH (sol. 10%)	5,8 – 6,7
Partículas Queimadas	Disco A
Cor	Amarelado
Sabor/Odor	Característico lácteos
Aspecto	Uniforme, sem grumos

O meio utilizado nos experimentos de fotofermentação, denominado RCV modificado, foi preparado pela dissolução dos reagentes do meio basal RCV acrescentando a lactose proveniente do permeado de soro de leite em pó como fonte de carbono. O ácido málico não foi adicionado pois o intuito foi estudar somente a lactose como fonte de carbono. Após a dissolução dos reagentes em água deionizada, o pH do meio fermentescível era ajustado para $6,8 \pm 0,2$ com NaOH (1 M) e, em seguida, esterilizado a 121 ± 1 °C, a 1 kgf/cm² por 20 min.

4.3 – Condições dos ensaios realizados em escala reduzida: reatores de 50 mL.

Os ensaios realizados em escala reduzida foram conduzidos em reatores de 50 mL (frascos de penicilina) em duplicata. Nesses ensaios, o volume útil dos reatores foi de 37 mL, sendo 32 mL de meio fermentescível e 5 mL de inóculo. Após a inoculação, o conteúdo do meio foi preenchido com argônio mantendo o sistema em condição de anaerobiose. Os reatores foram, então, selados com um septo de borracha butílica e uma cápsula de alumínio. As fermentações foram conduzidas em câmara de germinação sob temperatura de 30 ± 2 °C e iluminação de 2500 lux. “Frascos de sacrifícios” (que permitem o descarte após análise) foram utilizados em intervalos de tempo definidos para análise do pH, concentração de sólidos voláteis (SV) e composição do meio fermentativo a partir de amostras líquidas de 10 mL. Os ensaios realizados em escala reduzida avaliaram a produção de hidrogênio empregando como substrato a lactose proveniente do permeado de soro de leite em pó na concentração inicial de 10 g/L.

O biogás produzido foi coletado com o auxílio de seringas graduadas (10 mL) e posteriormente armazenados em ampolas gasométricas (Construmaq LTDA. Brasil) para análise. Cada amostra líquida foi centrifugada durante 12 min a 7730 g. A partir do sobrenadante coletado, realizou-se a quantificação da lactose e dos ácidos orgânicos produzidos como resultado do metabolismo celular por cromatografia líquida de alta performance. As células separadas após centrifugação foram utilizadas para análise de concentração de sólidos voláteis pelo método gravimétrico.

Os Ensaios (1-8) foram realizados com concentração celular inicial de 0,2 gsv/L. A proposta do Ensaio 1, foi avaliar a produção de H₂ empregando o microrganismo *R. capsulatus*. Analogamente o Ensaio 2 verificou, nas mesmas condições, a produção de H₂ empregando o microrganismo *R. rubrum*. A fim de investigar o sistema de co-cultura formado entre as cepas *R. capsulatus* e *R. rubrum*, os Ensaios 3, 4 e 5 foram realizados empregando sistemas de co-cultura nas proporções 1:1 (m/m), 1:3 (m/m) e 3:1 (m/m), respectivamente. Os Ensaios 1-5 realizados em escala reduzida verificaram a produção de hidrogênio empregando como fonte de carbono a lactose proveniente do permeado de soro de leite em pó. A fim de verificar a influência da lactose como fonte de açúcar, os Ensaios 1, 2 e 3 foram replicados empregando o meio RCV conforme descrito na Tabelas 4.1 e 4.2. Nesses ensaios, o substrato estudado foi o ácido málico presente no próprio meio RCV. Através dos desses ensaios, é possível determinar a produtividade basal dos microrganismos de *R. capsulatus* (Ensaio 6), *R.*

rubrum (Ensaio 7) e um sistema de co-cultura 1:1 (m/m) (Ensaio 8). A Tabela 4.4 apresenta o esquema de ensaios realizados em escala reduzida.

Tabela 4.4 - Esquema de ensaios realizados em escala reduzida

Ensaio	Bactéria PNS	Meio
1	<i>R. capsulatus</i>	RCV modificado*
2	<i>R. rubrum</i>	RCV modificado*
3	<i>R. capsulatus/ R. rubrum</i> (1:1)	RCV modificado*
4	<i>R. capsulatus/ R. rubrum</i> (1:3)	RCV modificado*
5	<i>R. capsulatus/ R. rubrum</i> (3:1)	RCV modificado*
6	<i>R. capsulatus</i>	RCV
7	<i>R. rubrum</i>	RCV
8	<i>R. capsulatus/ R. rubrum</i> (1:1)	RCV

*RCV modificado: RCV sem ácido málico e contendo 10g/L de lactose proveniente do PSL

4.4 – Condições dos ensaios realizados em escala ampliada: reator de 1,5 L.

Os ensaios realizados em escala ampliada foram conduzidos em reator anaeróbio de tanque agitado (STR) de capacidade 1,5 L módulo Fermentador Tec-Bio-Flex da marca Tecnal, sendo utilizado o volume útil de 700 mL. O reator foi higienizado com álcool 70% e permaneceu 20 minutos sob incidência de luz ultravioleta no fluxo laminar para garantir condições assépticas. Após a adição do meio fermentescível e o inóculo, gás argônio foi borbuhlado por 15 min para garantir a condição de anaerobiose. Imediatamente, o reator foi lacrado e permaneceu sob intensidade luminosa de 5000 lux mantida com lâmpada fluorescente (25 W), temperatura de 32 ± 1 °C e agitação mecânica de 120 rpm. Em intervalos de tempo de 12 horas, amostras de 10 mL do meio reacional foram coletadas com utilização de seringa. Cada amostra foi centrifugada durante 12 min a 7730 g e a partir do sobrenadante coletado, realizou-se quantificação da lactose e dos ácidos orgânicos. As células separadas após centrifugação foram utilizadas para análise de concentração de sólidos voláteis pelo método gravimétrico.

O volume de biogás produzido foi medido por uma coluna de deslocamento de água. Já as amostras gasosas foram coletadas a partir de seringas graduadas de 10 mL e armazenadas em ampolas gasométricas (Construmaq LTDA.), para posterior análise da produção de hidrogênio.

Nos ensaios realizados em escala ampliada, avaliou-se a produção de hidrogênio empregando como substrato a lactose proveniente do permeado de soro de leite em pó na concentração inicial de 10 g/L.

Os Ensaios 9 a 11 realizados em escala ampliada foram operados em modo de batelada sequencial, sistema que permite prolongar o tempo de funcionamento do reator com a revitalização do meio reacional. Essa revitalização foi denominada “corte”. O primeiro corte foi conduzido da seguinte maneira: após a concentração inicial de lactose atingir 20% da concentração inicial, retirou-se 50% do volume reacional. O volume removido foi centrifugado por 12 min a 7730 g e, após a centrifugação, as células coletadas foram suspensas em meio fresco. A concentração de lactose no meio fresco foi calculada de tal forma que a concentração no reator após o corte no reator se mantivesse em torno de 10 g/L. O volume de meio fresco contendo as células coletadas na centrifugação foi então bombeado de volta ao reator e gás argônio foi borbulhado por 15 min para retirada do oxigênio dissolvido. Ao longo do ensaio permitiu-se a queda do pH até o valor mínimo de 5,0 e este valor foi controlado até o final do processo por adição de solução de NaOH (0,1 M). Os cortes subsequentes foram realizados conforme os mesmos critérios definidos para o primeiro. A proposta do Ensaio 9 foi avaliar a produção de H₂ empregando o um sistema de co-cultura formado pelos microrganismos *R. capsulatus* e *R. rubrum* na proporção 1:1 (m/m) com concentração celular inicial de 0,2 gsv/L e concentração inicial de lactose de 10 g/L.

A proposta do Ensaio 10 foi avaliar a produção de H₂ empregando o um sistema de co-cultura das mesmas espécies que no Ensaio 9 em um sistema de batelada sequencial sem a revitalização do meio reacional. Neste ensaio, buscou-se verificar a influência da presença dos ácidos orgânicos produzidos pelo metabolismo celular na produção do biogás. Para tal, a metodologia adotada foi a seguinte: após a concentração inicial de lactose atingir 20% da concentração inicial, o reator era alimentado com lactose proveniente do permeado de soro de leite em pó de forma que a concentração se mantivesse em torno de 10 g/L. Permitiu-se a queda do pH até o valor mínimo de 5,0 valor este controlado por adição de solução de NaOH (0,1 M).

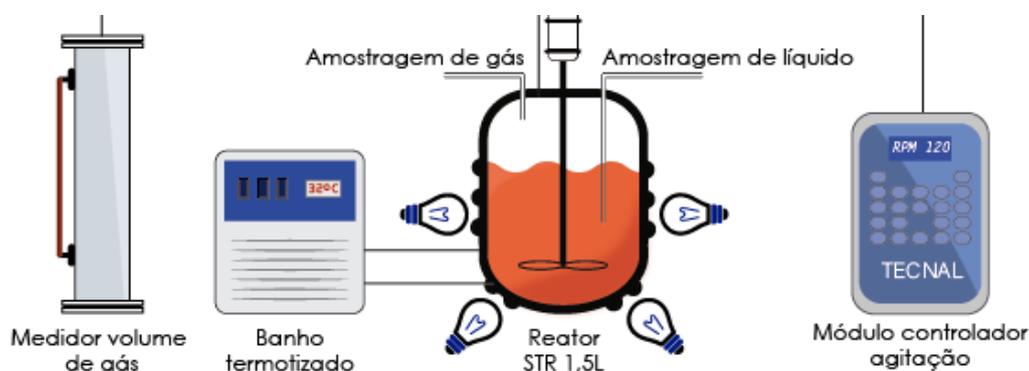
O Ensaio 11 verificou, nas mesmas condições empregadas para o Ensaio 9, a produção de H₂ empregando um inóculo de cultura pura do microrganismo *R. rubrum*. Para tal, a revitalização do meio reacional foi realizada conforme os mesmos critérios definidos para o Ensaio 9. A Figura 4.2 apresenta um esquema representativo da unidade operacional. A Tabela 4.5 apresenta o esquema de ensaios realizados em escala ampliada.

Tabela 4.5 – Esquema de ensaios realizados em escala ampliada.

Ensaio	Bactéria PNS	Modo de Operação
9	<i>R. capsulatus/ R. rubrum</i> (1:1)	BS com revitalização do meio
10	<i>R. capsulatus/ R. rubrum</i> (1:1)	BS sem revitalização do meio
11	<i>R. rubrum</i>	BS com revitalização do meio

BS = Batelada Sequencial

Figura 4.4 - Esquema operacional unidade de escala ampliada



Fonte: Autor (2022)

4.5 – Metodologia analítica e respostas de interesse.

4.5.1 – Determinação da concentração de sólidos voláteis.

O processo de determinação da concentração de celular foi realizado por análise de absorvância da amostra do inóculo e correlacionada com a concentração em massa de sólidos voláteis de células (gsv/L), baseado no método gravimétrico de análise, conforme apresentado por [Apha \(2005\)](#). Para construir a curva de calibração, amostras de 30 mL (em triplicata)

foram retiradas da solução mãe (cepas repicadas em meio líquido nos frascos *schott*) e centrifugadas a 7730 g por 12 min. O sobrenadante foi descartado e o procedimento foi repetido fazendo duas lavagens com água destilada. O sedimento obtido foi transferido para um cadinho previamente seco em mufla (2 horas em 550 °C) e pesado. Os cadinhos secos foram levados à estufa a 105 °C durante 24h e, em seguida, realizou-se a pesagem do cadinho com a massa seca. Para a determinação da massa de sólidos voláteis, os cadinhos foram levados à mufla a 550°C durante 30 min. Após 30 min, os cadinhos foram colocados em um dessecador e resfriados até a temperatura ambiente. Em seguida, os cadinhos pesados e a partir da massa de sólidos e do volume da amostra, foi obtida a concentração de células em gsv/L. Em paralelo, alíquotas foram coletadas da mesma solução mãe e foram preparadas diferentes diluições (1:5; 1:7,5; 1:10; 1:12,5; 1:15 e 1:20), na qual para cada uma das soluções diluídas fez-se a leitura da absorbância em Espectrofotômetro de UV-Visível da marca Shimadzu modelo UVmini-1240 a um comprimento de onda de 660 nm, para *R. capsulatus* e *R. rubrum*. O mesmo procedimento foi realizado com solução mãe das culturas *R. capsulatus/R. rubrum* (1:1), *R. capsulatus/R. rubrum* (1:3) e *R. capsulatus/R. rubrum* (3:1). Para o branco foi usado água destilada. As curvas de calibração obtidas são apresentadas nas Equações 4.1 a 4.5 em que y representa a concentração em gsv/L e x a leitura da absorbância.

$$y = 0,2837 * x + 0,0040 \quad R^2 = 0,9993 \quad (R. capsulatus) \quad (4.1)$$

$$y = 0,3261 * x - 0,0016 \quad R^2 = 0,9991 \quad (R. rubrum) \quad (4.2)$$

$$y = 0,3671 * x - 0,0100 \quad R^2 = 0,9999 \quad (R. capsulatus/Rubrum 1:1) \quad (4.3)$$

$$y = 0,2464 * x + 0,0030 \quad R^2 = 0,9991 \quad (R. capsulatus/Rubrum 1:3) \quad (4.4)$$

$$y = 0,3530 * x + 0,0124 \quad R^2 = 0,9937 \quad (R. capsulatus/Rubrum 3:1) \quad (4.5)$$

4.5.2. – Quantificação de açúcar e metabólitos.

Para análise da composição do meio fermentado foi utilizado o equipamento HPLC (High Performance Liquid Chromatography), marca Shimadzu modelo LC-20A Prominence, coluna SUPELCOGEL C-610H. O ácido fosfórico (0,1 % v/v) foi utilizado como fase móvel, com fluxo de 0,5 mL/min, temperatura do forno 32°C e volume de injeção de 20 µL. O açúcar e os metabólitos analisados neste trabalho foram lactose e os ácidos lático, acético, propiônico e butírico. As áreas encontradas para cada tempo foram utilizadas nas curvas de calibração (previamente feitas) para determinação da concentração.

4.5.3 – Quantificação do hidrogênio

A concentração do hidrogênio produzido foi determinada pela injeção do biogás no Cromatógrafo Shimadzu modelo GC-2014, constituído por um detector de condutividade térmica, um forno e uma coluna capilar Carboxen 1010 com comprimento de 30 m e diâmetro interno de 0,53 mm. As temperaturas do injetor, da coluna e do detector durante as análises foram 230°C, 30°C e 230°C, respectivamente. O argônio foi utilizado como gás de arraste a 15 mL/min. O tempo de análise foi de 28 ± 2 minutos, sendo que o pico do hidrogênio foi formado entre 1 e 2 minutos. A área fornecida neste tempo foi utilizada na curva de calibração do equipamento para quantificação de H₂.

4.5.4. – Determinação do pH

As medidas de pH foram realizadas com a utilização do pHmetro digital PG 2.000 da marca Gehaka. O equipamento é composto por um eletrodo de vidro para medição de pH, o qual era previamente calibrado com solução tampão pH 4 e pH 7.

4.5.5 – Conversão e produtividade

O rendimento em mol de hidrogênio por mol de substrato consumido foi calculado segundo a Equação 4.6. O cálculo da produtividade, em relação ao hidrogênio produzido foi feita utilizando-se a Equação 4.7.

$$\text{Conversão} = \frac{\text{mol de H}_2 \text{ produzi do}}{\text{mol de substrato consumi do}} \quad (4.6)$$

$$\text{Produtividade} = \frac{\text{mol de H}_2 \text{ produzi do}}{\text{vol umereaci onal} * \text{tempo}} \quad (4.7)$$

CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Resultados dos ensaios realizados em escala reduzida: reatores de 50 mL.

Os ensaios realizados em escala reduzida foram realizados para avaliar a produção de hidrogênio por fotofermentação. Testou-se o uso dos microrganismos *R. capsulatus* e *R. rubrum* empregados como cultura pura e, em sequência, como sistema de co-cultura. Discutiu-se igualmente a influência do meio fermentescível na produção do biogás empregando em um primeiro momento o meio RCV modificado contendo lactose como fonte de carbono na concentração de 10 g/L e em seguida o meio RCV contendo ácido málico proveniente do próprio meio basal. A seguir são apresentados os resultados dos processos fotofermentativos (Itens 5.1.1 e 5.1.2), conduzidos em escala reduzida.

5.1.1 – Ensaios 1 e 2: sistemas de cultura pura.

Nos Ensaios 1 e 2 avaliou-se a produção de hidrogênio empregando sistemas de cultura pura dos microrganismos *R. capsulatus* e *R. rubrum* respectivamente. Os Ensaios tiveram duração de 180 h. Deve-se ressaltar que, para esses ensaios realizados, o meio fermentescível empregado foi o RCV modificado contendo a lactose como fonte de carbono na concentração de 10 g/L. A Figura 5.1 (a-f) apresenta os resultados correspondentes ao Ensaio 1 e a Figura 5.2 (a-f) apresenta os resultados correspondentes ao Ensaio 2.

A concentração de sólidos voláteis apresentada nas Figuras 5.1-a e 5.2-a corresponde a concentração da biomassa celular. Observa-se para o Ensaio 1 um aumento na biomassa atingindo $0,550 \pm 0,002$ gsv/L ao fim de 180 h. Analogamente para o Ensaio 2, a concentração de sólidos voláteis atingiu $0,550 \pm 0,010$ gsv/L. O crescimento observado em ambos os Ensaios 1 e 2 representou um aumento na concentração celular de 2,75 vezes em relação ao valor inicial. O crescimento celular dos Ensaios 1 e 2 atingiu a fase estacionária no tempo de 84 h. De acordo com [De Souza \(2019\)](#), o crescimento celular pode ser relacionado com o consumo de substrato, entretanto, observa-se nas Figuras 5.1-c e 5.2-c que mesmo após ao término dos experimentos, nem todo o substrato havia sido consumido.

Figura 5.1 - Perfil de (a) concentração sólidos voláteis; (b) Produtividade (●) /Conversão (■); (c) Concentração lactose; (d) pH; (e) Concentração ác. orgânicos: Ácido láctico (●); Ácido acético (★); Ácido propiônico (◆) para *R. capsulatus*

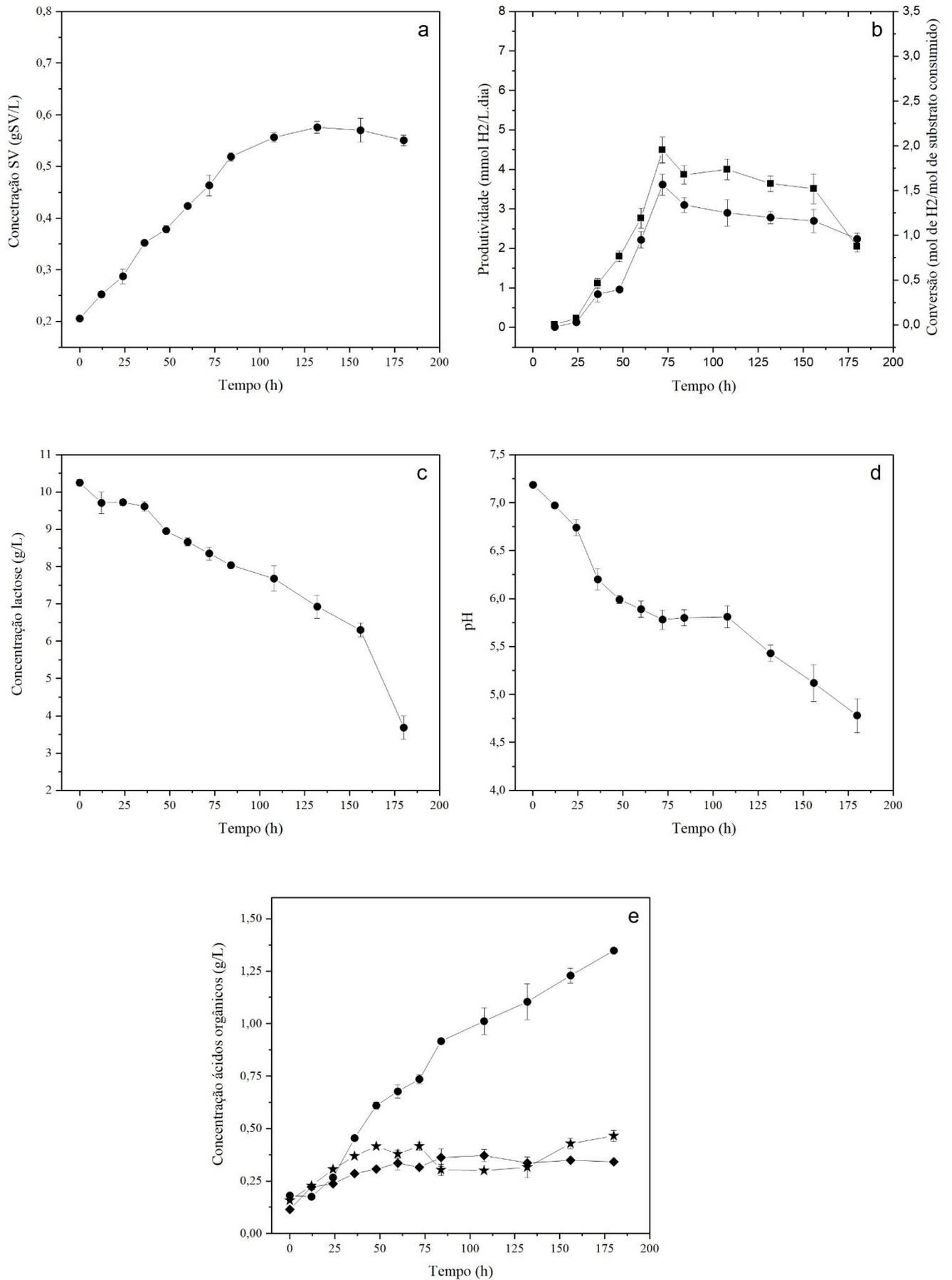
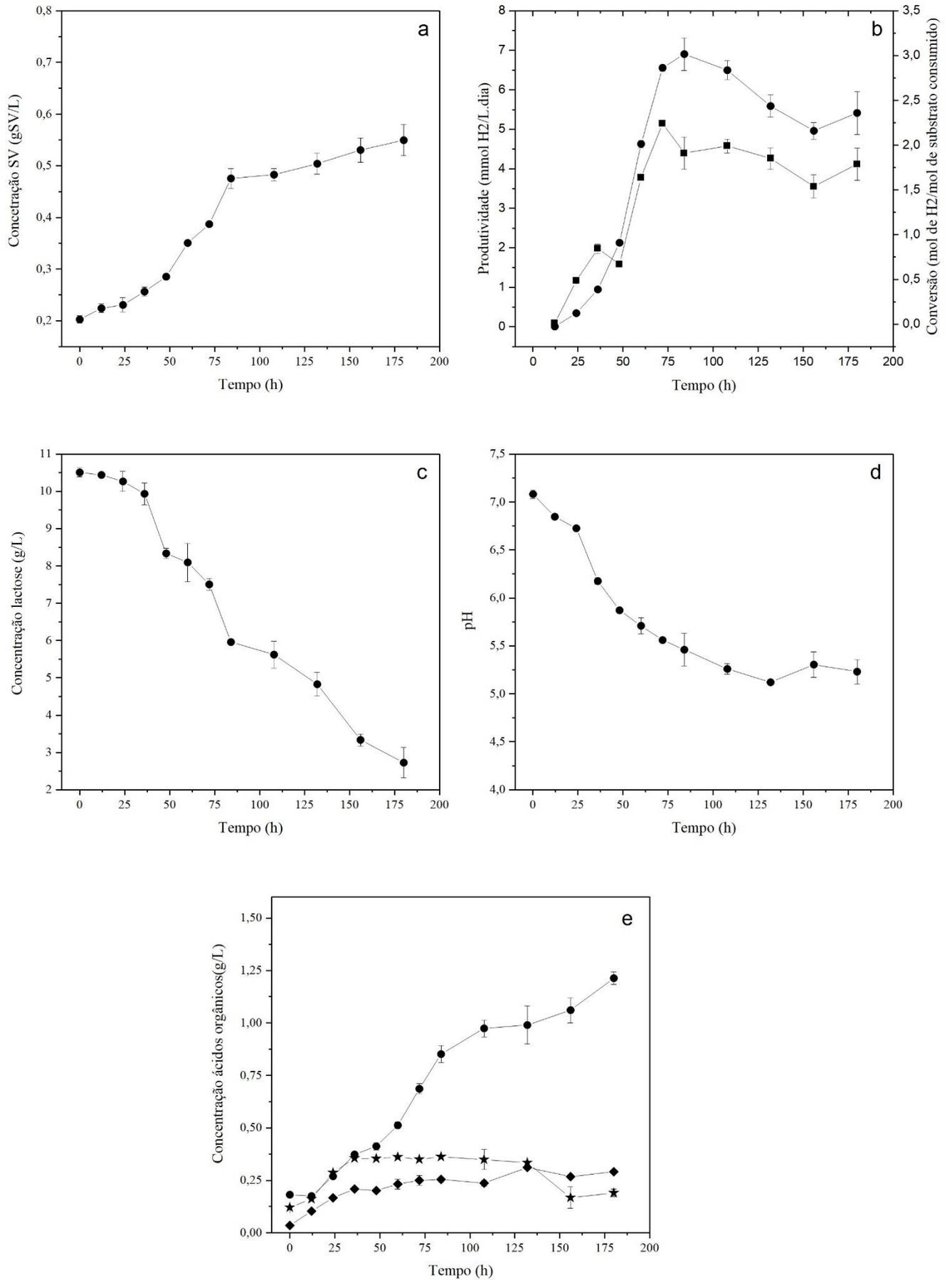


Figura 5.2 - Perfil de (a) concentração sólidos voláteis; (b) Produtividade (●) /Conversão (■); (c) Concentração lactose; (d) pH; (e) Concentração ác. orgânicos: Ácido lático (●); Ácido acético (★); Ácido propiônico (◆) para *R. rubrum*



A produção biológica de hidrogênio é geralmente associada com o crescimento celular (HAY, 2013). Akroum-Amrouche et al. (2011) estudaram a relação entre crescimento celular e produção biológica de hidrogênio empregando uma cultura de *Rhodobacter sphaeroides* em batelada. Os autores verificou que, embora hidrogênio seja produzido em ambas as fases de crescimento (exponencial e estacionária), existe uma queda na produção de hidrogênio com o início da fase estacionária. O valor da concentração celular final reportada pelos autores foi 7,33 vezes maior em relação à concentração inicial no ensaio que apresentou as condições mais favoráveis ao crescimento celular. Melnicki et al. (2008) empregaram o microrganismo *R. rubrum* em fotofermentação utilizando o ácido succínico como substrato para avaliar a diferença entre a produção de hidrogênio entre fases de crescimento exponencial e estacionária e, similarmente, os autores concluíram que, há uma queda na produção de hidrogênio associada ao fim do crescimento celular.

Conforme apresentado pela Figura 5.1-b, a produtividade de hidrogênio para o Ensaio 1 aumentou até o tempo de 72 horas obtendo o valor máximo de $3,617 \pm 0,260$ mmol H₂/L.dia e conversão máxima de $1,950 \pm 0,143$ mol H₂/mol de substrato consumido. Para o Ensaio 2, apresentado pela Figura 5.2-b, a produtividade aumentou até o tempo de 84 horas obtendo um valor máximo de $6,901 \pm 0,722$ mmol H₂/L.dia e conversão máxima de $2,424 \pm 0,029$ mol H₂/mol de substrato consumido. Pelos dados apresentados, conclui-se que a cepa *R. rubrum* apresentou valores maiores do que a cepa *R. capsulatus* para produtividade (1,90 vezes maior) e conversão (1,24 vezes maior).

Moreira (2016) estudou o uso da *R. capsulatus* em fotofermentação empregando uma combinação de ácido málico e lactose como substrato em reatores de 50 mL. O autor observou uma produtividade máxima de 2,60 mmol H₂/L para o microrganismo.

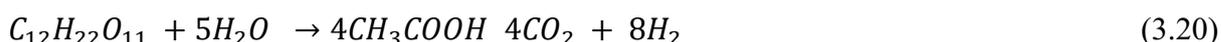
Silva (2015) avaliou em biorreatores de 50 mL, a produção de hidrogênio empregando a cepa *R. capsulatus* em sistema híbrido, em que o substrato utilizado foi o efluente resultante da fermentação escura do permeado de soro de leite em pó por consórcio microbiano. O autor observou uma produtividade máxima de 14,33 mmol H₂/L.dia. O uso do efluente da fermentação escura rico em ácidos orgânicos voláteis resultantes do metabolismo celular garantiu uma maior produtividade.

Zürrer E Bachofen (1979) estudaram o uso do ácido láctico como substrato em fotofermentação empregando uma cepa de *Rhodospirillum rubrum*. A produtividade máxima encontrada pelos autores foi 2,61 mmol H₂/L.dia.

Os estudos que empregam o uso da *R. rubrum* para a produção biológica de hidrogênio se concentram, em sua maioria, no uso deste microrganismo como catalisador na reação de mudança do vapor de água (*Water-gas shift reaction*) (NAJAFPOUR et al., 2004).

O perfil de pH conforme apontado pelas Figuras 5.1-d e 5.2-d diminuiu após 180 h até atingir $4,78 \pm 0,18$ para o Ensaio 1 e $5,23 \pm 0,13$ para o Ensaio 2. A queda de pH está relacionada com o aumento da concentração de ácidos orgânicos (Figuras 5.1-e e 5.2-e), formados durante o processo fermentativo (MOREIRA et al. 2017). Em relação à composição dos ácidos orgânicos, observa-se a formação de ácido láctico, acético e propiônico em ambos ensaios atingindo respectivamente $1,348 \pm 0,050$, $0,465 \pm 0,03$ e $0,341 \pm 0,03$ g/L para o Ensaio 1 e $1,213 \pm 0,003$, $0,190 \pm 0,02$ e $0,290 \pm 0,03$ g/L para o Ensaio 2. Isso pode justificar a menor produção de H₂ observada no Ensaio 1 já que observou-se uma maior concentração de ácidos orgânicos e, conseqüentemente, o perfil de pH apresentado se distancia mais do pH ótimo para a nitrogenase.

A produção de hidrogênio pode ser estimada pela da produção dos ácidos orgânicos. (MOREIRA, 2021). De acordo com Levin, Pitt e Love (2004), altos rendimentos de H₂ são associados a uma mistura de ácido acético e ácido butírico como produtos de fermentação enquanto o ácido láctico e ácido propiônico são associados a baixos rendimentos de H₂. As equações 3.20 e 3.21 indicam, respectivamente, a formação dos ácidos acético e butírico a partir da degradação da lactose. (DAVILA-VAZQUEZ et al., 2011).



A ausência do ácido butírico como produto de fermentação quando a lactose foi empregada como substrato foi observada também por Machado (2016). A autora avaliou a produção biológica de hidrogênio em batelada com biorreatores de 50 mL empregando o microrganismo *R. palustris* com diferentes fontes de carbono. Segundo o estudo, o teste que fez uso da glicose como substrato resultou em uma produtividade mais elevada (8,64 mmol H₂/L.dia) que o teste que fez uso da lactose proveniente do permeado de soro de leite em pó (0,41 mmol H₂/L.dia). Ao comparar os produtos de fermentação dos ensaios, a autora observou que, com a glicose, houve a formação do ácido butírico, ausente no teste que empregou a lactose concluindo, portanto, que esses fatores podem estar relacionados com a baixa produtividade observada para o teste com a lactose.

Uma das maiores dificuldades encontradas nos processos fotofermentativos é o acúmulo dos ácidos orgânicos produzidos pelo metabolismo celular que, em altas concentrações, podem ter caráter inibitório na produção de hidrogênio (KADPAN et al., 2009). Entretanto, os efeitos de inibição provocados por esses metabólitos ainda não foram amplamente estudados. Alguns estudos sugerem que é possível aclimatar as células em ambientes potencialmente tóxicos por uma adaptação gradual da biomassa celular em concentrações progressivamente mais elevadas dos ácidos orgânicos metabolizados (LEE, 2007).

5.1.2 – Ensaio 3, 4 e 5: sistemas de co-cultura.

Os Ensaio 3, 4 e 5 foram realizados para avaliar a produção de hidrogênio empregando sistemas de co-cultura dos microrganismos *R. capsulatus* e *R. rubrum*. As Figuras 5.3, 5.4 e 5.5 apresentam respectivamente os resultados correspondentes aos Ensaio 3 (co-cultura 1:1 *R. capsulatus*/*R. rubrum*), 4 (co-cultura 1:3) e 5 (co-cultura 3:1).

O sistema de co-cultura representado pelo Ensaio 3 apresentou maior aumento na biomassa celular atingindo $0,727 \pm 0,025$ gsv/L ao fim de 180 h representando um aumento na biomassa de 3,65 vezes em relação ao valor inicial enquanto que, para os Ensaio 4 e 5 os valores obtidos foram $0,370 \pm 0,009$ (aumento de 1,70 vezes em relação ao valor inicial) e $0,564 \pm 0,008$ gsv/L (aumento de 2,80 vezes em relação ao valor inicial) respectivamente. Em relação à produtividade o Ensaio 3 observou maior desempenho. O valor máximo atingido pelo sistema de co-cultura 1:1 foi $7,513 \pm 0,200$ mmol H₂/L.dia no tempo de 156 h superior aos valores encontrados nos sistemas de cultura pura indicando que pode existir uma sinergia positiva entre as espécies que favorece a produção de hidrogênio. Os ensaio 4 e 5 obtiveram produtividade máxima de respectivamente $6,766 \pm 0,302$ e $4,073 \pm 0,436$ mmol H₂/L.dia. O resultado de produtividade máxima apresentado pelo Ensaio 3 (co-cultura 1:1) foi maior em 1,11 vezes que o Ensaio 4 (co-cultura 1:3) e 1,84 vezes maior que o Ensaio 5 (co-cultura 3:1). A conversão atingida para o Ensaio 3 foi de $3,278 \pm 0,087$ mol de H₂/mol de substrato consumido ao passo que o valor atingido para o Ensaio 4 foi $3,073 \pm 0,341$ e para o Ensaio 5 foi de $2,345 \pm 0,251$ mol de H₂/mol de substrato consumido. O resultado de conversão máxima apresentado pelo Ensaio 3 (co-cultura 1:1) foi maior em 1,06 vezes que o Ensaio 4 (co-cultura 1:3) e 1,39 vezes maior que o Ensaio 5 (co-cultura 3:1).

Figura 5.3 - Perfil de (a) concentração sólidos voláteis; (b) Produtividade (●) /Conversão (■); (c) Concentração lactose; (d) pH; (e) Concentração ác. orgânicos: Ácido láctico (●); Ácido acético (★); Ácido propiônico (◆) para Co-cultura 1:1

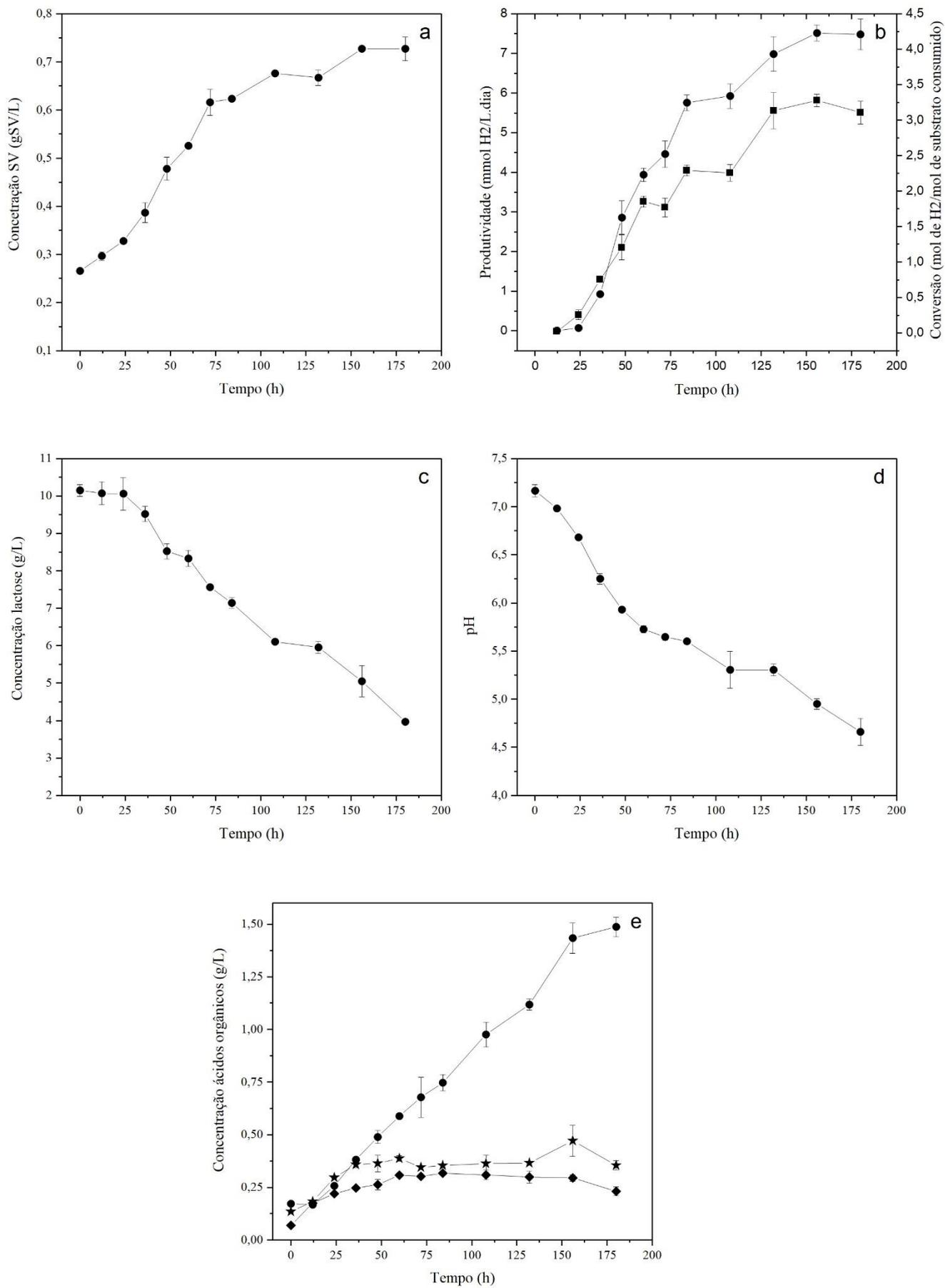


Figura 5.4 - Perfil de (a) concentração sólidos voláteis; (b) Produtividade (●) /Conversão (■); (c) Concentração lactose; (d) pH; (e) Concentração ác. orgânicos: Ácido lático (●); Ácido acético (★); Ácido propiônico (◆) para Co-cultura 1:3

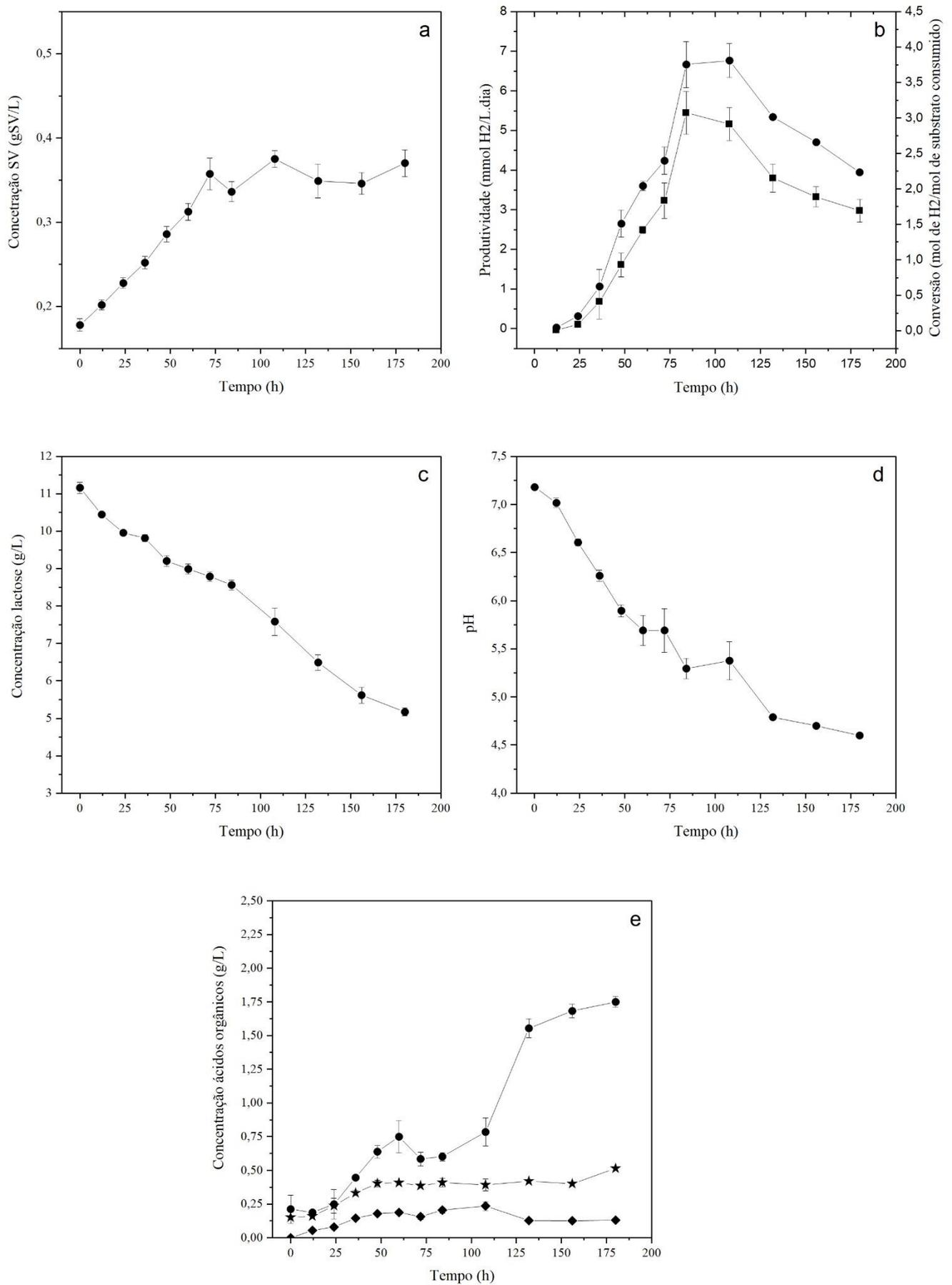
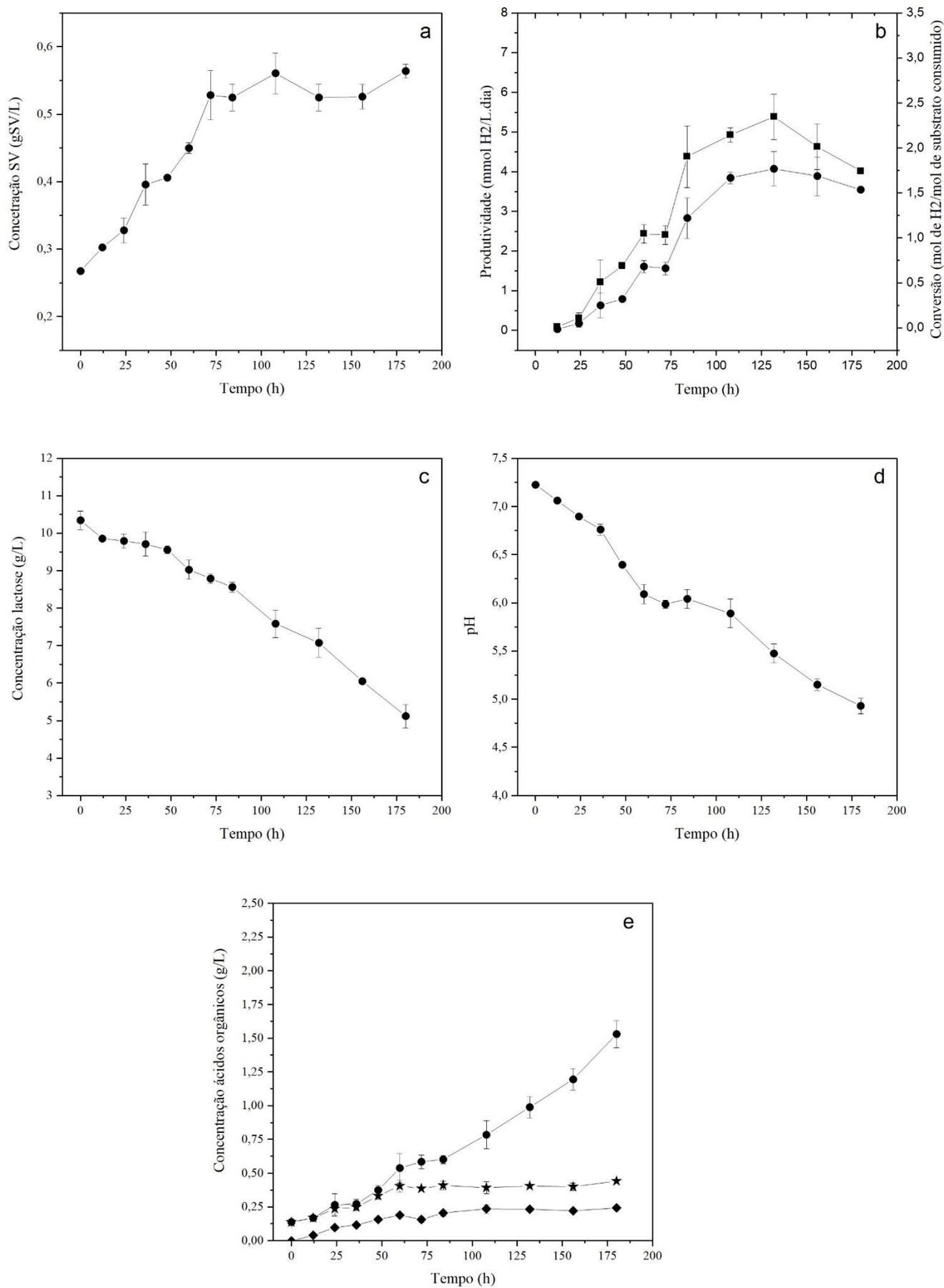


Figura 5.5 - Perfil de (a) concentração sólidos voláteis; (b) Produtividade (●) /Conversão (■); (c) Concentração lactose; (d) pH; (e) Concentração ác. orgânicos: Ácido láctico (●); Ácido acético (★); Ácido propiônico (◆) para Co-cultura 3:1



Os resultados apresentados nos itens 5.1.1 e 5.1.2 foram obtidos com o meio RCV modificado contendo lactose como fonte de carbono na concentração de 10 g/L. Para fins de comparação, a produtividade e conversão das cepas *R. capsulatus* e *R. rubrum* e do sistema de co-cultura (1:1) foram avaliadas pelos Ensaios 6, 7 e 8 empregando meio RCV contendo ácido málico proveniente do próprio meio basal como fonte de carbono. A Tabela 5.1 apresenta o comparativo entre os Ensaios 1, 2, 3, 4 e 5 (RCV modificado) e Ensaios 6, 7 e 8 (RCV) para os microrganismos *R. capsulatus* e *R. rubrum* e os sistemas de co-cultura. Os resultados indicam que o uso da lactose na concentração de 10 g/L garante maior produtividade (4,84 vezes maior para *R. capsulatus* e 39,43 vezes maior para *R. rubrum*) e maior conversão (32,5 vezes maior para *R. capsulatus* e 105,39 vezes maior para *R. rubrum*).

Tabela 5.1 – Consolidado das respostas produtividade (mmol H₂/L.dia) e conversão (mol H₂/mol de substrato consumido) em escala reduzida.

	Produtividade máx. (RCV modificado)	Produtividade máx. (RCV)	Conversão máxima (RCV modificado)	Conversão máxima (RCV)
<i>R. capsulatus</i>	3,617 ± 0,260	0,747 ± 0,159	1,950 ± 0,143	0,060 ± 0,013
<i>R. rubrum</i>	6,901 ± 0,722	0,175 ± 0,009	2,424 ± 0,029	0,023 ± 0,003
Co-cultura (1:1)	7,513 ± 0,200	0,796 ± 0,049	3,278 ± 0,087	0,059 ± 0,008
Co-cultura (1:3)	6,766 ± 0,302	-	3,073 ± 0,341	-
Co-cultura (3:1)	4,073 ± 0,436	-	2,345 ± 0,251	-

Para o sistema de co-cultura (1:1), os resultados indicam que o uso da lactose na concentração de 10 g/L garante maior produtividade (9,43 vezes maior) e maior conversão (55,56 vezes maior) quando comparado com as respostas basais (RCV).

O uso de sistemas de co-cultura na produção de hidrogênio biológico é amplamente discutido na literatura. De acordo com Pachapur et al. (2015), co-culturas de bactérias podem apresentar maior resistência às flutuações ambientais e estabilidade na taxa de produção de

hidrogênio. Vários autores fizeram uso dessa sinergia empregando bactérias fermentativas e fotofermentativas no mesmo sistema.

Kondo et. al (2002) estudaram a combinação de duas bactérias fotossintetizantes do filo PNS que possuíam características diferentes no mesmo sistema de fotofermentação. Os autores empregaram a cepa *Rhodobacter sphaeroides* combinada com uma mutação dessa mesma espécie com o pigmento reduzido. Os autores destacaram que, pelo fato de as espécies possuírem diferentes comportamentos na presença de luz, a sinergia entre elas aumentou em 33% a produtividade de hidrogênio quando comparada ao uso da monocultura.

Os Ensaio 3, 4 e 5 apresentaram o ácido lático como principal metabólito produzido pela fermentação conforme apresentado pelas Figuras 5.3-e, 5.4-e e 5.5-e. Os valores obtidos para o referido ácido foram respectivamente $1,487 \pm 0,047$; $1,750 \pm 0,045$ e $1,534 \pm 0,102$ g/L para os Ensaio 3, 4 e 5 respectivamente. Observa-se também a presença dos ácidos acético e propiônico. A presença dos ácidos orgânicos justifica a queda no pH observada.

Com base nos resultados apresentados, conclui-se que a co-cultura 1:1 apresentou o melhor resultado para a produtividade de biohidrogênio em escala reduzida (2,07 vezes maior comparado ao inóculo puro de *R. capsulatus* e 1,08 vezes maior comparado ao inóculo puro de *R. rubrum*) em meio RCV modificado. Em vista disso, no Ensaio 9, realizado em escala ampliada, buscou-se verificar o comportamento do referido inóculo em reator de tanque agitado com funcionamento em modo batelada sequencial.

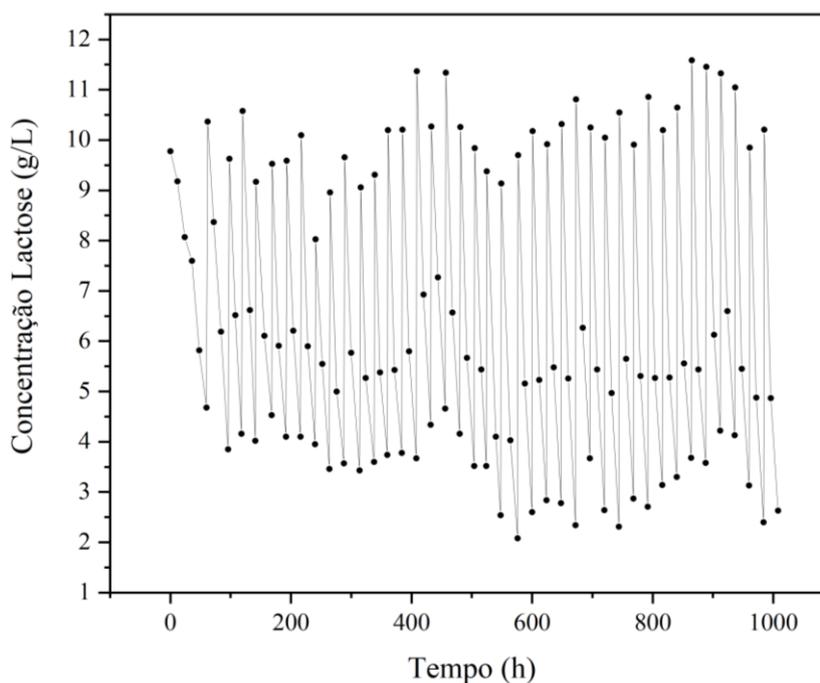
5.2 – Resultado dos ensaios realizados em escala ampliada: reator de 1,5 L.

5.2.1 – Ensaio 9: Inóculo co-cultura 1:1 com revitalização do meio reacional.

A partir dos testes realizados em escala reduzida foi comprovado que o uso do sistema de co-cultura formado pelas espécies *R. capsulatus* e *R. rubrum* na proporção 1:1 possui maior produtividade para a formação de hidrogênio em relação aos cultivos com as culturas puras e em co-cultura com concentrações de inóculos diferentes para cada bactéria estudada. Desse modo, buscou-se verificar, em um primeiro momento, o desempenho da co-cultura 1:1 em escala ampliada. O Ensaio 9 foi realizado em reator de tanque agitado operado em modo de batelada sequencial com revitalização do meio reacional. A literatura indica que o modo de operação batelada sequencial pode ajudar a manter a produção de hidrogênio por mais tempo (ROMÃO et al. 2014). Esse aumento no tempo da fermentação está provavelmente associado à retirada de metabólitos produzidos ao longo da fermentação no meio que tornam o meio

tóxico ao microrganismo e afetam negativamente a produção de hidrogênio. O critério adotado para realização dos “cortes” foi baseado na concentração de substrato de forma que a mesma nunca fosse inferior a 2,0 g/L. A Figura 5.6 apresenta a concentração de lactose ao longo do tempo de funcionamento do reator total de 1008 h (42 dias):

Figura 5.6 - Perfil de concentração de substrato Ensaio 9



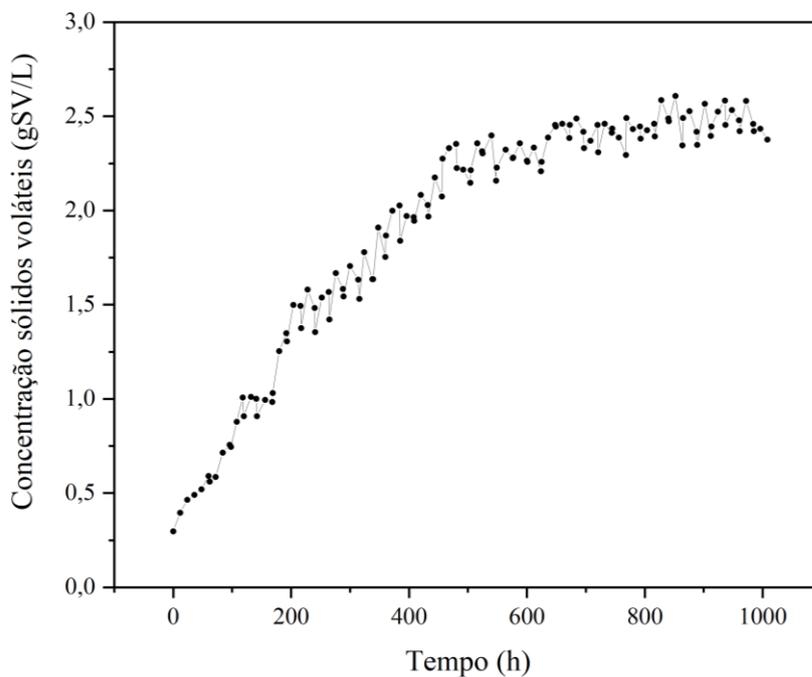
De acordo com os resultados apresentados pela Figura 5.6, que indica o perfil da concentração de substrato em relação ao tempo, nota-se que o açúcar foi consumido mais lentamente no início do processo, sendo que a primeira revitalização/corte foi realizada no tempo de 62 horas. A partir do tempo de 96 horas o meio foi revitalizado a cada 24 horas até o fim da fermentação no tempo de 1008 horas.

A literatura indica que em se tratando de fotofermentações realizadas com cepas de bactérias PNS, é possível aumentar o desempenho da fotofermentação trabalhando em faixas específicas de concentração de substrato. [Kadpan et al. \(2009\)](#) observaram que em um sistema em que a cepa pura de *Rhodobacter sphaeroides* foi usada em uma fermentação com glicose, concentrações de substrato maiores que 8,5 g/L resultaram em uma inibição da produtividade em razão da concentração elevada de ácidos orgânicos resultados do metabolismo celular. Os autores não especificam quais foram os ácidos orgânicos encontrados ou a concentração dos ácidos que inibiu a produtividade de hidrogênio. Concentrações menores que 3,0 g/L também não eram favoráveis por serem limitadas em substrato. No estudo de [Keskin et al. \(2012\)](#) chegou-se a uma conclusão similar e observou-se que, concentrações elevadas de substrato

(glicose proveniente do melaço da beterraba) têm efeito negativo na produtividade de biohidrogênio. Os autores creem que concentrações elevadas de substrato se traduzem em acidificação excessiva do meio.

Na Figura 5.7 observa-se a concentração de sólidos voláteis indicando o crescimento celular até o tempo de 1008 horas atingindo uma concentração de 2,58 gsv/L. O crescimento celular observado representou um aumento de aproximadamente 10 vezes na biomassa celular em comparação com a concentração inicial. Observa-se pouca variação na concentração após o tempo de 600 horas, indicando o início da fase estacionária do crescimento celular.

Figura 5.7 - Perfil de concentração sólidos voláteis Ensaio 9



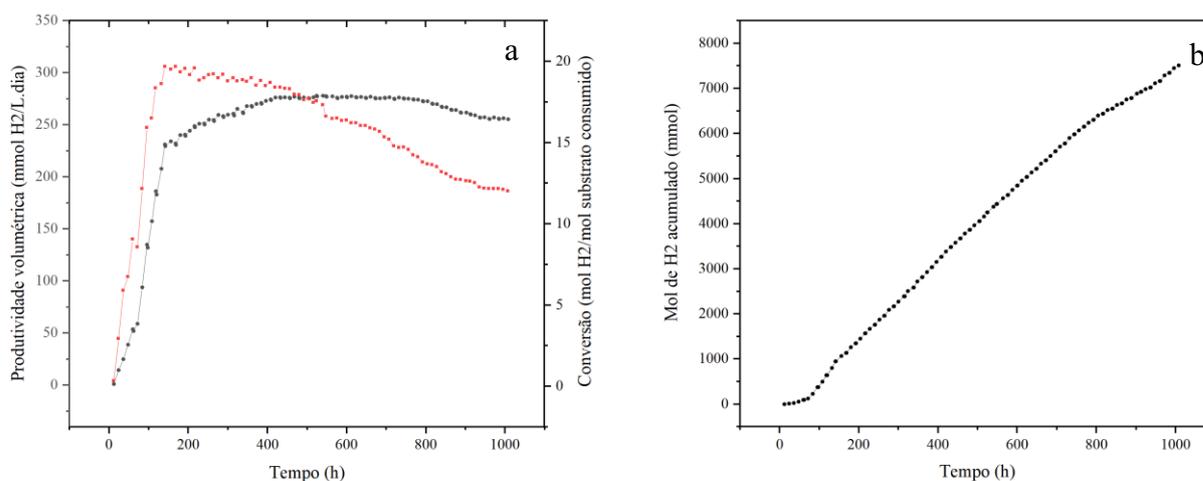
Para Machado (2016), o crescimento celular de uma cultura bacteriana observado em um reator STR de 1,5 L que empregou a lactose como substrato e um sistema de co-cultura das cepas *R. capsulatus* e *R. palustris* teve um aumento de 8 vezes em comparação com a concentração inicial. Entretanto, a autora observou oscilações no valor da concentração celular ao longo do tempo de funcionamento do reator.

No estudo de Ren et al. (2008) avaliou-se o efeito da concentração de substrato na produção de biohidrogênio por *Rhodospseudomonas faecalis* empregando duas fontes de carbono: ácido acético e ácido butírico. Os autores observaram que ambos os substratos foram capazes de atingir um valor próximo na concentração celular final (aumento de 15 vezes em relação ao valor inicial). Entretanto, os autores destacaram que o crescimento celular se

tornou mais lento com aumento da concentração de substrato sendo os valores ótimos de 15 g/L para o ácido acético e 1,1 g/L para o ácido butírico.

Os dados referentes à produção de hidrogênio são apresentados nas Figuras 5.8-a e 5.8-b que compreendem os perfis de produtividade, conversão e quantidade de mols de hidrogênio acumulado. Nota-se que após o período de 140 h a produtividade apresentou uma diminuição na taxa de crescimento e seguiu estável até o fim do procedimento, obtendo um valor máximo de 278,05 mmol H₂/L.dia. A conversão atingiu o valor máximo de 19,67 mol de H₂/mol de substrato consumido no período de 140 h seguida de queda até atingir o valor de 12,01 mol de H₂/mol de substrato consumido ao final do experimento. O perfil apresentado pela Figura 5.8 aponta a tendência de crescimento da quantidade de mol de hidrogênio acumulado quase exclusivamente linear indicando um sistema altamente produtivo. Ao fim de 1008 h, foi obtido um total de 31 L de hidrogênio

Figura 5.8 - Perfis de Produtividade (•) /Conversão (•) (a) e Mol de H₂ acumulado (b) – Ensaio 9



Os resultados obtidos para o sistema de co-cultura 1:1 podem indicar a possibilidade de um sistema de produção biológica de hidrogênio de alta produtividade com um funcionamento estável e de longo prazo. O estudo de [Eroglu et al. \(2008\)](#) verificou a produção de H₂ por fotofermentação em um reator de 8 L empregando a espécie *R. sphaeroides* através do uso de vários substratos (ácido málico, ácido láctico, ácido acético). O ácido málico forneceu maior produtividade com 9,85 mmol H₂/L.dia. [Boran et al. \(2010\)](#) investigaram a produção de hidrogênio com o uso de *R. capsulatus* em um reator tubular de 80 L de volume útil e área iluminada de 2 m². A cultura empregada pelos autores foi iluminada artificialmente

durante a fase de crescimento exponencial e posteriormente com irradiação natural. Ao fim de 32 dias, os autores obtiveram um total de 80 L de hidrogênio com uma produtividade média de 17,76 mmol H₂/L.dia e máxima de 72 mmol H₂/L.dia.

O trabalho de [Rao et al. \(2021\)](#) estudou a produção de biohidrogênio através de um processo híbrido. O efluente da fermentação escura do permeado de soro de queijo foi empregado em um processo fotofermentativo com a espécie *Rhodobacter sphaeroides* em um reator cilíndrico de 2 L com volume útil de 1,5 L. Os autores realizaram experimentos em diferentes condições de concentração de substrato, temperatura e intensidade luminosa. A máxima produtividade de hidrogênio encontrada pelos autores foi de 40,49 mmol H₂/L.dia nas condições de concentração de substrato de 12 g/L, temperatura de 31 °C e intensidade luminosa de 10.000 lux.

[Machado et al. \(2018\)](#) empregaram uma co-cultura das espécies *R. capsulatus* e *R. palustris* em um reator de tanque agitado de 1,5 L para verificar a produção de hidrogênio por sistema híbrido. O efluente de uma fermentação escura realizado previamente foi suplementado com lactose e empregado em uma fotofermentação. Os autores obtiveram ao fim de 448h um volume total de 10,35 L de hidrogênio e obteve uma produtividade máxima de 172,07 mmol H₂/L.dia.

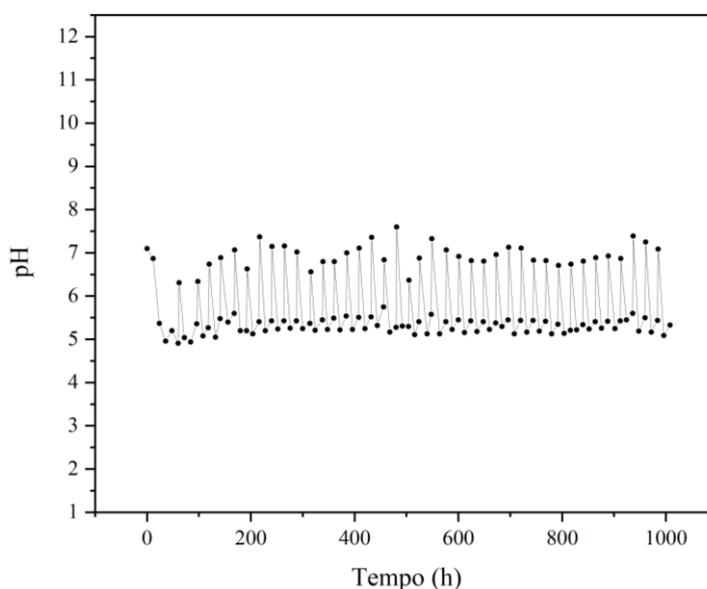
O máximo rendimento teórico que poderia ser obtido no processo de fotofermentação se toda lactose fosse convertida em H₂ e CO₂, apresentado pela Equação 5.1 (Adaptada de [LOSS, 2009](#)) aponta que 24 mols de hidrogênio são produzidos para cada mol de lactose consumido. O valor máximo observado pelo Ensaio 9 foi 19,67 mol de H₂/mol de lactose consumido o que representa 82% do valor teórico. A conversão calculada considera somente a lactose como substrato. Tal fato pode explicar os altos valores obtidos pelo sistema uma vez que os ácidos orgânicos produzidos pelo metabolismo das espécies podem estar sendo consumidos ao mesmo passo que são produzidos.



[Collet et al. \(2004\)](#) empregaram a espécie *Clostridium thermolacticum* em um biorreator contínuo para avaliar a produção de hidrogênio em procedimento fermentativo com o uso da lactose como substrato na concentração inicial de 10 g/L. Os autores testaram diferentes taxas de diluição e pH para maximizar a conversão e obtiveram um valor de 3 mol H₂/mol de lactose, valor bem inferior ao teórico.

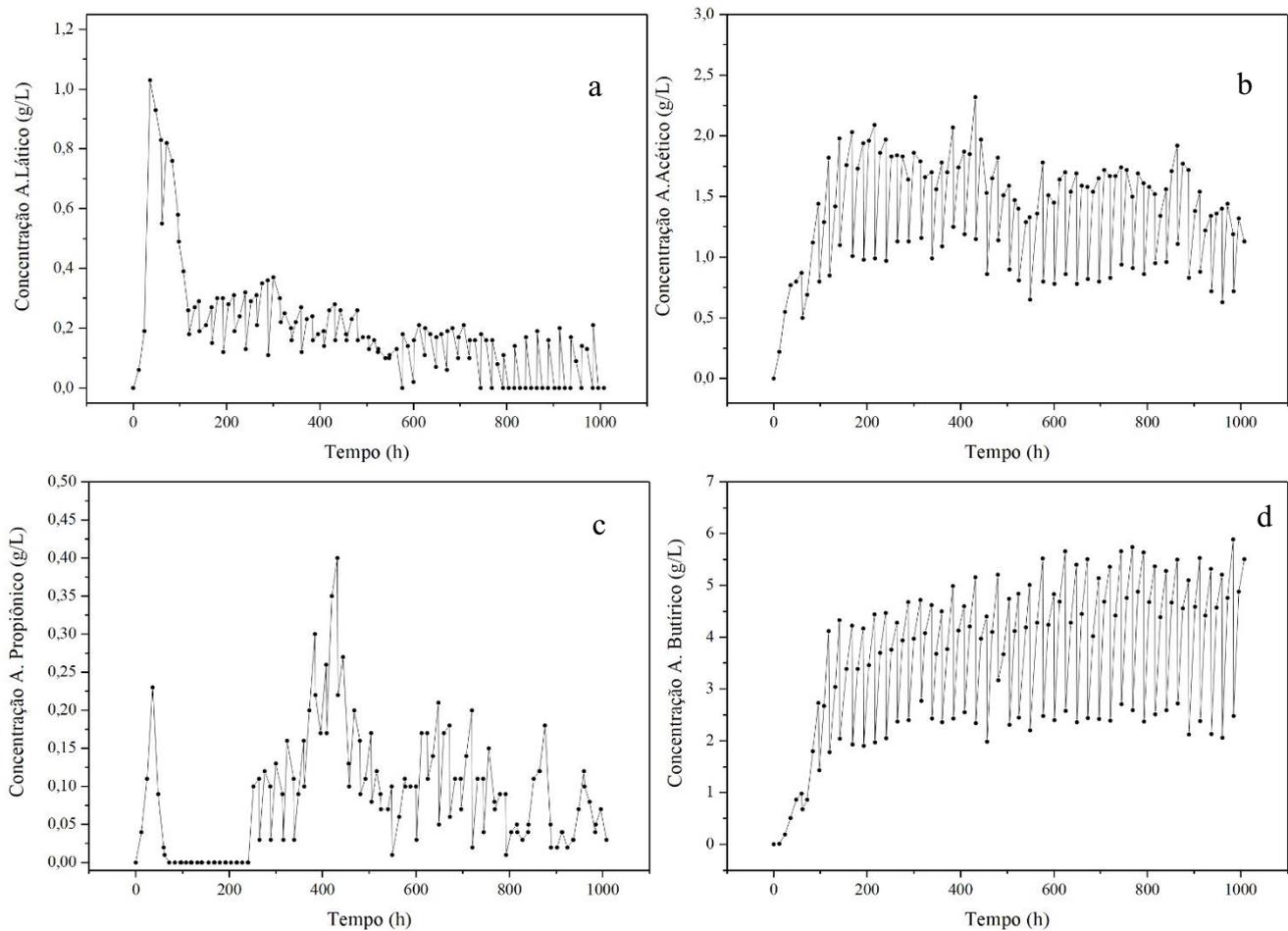
O perfil de pH é apresentado pela Figura 5.9 e a Figura 5.10 apresenta os perfis de concentração dos ácidos orgânicos formados ao decorrer da fermentação. Os principais metabólitos encontrados foram os ácidos láctico, acético, propiônico e butírico. Nota-se que a fermentação referente ao Ensaio 9 foi do tipo butírica uma vez que se trata do metabólito encontrado em maior concentração. O referido ácido se manteve na faixa entre 2 – 5 g/L ao longo do experimento. Seguido do ácido butírico, o ácido acético também foi detectado em maiores concentrações situando na faixa entre 1 – 2 g/L. A presença em maiores quantidades dos referidos ácidos pode justificar a alta produtividade do sistema já que altos rendimentos de H₂ são associados aos ácidos acéticos e ácidos butírico como produtos de fermentação (LEVIN; PITT; LOVE, 2004). O ácido láctico e ácido propiônico foram detectados em menores faixas concentrações durante o procedimento (0 – 0,2 g/L para o ácido láctico e 0 – 0,4 g/L para o ácido propiônico). No estudo desenvolvido por Chen et al. (2005), também se observou a predominância de ácido butírico no meio fermentativo. Calli et al. (2008) estudaram a influência do pH na produção de hidrogênio utilizando lactose e xilose como substrato em batelada sequencial e observaram que a rota metabólica era alterada em função do pH do sistema.

Figura 5.9 - Perfil de pH - Ensaio 9



Observa-se que a concentração do ácido láctico teve pico máximo de 1,03 g/L no período de 36 h, entretanto permaneceu baixa entre a faixa de concentração entre 0 – 0,2 g/L até o fim da fermentação o que sugere que houve consumo desse ácido pelo sistema justificando a alta conversão encontrada nas primeiras horas de funcionamento do reator.

Figura 5.10 - Perfis de concentração de ácidos orgânicos produzidos Ensaio 9: (a) ácido láctico; (b) ácido acético; (c) ácido propiônico; (d) ácido butírico.



Segundo o trabalho de [Silva et al. \(2016\)](#), há um sinergismo positivo entre os ácidos orgânicos produzidos como resultado do metabolismo celular e a lactose como substrato que influencia positivamente a produção de hidrogênio. Os autores avaliaram a produção de hidrogênio por fotofermentação pela espécie *R. capsulatus* sob três condições distintas. Em um primeiro momento, foi utilizado o meio efluente de uma fermentação escura rica em ácidos orgânicos suplementado com lactose. O meio efluente tinha como principal metabólito o ácido láctico e lactose na concentração de 10 g/L. Os autores obtiveram uma produtividade máxima de 98,23 mmol H₂/L.dia (em 26 h de processo) e não observaram uma variação na concentração do ácido láctico. Para verificar o efeito da presença dos ácidos orgânicos na produção de hidrogênio, os autores realizaram dois ensaios adicionais: um primeiro empregando somente o meio efluente (ácidos orgânicos sem suplementação de lactose) como substrato e um segundo teste empregando somente lactose (sem ácidos orgânicos) como fonte de carbono. Os autores observaram que em ambos os testes a produtividade máxima foi consideravelmente menor quando comparada ao ensaio que combinou o efluente rico em

ácidos orgânicos e lactose (0,18 mmol H₂/L.dia para o primeiro em 14 h de processo e 5,05 mmol H₂/L.dia para o segundo em 41 h de processo).

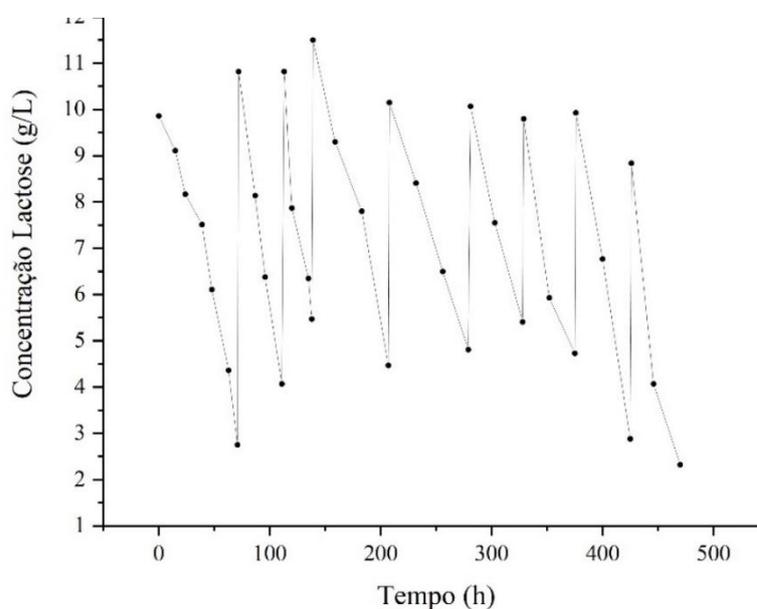
Romão et al. (2014) testaram o uso da batelada sequencial em uma fermentação escura utilizando um consórcio microbiano em processo batelada. Na tentativa de prolongar o tempo da fermentação, os autores realizaram cortes de 66% do volume reacional sem reciclo de células a cada 24 h nas primeiras 48 h e, após esse período, a cada 12 h. Foi constatado pelos autores que foi possível manter a produção de H₂ por um período maior com até 84 h de fermentação sendo que no processo batelada sem o uso do sistema de corte, a produção caiu após 50 h de processo.

Para verificar o efeito da presença dos ácidos orgânicos acumulados no meio reacional o Ensaio 10 foi realizado com as mesmas condições do Ensaio 9 exceto pela revitalização do meio. Para tal o critério adotado foi baseado na concentração de substrato de forma que ela nunca fosse inferior a 2,0 g/L.

5.2.2 – Ensaio 10: Inóculo co-cultura 1:1 sem revitalização do meio reacional.

O Ensaio 10 foi conduzido em reator de tanque agitado com inóculo de co-cultura das espécies *R. capsulatus* e *R. rubrum* na proporção 1:1. O critério adotado para suplementar o meio foi baseado na concentração de substrato de forma que, analogamente ao que foi realizado no Ensaio 9, a mesma nunca fosse inferior a 2 g/L. O reator foi alimentado com lactose proveniente do permeado de soro de leite em pó de forma que a concentração se mantivesse em torno de 10 g/L. A Figura 5.11 apresenta a concentração de lactose ao longo do tempo de funcionamento do reator total de 480 h (20 dias):

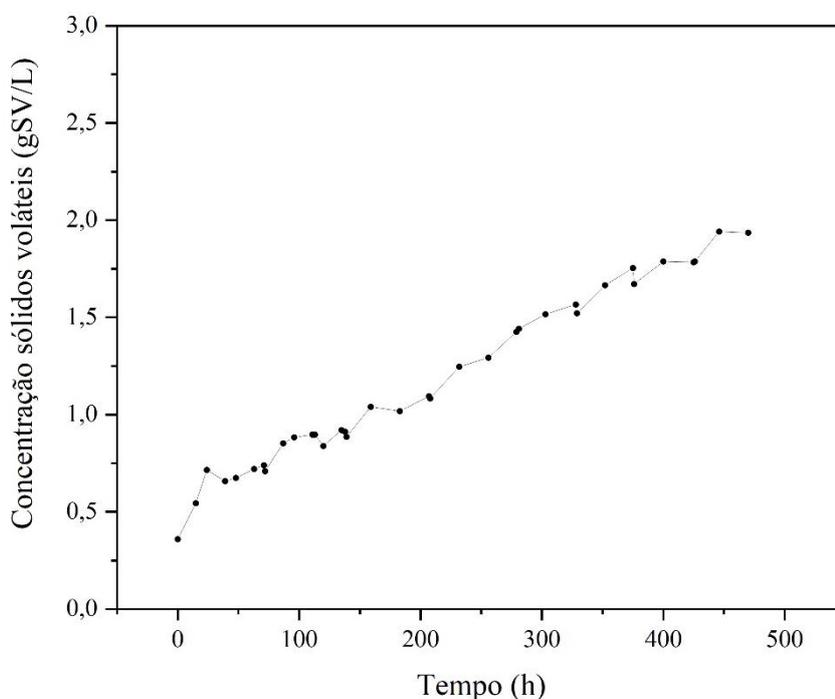
Figura 5.11 - Perfil de concentração de substrato Ensaio 10



Nota-se em relação ao consumo de lactose observado no Ensaio 10, a primeira suplementação em lactose foi realizada no tempo de 62 horas, mesmo tempo observado no Ensaio 9. Entretanto, as suplementações foram menos frequentes e mais espaçadas no tempo indicando que o consumo do açúcar foi menor comparado ao Ensaio 9.

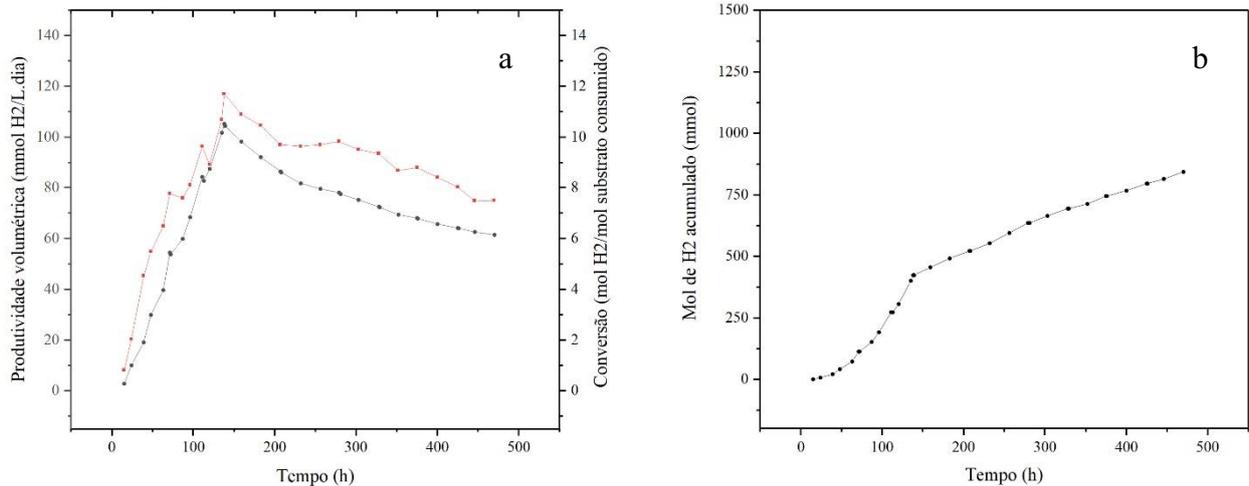
Na Figura 5.12 observa-se a concentração de sólidos voláteis até o tempo de 480 horas atingindo uma concentração de 1,93 g_{SV}/L. O crescimento celular observado representou um aumento de aproximadamente 5,5 vezes na biomassa celular em comparação com a concentração inicial. Observa-se que o crescimento celular observado no Ensaio 10 foi menor comparado ao que foi observado no Ensaio 9. Não foi possível observar se o fim da fase exponencial de crescimento foi atingido devido ao tempo de fermentação reduzido do Ensaio 10.

Figura 5.12 - Perfil de concentração sólidos voláteis Ensaio 10



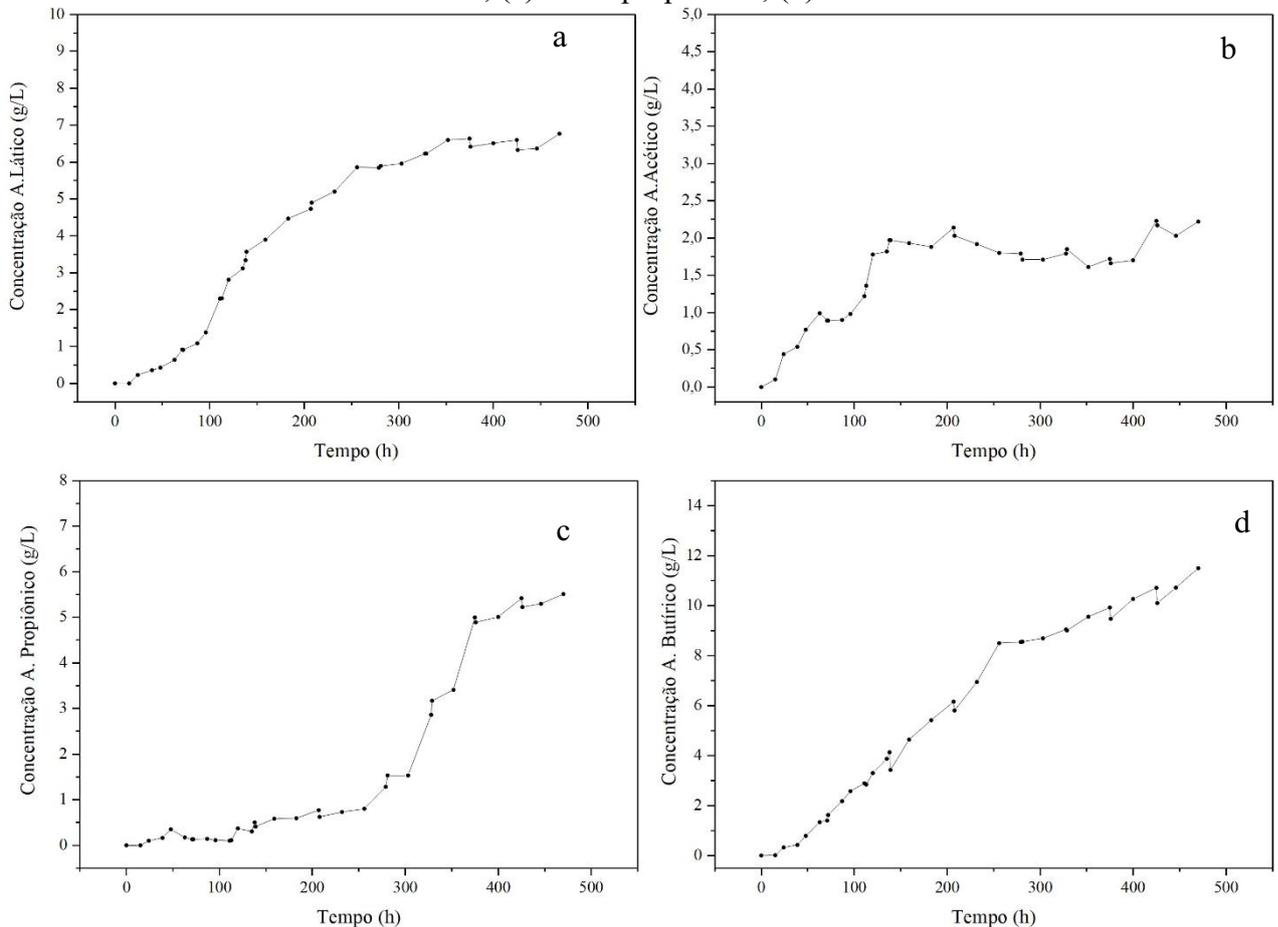
Os dados referentes à produção de hidrogênio são apresentados na Figura 5.13-a e 5.13-b que compreende os perfis de produtividade, conversão e quantidade de mols de hidrogênio acumulado. Observa-se que o pico de produtividade observado no Ensaio 10 foi no tempo de 140 h no qual obteve-se 104,47 mmol H₂/L.dia. A partir do tempo de 140 h, a produtividade apresentou tendência de queda até o fim do experimento atingindo o valor de 61,53 mmol H₂/L.dia valor este que representa uma queda de 41,1% em relação à produtividade máxima. A tendência observada no perfil de conversão aponta um valor máximo de 11,71 mol H₂/mol de substrato consumido representando 49,0% do valor teórico seguido de queda até 480 h.

Figura 5.13 - Perfis de Produtividade (●) /Conversão (●) (a) e Mol de H₂ acumulado (b) – Ensaio 10



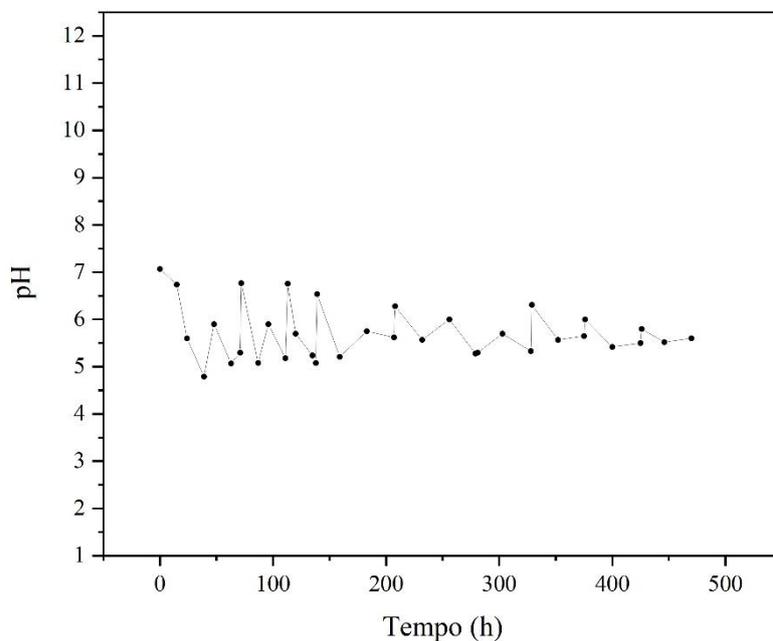
O perfil apresentado pela Figura 5.13-b aponta uma tendência de crescimento elevada da quantidade de mol de hidrogênio acumulado até o tempo de 140 h. Após o tempo de 140 h, observa-se uma mudança na taxa de crescimento. A Figura 5.14 apresenta os perfis de concentração dos ácidos orgânicos formados ao decorrer da fermentação. Os principais metabólitos encontrados foram os ácidos lático, acético, propiônico e butírico. A Figura 5.15 apresenta o perfil de pH do Ensaio 10.

Figura 5.14 - Perfis de concentração de ácidos orgânicos produzidos Ensaio 10: (a) ácido lático; (b) ácido acético; (c) ácido propiônico; (d) ácido butírico



Analogamente ao que foi observado no Ensaio 9, a fermentação do Ensaio 10 foi do tipo butírica já que foi o metabólito encontrado em maior concentração. Constata-se que a concentração do ácido butírico atingiu ao fim do tempo de 480 h o valor de 11,50 g/L. A concentração final de ácido láctico atingiu o valor de 6,77 g/L significativamente maior ao que foi observado no Ensaio 9. A partir do tempo de 300 h, observa-se um aumento considerável na concentração do ácido propiônico atingindo 5,51 g/L. O ácido acético foi detectado em concentração aproximadamente na faixa de 2 g/L

Figura 5.15 - Perfil de pH - Ensaio 10



Conforme evidenciado por [Kelsin et al. \(2012\)](#) e [Kapdan et al. \(2009\)](#), constata-se que há uma relação negativa entre altas concentrações de ácidos orgânicos e produtividade de hidrogênio comparando os Ensaio 9 e 10. O estudo de [Van Ginkel et al. \(2005\)](#) observou o efeito dos ácidos acético e butírico não dissociados na produção de hidrogênio biológico. Para tal, os autores testaram duas configurações diferentes: em um primeiro momento, foi adicionado via uma alimentação externa uma corrente de ácidos acético e butírico. Posteriormente, foi testado um sistema onde aumentava-se consideravelmente a concentração de substrato para aumentar a concentração dos ácidos produzidos como subprodutos. Em ambas as configurações se observou uma diminuição expressiva na produção de hidrogênio biológico.

[Bundhoo et al. \(2016\)](#) propuseram um mecanismo da inibição da produção de biohidrogênio em razão da elevada concentração de ácidos orgânicos. Segundo os autores, os

ácidos podem ter efeitos inibitórios tanto em sua forma dissociada como na forma não dissociada. Os ácidos dissociados aumentam a força iônica do meio e, em consequência disso, observa-se uma diminuição na produção de hidrogênio pela lise celular das bactérias. Quanto aos ácidos não dissociados, eles são capazes de penetrar a parede da membrana celular onde sofrem a dissociação devido ao maior pH intracelular resultando em um aumento nos íons H^+ . O fluxo de prótons no citoplasma da célula cria um desequilíbrio de pH que pode afetar a atividade metabólica das células ao mesmo tempo que é capaz de causar a morte celular e, conseqüentemente, diminuir a produção do biohidrogênio. Os autores ainda destacam que para manter um gradiente de pH constante, os prótons são forçados para fora do citoplasma da célula por meio de um sistema acionado por ATP. O consumo de ATP resulta em um menor nível de energia disponível para o crescimento celular que pode resultar na diminuição do crescimento bacteriano.

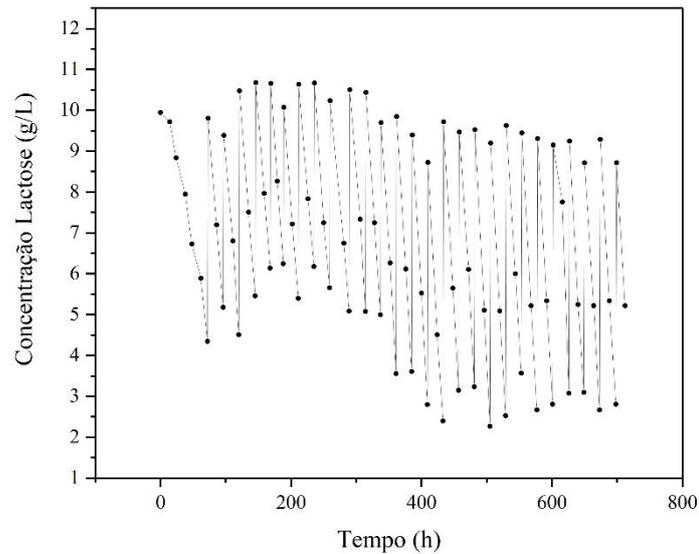
As observações discutidas por [Bundhoo et al. \(2016\)](#) contradizem o estudo de [Silva et al. \(2016\)](#) que propõe que na realidade, há um sinergismo positivo entre a produção de hidrogênio biológico e a presença de ácidos orgânicos, conforme discutido no item 5.2.1. Observa-se que o caráter inibitório da presença de ácidos orgânicos é variável entre os trabalhos disponíveis na literatura. Isso pode ser atribuído a diferentes fontes de inóculo utilizadas, diferentes substratos empregados em diferentes concentrações e diferentes condições operacionais, como temperatura e pH.

5.2.3 – Ensaio 11: Inóculo de *R. rubrum* com revitalização do meio reacional.

O Ensaio 11 foi realizado com o inóculo de cultura pura de *R. rubrum* nas mesmas condições definidas para o Ensaio 9 em reator de tanque agitado operado em modo de batelada sequencial com revitalização do meio reacional. A Figura 5.16 apresenta o perfil de concentração de substrato ao longo de 720 h (30 dias).

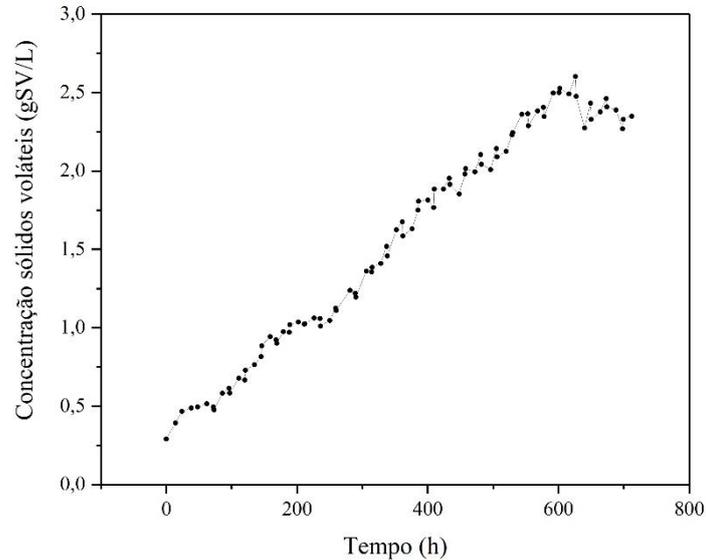
A primeira revitalização/corte referente ao Ensaio 11 foi realizada no tempo de 72 h. A partir da marca de 96 h o meio foi revitalizado a cada 24 h. Analogamente ao que foi observado nos Ensaio 9 e 10, o consumo de açúcar para o inóculo puro de *R. rubrum* ocorreu mais lentamente no início do processo conforme apresentado pela Figura 5.16. A concentração de sólidos voláteis que indica o crescimento celular é apresentada na Figura 5.17 atingindo ao fim de 720 h o valor de 2,35 gsv/L. crescimento celular observado representou um aumento de aproximadamente 8,1 vezes na biomassa celular em comparação com a concentração inicial.

Figura 5.16 - Perfil de concentração de substrato Ensaio 11



Apesar do elevado tempo de fermentação, não é possível afirmar se o crescimento bacteriano apresentado pelo inóculo de cultura pura de *R. rubrum* atingiu o fim da fase estacionária de crescimento.

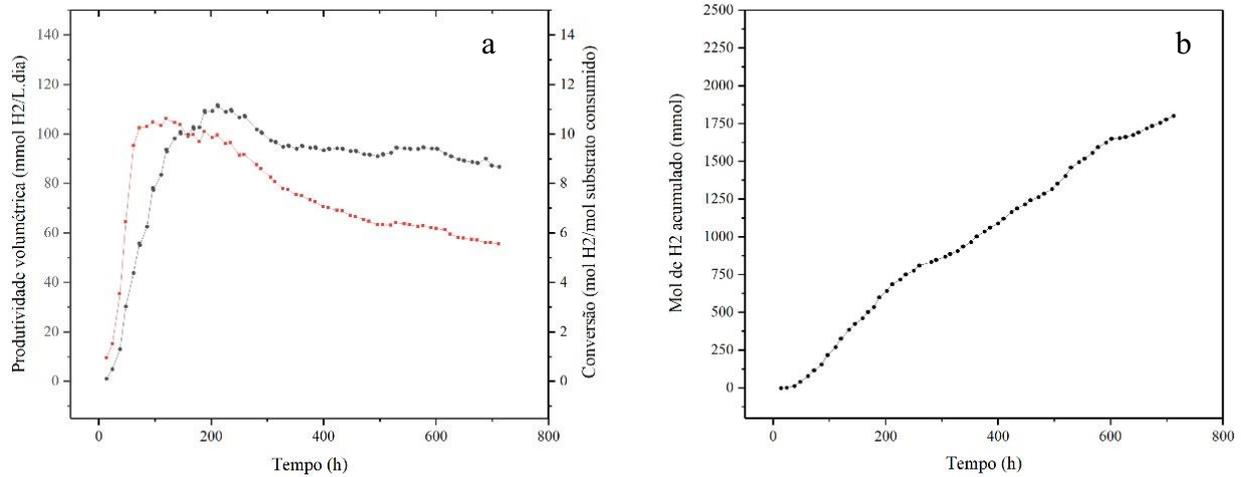
Figura 5.17 - Perfil de concentração sólidos voláteis Ensaio 11



Os dados referentes à produção de hidrogênio são apresentados na Figura 5.18-a e 5.18-b que compreende os perfis de produtividade, conversão e quantidade de mols de hidrogênio acumulado. Nota-se pela Figura 18-a que o perfil de produtividade apresentou aumento até o período de 211 horas atingindo o valor máximo de 111,73 mmol H₂/L.dia. Contrariamente ao observado no Ensaio 9 e 10, os picos de produtividade e conversão do Ensaio 11 não são coincidentes já que a maior conversão obtida durante o experimento foi de 10,62 mol de H₂/mol de substrato consumido sendo observada no período de 120 h. Após o

período de 315 h, a produtividade caiu em 15% e se manteve aproximadamente constante até o fim do experimento. Após o pico inicial em 120 h a conversão foi diminuindo de forma lenta e constante em um comportamento similar ao observado no Ensaio 9 e 10.

Figura 5.18 - Perfis de Produtividade (●) /Conversão (●) (a) e Mol de H₂ acumulado (b) – Ensaio 12



A queda no valor da conversão pode estar associada ao aumento na concentração dos ácidos orgânicos que são formados durante o processo fermentativo. O perfil de quantidade de mol de hidrogênio acumulado apresentado pela Figura 5.18-b apresenta um comportamento linear com algumas variações na taxa de crescimento. A Figura 5.19 apresenta o perfil de pH do Ensaio 11 e a Figura 5.20 apresenta os perfis de concentração dos ácidos orgânicos formados ao decorrer da fermentação. Analogamente ao observado nos Ensaios 9 e 10, os principais metabólitos encontrados foram os ácidos lático, acético, propiônico e butírico, sendo o ácido lático detectado em maior concentração.

Figura 5.19 - Perfil de pH - Ensaio 11

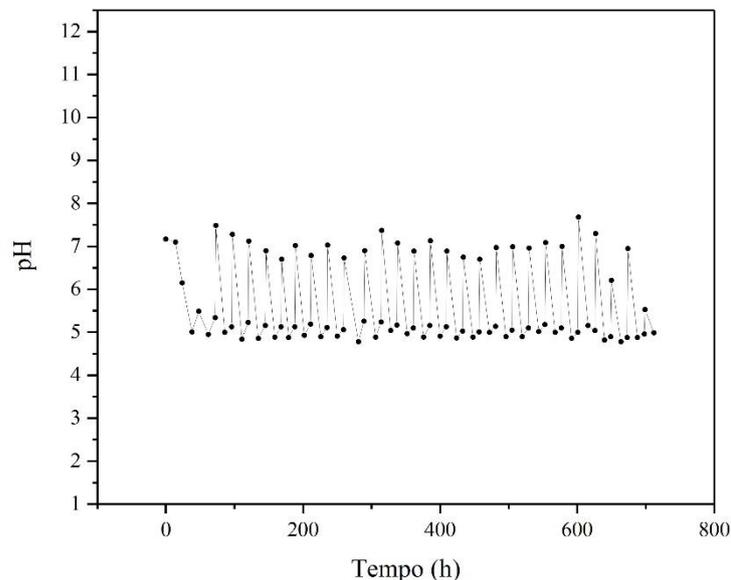
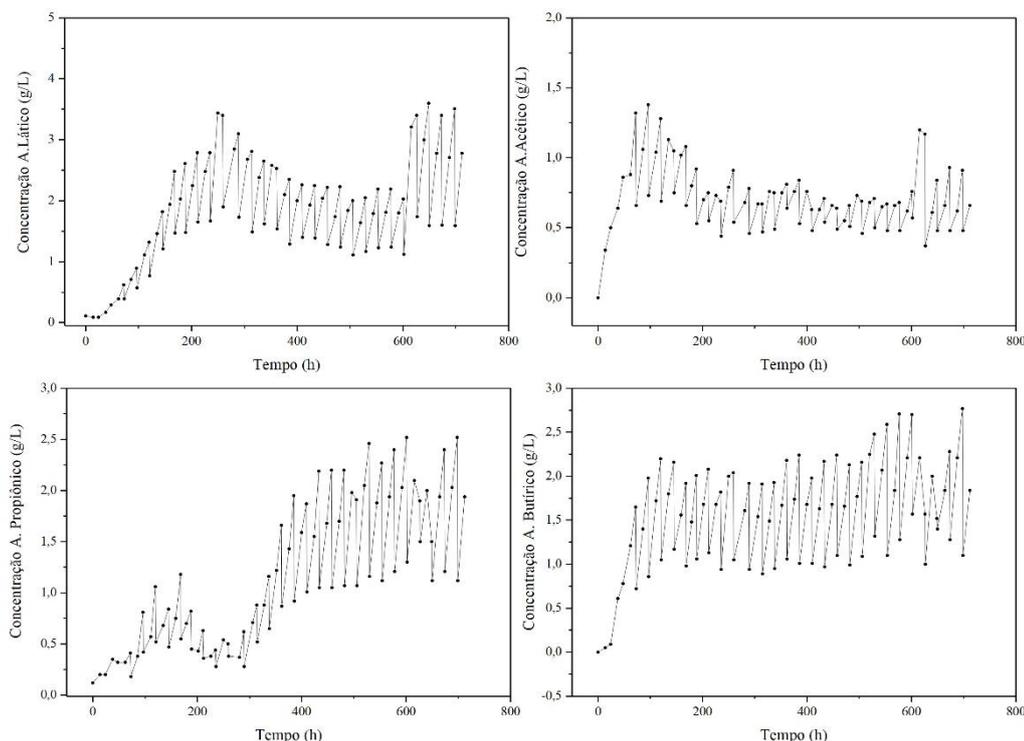


Figura 5.20 - Perfis de concentração de ácidos orgânicos produzidos Ensaio 11: (a) ácido láctico; (b) ácido acético; (c) ácido propiônico; (d) ácido butírico



A fermentação referente ao Ensaio 11 foi do tipo láctica. Pode-se explicar o valor de produtividade inferior ao observado durante o Ensaio 9 que apresentou fermentação do tipo butírica. De acordo com [Chong et al. \(2009\)](#) a presença de ácido acético e etanol é necessária para a produção de hidrogênio enquanto que o surgimento dos ácidos succínico e láctico são desfavoráveis a produção do biogás. O uso da espécie *R. rubrum* na produção de hidrogênio via reação de deslocamento foi relatado por [Rodriguez et al. \(2021\)](#). Nesse estudo, os autores verificaram a produção de H_2 em batelada através de um biorreator avaliando a influência da pressão parcial de CO_2 e a velocidade de agitação no interior do reator. O máximo valor de produtividade obtido pelos autores foi 652,8 mmol H_2 /L.dia. Essa produtividade é superior ao valor encontrado no Ensaio 11 devido aos autores utilizarem a espécie de *R. rubrum* em diferentes condições operacionais (reator de 1 L alimentação de CO_2) e empregando outro método de produção de hidrogênio (*Water Gas-Shift Reaction*).

A concentração do ácido láctico permaneceu entre a faixa de 1,0 ~ 3,5 g/L sendo o maior valor detectado de 3,51 g/L. Os ácidos acético e butírico também foram detectados e tiveram concentrações na faixa respectivamente de 0,5 ~ 1,5 g/L e 1,0 ~ 2,5 g/L. Nota-se igualmente a presença do ácido propiônico. O ácido propiônico é um metabólito considerado negativo para o processo, sendo o seu rendimento comumente associado a baixos rendimentos em hidrogênio. Segundo [Chong et al. \(2009\)](#) a rota de produção do referido ácido envolve o

consumo de um mol de hidrogênio para a formação de dois mols do produto final conforme apresentado pela Equação 5.2. Segundo [Vavilin et al. \(1995\)](#) as rotas metabólicas do ácido propiônico devem ser evitadas de forma a maximizar a produção de hidrogênio.



Este mesmo resultado também foi observado por [Schon e Biedermann \(1972\)](#) que estudaram um procedimento fermentativo através de culturas puras de *R. rubrum*. Para os autores foi relatado que a produção do ácido propiônico pode inibir o crescimento celular bacteriano. A presença do ácido propiônico e de outros ácidos de cadeia longa resulta em um meio mais acidificado.

Segundo o trabalho de [Horiuchi et al. \(2002\)](#), mudanças nos perfis de produção dos ácidos butírico e propiônico podem ser atribuídas a mudanças na população microbiana dominante. A medida que o pH decresce, os autores observaram uma mudança do perfil butírico para o perfil propiônico em um procedimento fermentativo empregando lodo anaeróbio para a produção de hidrogênio.

5.3. – Consolidado dos resultados obtidos

Os resultados observados em escala reduzida e escala ampliada são apresentados de forma consolidada na Tabela 5.2. Os Ensaios 1-8 referem-se aos testes de escala reduzida e os Ensaios 9-11 referem-se aos testes de escala ampliada. Para fins de comparação, os resultados em escala ampliada são apresentados na mesma base de tempo (480 h). Nos Ensaios 1 e 2 verificou-se que os microrganismos *R. capsulatus* e *R. rubrum* apresentaram resultados de produtividade respectivamente de 3,61 e 6,90 mmol H₂/L.dia, utilizando a lactose como fonte de carbono. Para os Ensaios 3, 4 e 5 o uso de co-cultura mostrou-se promissor. Em particular, para o Ensaio 3 que empregou a co-cultura na proporção 1:1, a produtividade máxima encontrada foi de 7,51 mmol H₂/L.dia. Observou-se também para o Ensaio 3 o maior crescimento celular observado para os ensaios de escala reduzida. As produtividades observadas nos Ensaios 6-8 que empregaram meio RCV foram inferiores às observadas nos Ensaios 1-5 indicando que o uso da lactose na concentração de 10 g/L favorece a produção de hidrogênio.

Tabela 5.2 - Consolidado respostas produtividade (mmol H₂/L.dia) e conversão (mol H₂/mol de substrato consumido).

Ensaio	Meio	Modo de operação	Inóculo	Produtividade máxima	Conversão máxima	Tempo de operação (h)	Δ C. celular (g _{sv} /L)	H ₂ (acum.) (mol)
1	RCV modificado	Batelada (ER)	<i>R. capsulatus</i>	3,61	1,95	180	0,20 – 0,55	0,62 x 10 ⁻³
2	RCV modificado	Batelada (ER)	<i>R. rubrum</i>	6,90	2,42	180	0,20 – 0,55	1,40 x 10 ⁻³
3	RCV modificado	Batelada (ER)	Co-cultura (1:1)	7,51	3,28	180	0,26 – 0,74	1,90 x 10 ⁻³
4	RCV modificado	Batelada (ER)	Co-cultura (1:3)	6,77	3,07	180	0,17 – 0,37	1,10 x 10 ⁻³
5	RCV modificado	Batelada (ER)	Co-cultura (3:1)	4,07	2,35	180	0,26 – 0,56	1,03 x 10 ⁻³
6	RCV	Batelada (ER)	<i>R. capsulatus</i>	0,75	0,06	180	0,18 – 0,57	3,33 x 10 ⁻⁵
7	RCV	Batelada (ER)	<i>R. rubrum</i>	0,18	0,02	180	0,21 – 0,60	1,22 x 10 ⁻⁵
8	RCV	Batelada (ER)	Co-cultura (1:1)	0,80	0,06	180	0,21 – 0,62	6,05 x 10 ⁻⁵
9	RCV modificado	BS com revitalização do meio (EA)	Co-cultura (1:1)	278,05	19,67	480	0,29 – 2,35	3,86
10	RCV modificado	BS sem revitalização do meio (EA)	Co-cultura (1:1)	104,47	11,71	480	0,31 – 1,93	0,84
11	RCV modificado	BS com revitalização do meio (EA)	<i>R. rubrum</i>	111,73	10,62	480	0,29 – 2,10	1,30

BS = Batelada sequencial; ER = Escala Reduzida; EA = Escala Ampliada.

Em relação ao que foi observado em escala ampliada, observa-se que os melhores resultados foram obtidos utilizando o sistema de revitalização do meio. O Ensaio 9 atingiu no tempo de 480 h o valor de 3,86 mol de H₂ acumulado ao passo que, para o Ensaio 10, que fez uso do mesmo inóculo em um sistema sem revitalização do meio reacional, o valor observado foi 0,84 mol (4,6 vezes menor em comparação ao que foi observado pelo Ensaio 9). Analogamente, observou-se que a revitalização do meio reacional garantiu um maior crescimento celular: no tempo de 480 h, a co-cultura referente ao Ensaio 9 havia crescido 1,21 vezes mais.

Observou-se, em relação ao crescimento celular, o valor final de 2,10 gsv/L para o Ensaio 11 que empregou o inóculo de cultura pura de espécie *R. rubrum* com revitalização do meio reacional. Ao fim do tempo de 480 h, atingiu-se o valor de 1,30 mol de H₂ acumulado (valor 3 vezes menor comparado ao Ensaio 9) o que indica que, conforme observado em escala reduzida, há um sinergismo positivo entre as espécies estudadas que favorece a produção do gás de interesse.

CAPÍTULO 6 – CONCLUSÃO E SUGESTÕES

A partir dos resultados obtidos, observou-se que a produção de hidrogênio por fotofermentação tem grande potencial. Em especial, o presente trabalho avaliou o uso das espécies do filo PNS *Rhodobacter capsulatus* e *Rhodospirillum rubrum* puras e combinadas em co-cultura. Observou-se que a combinação das espécies garantiu resultados promissores. Os itens a seguir apresentam conclusões sobre os resultados observados em escala reduzida e ampliada.

6.1 – Conclusões acerca dos ensaios realizados em escala reduzida

A partir dos ensaios realizados em escala reduzida, observou-se que:

- Comparando o uso de inóculos de cultura pura, a cepa de *Rhodospirillum rubrum* foi mais produtiva em comparação a cepa de *Rhodobacter capsulatus*.
- O uso de co-cultura das espécies favoreceu a produção de biohidrogênio, indicando que há um sinergismo positivo entre as espécies. Em especial, a co-cultura (1:1) garantiu o maior resultado de produtividade (7,51 mmol H₂/L.dia) e conversão (3,27 mol de H₂/mol de substrato) em comparação aos inóculos testados.
- Os ensaios “basais” realizados empregando o meio RCV como meio fermentescível indicam que o uso da lactose proveniente do permeado de soro de leite em pó como fonte de carbono na concentração de 10 g/L garante respostas maiores.
- Os principais metabólitos observados nos ensaios em escala reduzida foram os ácidos láctico, acético e propiônico sendo o ácido láctico detectado em maior concentração.

6.2 – Conclusões acerca dos ensaios realizados em escala ampliada

A partir dos ensaios realizados em escala ampliada, observou-se que:

- O uso da co-cultura (1:1) em reator de tanque agitado garante uma alta resposta de produtividade (278,05 mmol H₂/L.dia) e conversão (19,67 mol de H₂/mol de substrato). O uso do sistema de batelada sequencial com revitalização do meio reacional garante que não haja acúmulo de ácidos orgânicos no meio reacional o que

permite aumentar o tempo de vida do processo. Os principais metabólitos observados foram os ácidos láctico, acético, propiônico e butírico sendo o último encontrado em maior concentração.

- Verificou-se que há uma relação entre a manutenção da estabilidade do sistema reacional e a concentração de ácidos orgânicos. No ensaio onde houve o acúmulo de ácidos, observou-se queda no perfil de produtividade.
- A *R. rubrum* foi avaliada como inóculo de cultura pura em escala ampliada com revitalização do meio reacional. Observou-se igualmente a manutenção da estabilidade no perfil de produtividade com resposta máxima de 111,73 mmol H₂/L.dia e conversão máxima de 10,62 mol de H₂/mol de substrato.

6.3 – Sugestões para trabalhos futuros.

- Analisar a produção de hidrogênio em escala ampliada com inóculo puro de *R. capsulatus*.
- Avaliar o sistema de co-cultura das espécies empregando diferentes substratos (glicose, melão de soja) e, possivelmente, adição alternada entre substratos.
- Empregar um sistema retroalimentativo em que o efluente obtido da etapa de fotofermentação seja suplementado com uma fonte de carbono e sais do meio RCV seja utilizado em uma etapa fotofermentativa sequencial.

CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADUA, Lazarus; ZHANG, Karen Xuan; CLARK, Brett. Seeking a handle on climate change: Examining the comparative effectiveness of energy efficiency improvement and renewable energy production in the United States. **Global Environmental Change**, v. 70, p. 102351, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2021.102351>

AKKERMAN, I.; JANSSEN, M.; ROCHA, J.; WIJFFELS, R.H. Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.27, p. 1195-1208, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00071-X](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00071-X)

AKKÖSE, Sevilyay et al. Effects of ammonium ion, acetate and aerobic conditions on hydrogen production and expression levels of nitrogenase genes in *Rhodobacter sphaeroides* OU 001. **International Journal Of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 21, p. 8818-8827, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.08.040>

AKROUM-AMROUCHE, Dahbia et al. Effect of physico-chemical parameters on biohydrogen production and growth characteristics by batch culture of *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6. **Applied energy**, v. 88, n. 6, p. 2130-2135, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.044>

APHA. Standard methods for the examination of water & wastewater. 21st ed. Washington, D.C.: American Public Health Association, v.1, 2005.

APPLEBY, A. J. Fuel cells and hydrogen fuel. **International journal of hydrogen energy**, v. 19, n. 2, p. 175-180, 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0360-3199\(94\)90124-4](https://doi.org/10.1016/0360-3199(94)90124-4)

BAIRD, C.; CANN, M. Química ambiental. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2011. 844p.

BANU, J. Rajesh et al. Integrated biorefinery routes of biohydrogen: Possible utilization of acidogenic fermentative effluent. **Bioresource technology**, v. 319, p. 124241, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124241>

BASAK, Nitai; DAS, Debabrata. The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: the present state of the art. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 31-42, 2007. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-006-9190-9>

BORAN, Efe et al. Biological hydrogen production by *Rhodobacter capsulatus* in solar tubular photo bioreactor. **Journal of Cleaner Production**, v. 18, p. S29-S35, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2010.03.018>

BUNDHOO, MA Zumar; MOHEE, Romeela. Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: a review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 16, p. 6713-6733, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.057>

CALLI, Baris et al. Dark fermentative H₂ production from xylose and lactose—effects of on-line pH control. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 2, p. 522-530, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.10.012>

CHAUBEY, Rashmi et al. A review on development of industrial processes and emerging techniques for production of hydrogen from renewable and sustainable sources. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 23, p. 443-462, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.02.019>

CHEN, W.M.; TSENG, Z.J.; LEE, K.S.; CHANG, J.S. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, p. 1063-1070, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2004.09.008>

CHONG, Mei-Ling et al. Effects of pH, glucose and iron sulfate concentration on the yield of biohydrogen by *Clostridium butyricum* EB6. **International journal of hydrogen energy**, v. 34, n. 21, p. 8859-8865, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.08.061>

COLLET, Christophe et al. Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, n. 14, p. 1479-1485, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2004.02.009>

CORTEZ, Karine Alves. **Produção de hidrogênio a partir da oxidação parcial do metano empregando carbeto de molibdênio em óxido de cério como catalizador**. 2008. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://portal.peq.coppe.ufrj.br/index.php/dissertacoes-de-mestrado/2009-1/216-producao-de-hidrogenio-a-partir-da-oxidacao-parcial-do-metano-empregando-carbeto-de-molibdenio-em-oxido-de-cerio-como-catalizador/file>

CRUZ, Flávio Eduardo da. **Produção de hidrogênio em refinarias de petróleo: avaliação exergética e custo de produção**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/3/3150/tde-17082010-123008/publico/Dissertacao_Flavio_Eduardo_da_Cruz.pdf

DAS, D.; VEZIROGLU, T.N. Advances in biological hydrogen production processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 6046-6057, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.098>

DAS, Debabrata; VEZIROĞLU, T. Nejat. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. **International journal of hydrogen energy**, v. 26, n. 1, p. 13-28, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(00\)00058-6](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(00)00058-6)

DAVILA-VAZQUEZ, Gustavo et al. The buffer composition impacts the hydrogen production and the microbial community composition in non-axenic cultures. **biomass and bioenergy**, v. 35, n. 7, p. 3174-3181, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.04.046>

DE SOUZA, Isadora Torres et al. Technological advances in hydrogen production by Enterobacter bacteria upon substrate, luminosity and anaerobic conditions. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 31, p. 16190-16198, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.05.036>

EROGLU, Ela; MELIS, Anastasios. Photobiological hydrogen production: recent advances and state of the art. **Bioresource technology**, v. 102, n. 18, p. 8403-8413, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.026>

EROĞLU, İnci et al. Hydrogen production by Rhodobacter sphaeroides OU 001 in a flat plate solar bioreactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 2, p. 531-541, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.09.025>

GENG, Alei et al. Effect of key factors on hydrogen production from cellulose in a co-culture of Clostridium thermocellum and Clostridium thermopalmarium. **Bioresource technology**, v. 101, n. 11, p. 4029-4033, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.042>

GHIRARDI, Maria L.; TOGASAKI, Robert K.; SEIBERT, Michael. Oxygen sensitivity of algal H₂-production. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 63, n. 1, p. 141-151, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2312-2-14>

GIRELLI, Anna Maria; ASTOLFI, Maria Luisa; SCUTO, Francesca Romana. Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. **Chemosphere**, v. 244, p. 125368, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125368>

GOLDING, Amber-Leigh; DONG, Zhongmin. Hydrogen production by nitrogenase as a potential crop rotation benefit. **Environmental Chemistry Letters**, v. 8, n. 2, p. 101-121, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10311-010-0278-y>

GOLOMYSOVA, Anastasia; GOMELSKY, Mark; IVANOV, Pavel S. Flux balance analysis of photoheterotrophic growth of purple nonsulfur bacteria relevant to biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, n. 23, p. 12751-12760, 2010. Disponível em : <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.08.133>

HALLENBECK, Patrick C.; BENEMANN, John R. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International journal of hydrogen energy*, v. 27, n. 11-12, p. 1185-1193, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00131-3](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00131-3)

HAY, Jacqueline Xiao Wen et al. Biohydrogen production through photo fermentation or dark fermentation using waste as a substrate: overview, economics, and future prospects of hydrogen usage. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 7, n. 3, p. 334-352, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bbb.1403>

HERNÁNDEZ, Ana Belén; FERRASSE, J.-H.; ROCHE, Nicolas. Limiting the pollutant content in the sewage sludge producer gas through staged gasification. **Chemical Engineering & Technology**, v. 36, n. 11, p. 1985-1996, 2013. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ceat.201300103?casa_token=FpCQJBB8pKcAAAAA:a08xlqu7tTK4FPua0BGm998lB8DDgeoKmJ2NMY_kIK2mMP3--lk46ECDe-eSIZLPzotXC7DPgU8j4-Nv8Q

HOLLADAY, Jamie D. et al. An overview of hydrogen production technologies. **Catalysis today**, v. 139, n. 4, p. 244-260, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2008.08.039>

HUESEMANN, Michael H. et al. Hydrogen generation through indirect biophotolysis in batch cultures of the nonheterocystous nitrogen-fixing cyanobacterium *Plectonema boryanum*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 162, n. 1, p. 208-220, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8741-6>

JOHNSTON, Brenda; MAYO, Michael C.; KHARE, Anshuman. Hydrogen: the energy source for the 21st century. **Technovation**, v. 25, n. 6, p. 569-585, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.technovation.2003.11.005>

KAPDAN, Ilgi K. et al. Bio-hydrogen production from acid hydrolyzed wheat starch by photo-fermentation using different Rhodobacter sp. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 5, p. 2201-2207, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.01.017>

KAYFECI, Muhammet; KEÇEBAŞ, Ali; BAYAT, Mutlucan. Hydrogen production. In: Solar hydrogen production. **Academic Press**, 2019. p. 45-83. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-814853-2.00001-1>

KESKIN, Tugba; ABO-HASHESH, Mona; HALLENBECK, Patrick C. Photofermentative hydrogen production from wastes. **Bioresource technology**, v. 102, n. 18, p. 8557-8568, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.004>

KIM, Dong-Hoon; KIM, Mi-Sun. Hydrogenases for biological hydrogen production. **Bioresource technology**, v. 102, n. 18, p. 8423-8431, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.113>

KIM, Mi-Sun et al. Hydrogen production from Chlamydomonas reinhardtii biomass using a two-step conversion process: anaerobic conversion and photosynthetic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, n. 6, p. 812-816, 2006. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2005.06.009>

KOBER, T. et al. Global energy perspectives to 2060–WEC's World Energy Scenarios 2019. **Energy Strategy Reviews**, v. 31, p. 100523, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.esr.2020.100523>

KOKU, Harun et al. Aspects of the metabolism of hydrogen production by Rhodobacter sphaeroides. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 11-12, p. 1315-1329, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00127-1](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00127-1)

KONDO, Toshihiko et al. Hydrogen production by combining two types of photosynthetic bacteria with different characteristics. **International journal of hydrogen energy**, v. 27, n. 11-12, p. 1303-1308, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00122-2](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00122-2)

KORDESCH, K; SIMADER, G. Fuel Cells and their applications. Weinheim: New York; Basel; Cambridge: Tokyo: VCH, 1996. ISBN 3 - 527-28579 -2. NE: Simader, Gunter, p. 375. Disponível em: <https://www.osti.gov/etdeweb/biblio/257459>

KUANG, Yan et al. Enhanced hydrogen production from food waste dark fermentation by potassium ferrate pretreatment. **Environmental Science & Pollution Research**, v. 27, n. 15, 2020.

LEE, Jackson Z. et al. The effect of butyrate concentration on hydrogen production via photofermentation for use in a Martian habitat resource recovery process. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 15, p. 3301-3307, 2007.

LEVIN, David B.; PITT, Lawrence; LOVE, Murray. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. **International journal of hydrogen energy**, v. 29, n. 2, p. 173-185, 2004. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(03\)00094-6](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(03)00094-6)

LI, Yanfei; TAGHIZADEH-HESARY, Farhad. The economic feasibility of green hydrogen and fuel cell electric vehicles for road transport in China. **Energy Policy**, v. 160, p. 112703, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2021.112703>

LIPMAN, Timothy E.; WEBER, Adam Z. (Ed.). **Fuel cells and hydrogen production: A volume in the Encyclopedia of sustainability science and technology**. Berlin: Springer, 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/referencework/10.1007%2F978-1-4939-7789-5>

LIU, Bing-Feng et al. Photo-fermentation hydrogen production by *Rhodospseudomonas* sp. nov. strain A7 isolated from the sludge in a bioreactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 28, p. 8661-8668, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.05.001>

LONG, Xingle et al. Nonrenewable energy, renewable energy, carbon dioxide emissions and economic growth in China from 1952 to 2012. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 680-688, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.176>

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

LOSS, Raquel Aparecida et al. Avaliação da produção de hidrogênio por consórcio bacteriano fotoheterotrófico. 2012. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina.

Disponível em:

<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/95756/296884.pdf?sequence=1>

LOURENÇO, Rafaela David Fernandes. **Valorização de resíduos agro-industriais para a produção biológica de hidrogênio**. 2012. Tese de Doutorado. Disponível em: https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/8820/1/ulfc104271_tm_Rafaela_Louren%C3%A7o.pdf

MACHADO, Rafaela Gonçalves et al. Investigação da produção de hidrogênio por fotofermentação empregando cultura pura e co-cultura. 2016. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Uberlândia. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/18986/1/InvestigacaoProducaoHidrogenio.pdf>

MACHADO, R. G. et al. Repeated batch cycles as an alternative for hydrogen production by co-culture photofermentation. **Energy**, v. 153, p. 861-869, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.energy.2018.04.101>

MATHEWS, Juanita; WANG, Guangyi. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. **International journal of hydrogen energy**, v. 34, n. 17, p. 7404-7416, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.05.078>

MCKINLAY, James B.; HARWOOD, Caroline S. Photobiological production of hydrogen gas as a biofuel. **Current opinion in biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 244-251, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.02.012>

MELNICKI, Matthew R. et al. Hydrogen production during stationary phase in purple photosynthetic bacteria. **international journal of hydrogen energy**, v. 33, n. 22, p. 6525-6534, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.08.041>

MIRA, Manuel Maria Vaz Pequito. **Produção de biohidrogênio a partir de diferentes fontes de carbono, por fermentação anaeróbia**. 2012. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/303717057.pdf>

MITSUI, A.; OHTA, Y.; FRANK, J. Photosynthetic bacteria as alternative energy sources: overview on hydrogen production research. 1979. Disponível em: <https://www.osti.gov/servlets/purl/5199329>

MOMIRLAN, Magdalena; VEZIROGLU, T. N. Current status of hydrogen energy. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 6, n. 1-2, p. 141-179, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1364-0321\(02\)00004-7](https://doi.org/10.1016/S1364-0321(02)00004-7)

MOREIRA, F. S. et al. Improvement of hydrogen production by biological route using repeated batch cycles. **Process Biochemistry**, v. 58, p. 60-68, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.04.013>

MOREIRA, F. S. et al. Single-stage repeated batch cycles using co-culture of *Enterobacter cloacae* and purple non-sulfur bacteria for hydrogen production. **Energy**, p. 122465, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.energy.2021.122465>

MOREIRA, Felipe Santos. Estudo de diferentes tipos de fonte de carbono como substrato para produção de hidrogênio por meio de fermentação escura e fotofermentação. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Uberlândia 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/17918/1/EstudoDiferentesTipos.pdf;Untitled>

NAJAFPOUR, Ghasem; YOUNESI, Habibollah; MOHAMED, Abdul Rahman. Effect of organic substrate on hydrogen production from synthesis gas using *Rhodospirillum rubrum*, in batch culture. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, n. 2, p. 123-130, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.06.001>

NETO, Roberto Liberato; MOREIRA, José Roberto Simões. Geração e combustão do hidrogênio obtido através do processo de eletrólise da água. **Portal de química. Leis da Eletrólise**, 2007. Disponível em: https://www.academia.edu/download/58809363/GERACAO_E_COMBUSTAO_DO_HIDROGENIO_OBTIDO_ATRAVES_DO.pdf

NEVES, Luís Miguel Viegas das. **Produção de biohidrogênio por bactérias a partir de resíduos fermentescíveis**. 2009. Tese de Doutorado. FCT-UNL. Disponível em: https://run.unl.pt/bitstream/10362/1950/1/Neves_2009.pdf

NICOLAY, Sebastian et al. Conceptual design and optimization of a general aviation aircraft with fuel cells and hydrogen. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 46, n. 64, p. 32676-32694, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.07.127>

OH, You-Kwan et al. Current status of the metabolic engineering of microorganisms for biohydrogen production. **Bioresource technology**, v. 102, n. 18, p. 8357-8367, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.054>

OLIVEIRA, Thamayne V. et al. Insights Into the effect of carbon and nitrogen source on hydrogen production by photosynthetic bacteria. **Chemical Engineering**, v. 38, 2014. Disponível em: <http://doi.org/10.3303/CET1438062>

PACHAPUR, Vinayak Laxman et al. Biological hydrogen production using co-culture versus mono-culture system. *Environmental Technology Reviews*, v. 4, n. 1, p. 55-70, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21622515.2015.1068381>

POLICASTRO, Grazia et al. Enhancing photo fermentative hydrogen production using ethanol rich dark fermentation effluents. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 47, n. 1, p. 117-126, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.10.028>

RAO, Raman; BASAK, Nitai. Process optimization and mathematical modelling of photo-fermentative hydrogen production from dark fermentative cheese whey effluent by *Rhodobacter sphaeroides* OU 001 in 2-L cylindrical bioreactor. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-24, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13399-021-01377-1>

REN, Nan-Qi et al. The effect of butyrate concentration on photo-hydrogen production from acetate by *Rhodospseudomonas faecalis* RLD-53. **international journal of hydrogen energy**, v. 33, n. 21, p. 5981-5985, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.020>

Resenha Energética Brasileira 2021 - Ano Base 2020. MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. Disponível em: <https://www.gov.br/mme/pt-br/assuntos/noticias/ResenhaEnergéticaExercício2020final.pdf>

REZAEITAVABE, Fatemeh et al. Enhancing bio-hydrogen production from food waste in single-stage hybrid dark-photo fermentation by addition of two waste materials (exhausted resin and biochar). **Biomass and Bioenergy**, v. 143, p. 105846, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105846>

RIBEIRO, Cláudia Garrastazu; PARIZZI, Jocemar Biasi. Produção de hidrogênio via eletrólise da água, gaseificação do carvão e reforma a vapor do gás natural. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 3, n. 2, 2011. Disponível em: <https://periodicos.unipampa.edu.br/index.php/SIEPE/article/view/61149>

RODRÍGUEZ, Alberto et al. Enhancement of biohydrogen production rate in *Rhodospirillum rubrum* by a dynamic CO-feeding strategy using dark fermentation. **Biotechnology for**

Biofuels, v. 14, n. 1, p. 1-16, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-021-02017-6>

ROMÃO, B. B. et al. Biohydrogen production through dark fermentation by a microbial consortium using whey permeate as substrate. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, n. 7, p. 3670-3685, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0778-5>

SÁ, Lívian R.; CAMMAROTA, Magali C.; FERREIRA-LEITÃO, Viridiana S. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia-aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. **Química Nova**, v. 37, p. 857-867, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140138>

SARAVANAN, Azhaham Perumal et al. Biofuel policy in India: a review of policy barriers in sustainable marketing of biofuel. **Journal of cleaner production**, v. 193, p. 734-747, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.05.033>

SARMA, S.J.; BRAR, S.K.; SYDNEY, E.B.; BIHAN, Y.L.; BUELNA, G.; SOCCOL, C.R. Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 6473-6490, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.11.002>

SILVA, Felipe Thalles Moreira et al. Produção de biohidrogênio por *Rhodobacter capsulatus* utilizando como substrato o efluente da fermentação escura. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Uberlândia 2015. Disponível em: <http://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/15246/1/ProducaoBiohidrogenioRhodobacter.pdf>

SILVA, Felipe Thales Moreira et al. Replacement of sugars to hydrogen production by *Rhodobacter capsulatus* using dark fermentation effluent as substrate. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 72-80, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.002>

SØRENSEN, Bent. Total life-cycle assessment of PEM fuel cell car. In: Paper 3-1189 in Proc. 15th World Hydrogen Energy Conf., Yokohama. CDROM, **World Hydrogen Energy Association**. 2004. Disponível em: https://rucforsk.ruc.dk/ws/portalfiles/portal/3511679/TIME-SIMULATIONS_OF_RENEWABLE_ENERGY.pdf

SCHÖN, G.; BIEDERMANN, M. Growth and adaptive hydrogen production of *Rhodospirillum rubrum* (F1) in anaerobic dark cultures. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 304, n. 1, p. 65-75, 1973. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(73\)90115-3](https://doi.org/10.1016/0304-4165(73)90115-3)

SOUZA, Isadora Torres et al. Produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia: enriquecimento nutricional e influência da luminosidade. Dissertação de mestrado. 2017. Disponível em: <http://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/24269/3/Produ%C3%A7%C3%A3oHidrog%C3%AAnioFermenta%C3%A7%C3%A3o.pdf>

TAMAGNINI, Paula et al. Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 66, n. 1, p. 1-20, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc120778/>

TAO, Yongzhen et al. High hydrogen yield from a two-step process of dark-and photo-fermentation of sucrose. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 2, p. 200-206, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.06.034>

TURON, Violette et al. Potentialities of dark fermentation effluents as substrates for microalgae growth: a review. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 11, p. 1843-1854, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.03.018>

VALDEZ-VAZQUEZ, Idania; POGGI-VARALDO, Hector M. Hydrogen production by fermentative consortia. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 13, n. 5, p. 1000-1013, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2008.03.003>

VAN GINKEL, Steven; LOGAN, Bruce E. Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids. **Environmental science & technology**, v. 39, n. 23, p. 9351-9356, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/es0510515>

VARGAS, Reinaldo A. et al. Hidrogênio: o vetor energético do futuro. **São Paulo: Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais (CCTM), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN)**, 2006. Disponível em: <https://www.ipen.br/biblioteca/2006/eventos/15435.pdf>

VEZIRO, T. N. et al. Hydrogen: the wonder fuel. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 17, n. 6, p. 391-404, 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0360-3199\(92\)90183-W](https://doi.org/10.1016/0360-3199(92)90183-W)

VIELSTICH, Wolf; LAMM, Arnold; GASTEIGER, Hubert. Handbook of fuel cells. Fundamentals, technology, applications. 2003. Disponível em: <https://www.osti.gov/etdeweb/biblio/20480552>

VRATI, Sudhanshu; VERMA, Jitendra. Production of molecular hydrogen and single cell protein by *Rhodopseudomonas capsulata* from cow dung. **Journal of fermentation technology**, v. 61, n. 2, p. 157-162, 1983. Disponível em: <http://repository.ias.ac.in/64008/>

WEAVER, Paul F.; WALL, Judy D.; GEST, Howard. Characterization of *Rhodopseudomonas capsulata*. *Archives of Microbiology*, [S. l.], v. 105, n. 1, p. 207–216, 1975. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF00447139>.

WEI, Xuan et al. Photo-biological hydrogen production by a temperature-tolerant mutant of *Rhodobacter capsulatus* isolated by transposon mutagenesis. **Bioresource Technology**, v. 320, p. 124286, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124286>

WU, X.; ZHU, J.; DONG, C.; MILLER, C.; LI, Y.; WANG, L.; YAO, W. Continuous biohydrogen production from liquid swine manure supplemented with glucose using an anaerobic sequencing batch reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 6636-6645, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.06.058>

YANG, Honghui; GUO, Liejin; LIU, Fei. Enhanced bio-hydrogen production from corncob by a two-step process: dark-and photo-fermentation. **Bioresource technology**, v. 101, n. 6, p. 2049-2052, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.078>

ZHANG, Quanguo et al. Sequential dark and photo fermentation hydrogen production from hydrolyzed corn stover: a pilot test using 11 m³ reactor. **Bioresource technology**, v. 253, p. 382-386, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.017>

ZÜRRER, Hans; BACHOFEN, Reinhard. Hydrogen production by the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 789-793, 1979. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/aem.37.5.789-793.1979>