

## **ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO A PARTIR DO MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR UTILIZANDO A BACTÉRIA FOTOTRÓFICA *Rhodospirillum rubrum***

Alceu Vinicius Roncoletta Belone <sup>1</sup>  
Fernanda Mendes Gomes <sup>2</sup>  
Ana Paula Mázaró Cângani <sup>3</sup>  
Larissa Desordi Bortoli <sup>4</sup>  
Amanda Carmelo da Rocha <sup>5</sup>  
Fabiana Regina Xavier Batista <sup>6</sup>  
Miriam Maria de Resende <sup>7</sup>  
Vicelma Luiz Cardoso <sup>8</sup>

Implementação de bioprocessos sustentáveis

### **Resumo**

O hidrogênio é uma fonte de energia limpa que só emite vapor d'água e não deixa resíduos no ar, ao contrário do carvão e do petróleo. No presente trabalho, estudou-se a produção biológica de hidrogênio por Fotofermentação utilizando a bactéria púrpura não-sulfurosa *Rhodospirillum rubrum* cultivada em meio basal RCV. Avaliou-se o melaço de cana cedido por uma Usina Sucreenergica da região como fonte de carbono a uma concentração de 10 g/L de açúcares totais. Observou-se um acúmulo de ácidos orgânicos e uma produtividade de 0,61 mmol H<sub>2</sub>/L.dia após 24 h de fermentação. Os principais ácidos orgânicos detectados foram os ácidos láctico, acético, propiônico e cítrico. Após um período de avaliação de 120 h foi observado um percentual de açúcares totais residuais maior que 90% e uma queda na produtividade de biohidrogênio conferindo o caráter seletivo de consumo da glicose em detrimento dos outros açúcares disponíveis no melaço de cana de açúcar.

**Palavras-chave:** Fotofermentação; Sustentabilidade; Bactérias Fotossintéticas; Biocombustível.

<sup>1</sup> Graduando em Engenharia de Química – Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Faculdade de Engenharia Química – FEQUI.

<sup>2</sup> Graduanda em Biotecnologia – Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Faculdade de Engenharia Química – FEQUI, [fernanda.merola@ufu.br](mailto:fernanda.merola@ufu.br).

<sup>3</sup> Doutoranda em Engenharia Química – PPGEQ-UFU, Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química..

<sup>4</sup> Doutora em Engenharia Química – PPGEQ-UFU, Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química.

<sup>5</sup> Doutora em Engenharia Química – PPGEQ-UFU, Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química.

<sup>6</sup> Profa. Dra. Universidade Federal de Uberlândia – Campus Santa Mônica-UFU, Faculdade de Engenharia Química – FEQUI.

<sup>7</sup> Profa. Dra. Universidade Federal de Uberlândia – Campus Santa Mônica-UFU, Faculdade de Engenharia Química – FEQUI

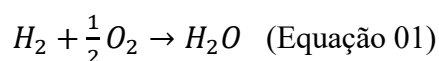
<sup>8</sup> Profa. Dra. Universidade Federal de Uberlândia – Campus Santa Mônica-UFU, Faculdade de Engenharia Química – FEQUI.

## INTRODUÇÃO

Desde 5000 A.C., evidências arqueológicas revelam que civilizações consomem produtos provenientes da fermentação. No entanto, somente no século XIX, cientistas como Louis Pasteur começaram a compreender profundamente esse processo. Eduard Buchner, químico alemão, avançou significativamente ao extrair a enzima responsável pela fermentação, um processo bioquímico onde microrganismos modificam açúcares para produzir energia na forma de ATP, sem necessidade de oxigênio. A glicose é um dos substratos mais utilizados para esse fim. Na indústria, a fermentação geralmente ocorre em meio líquido, dentro de biorreatores, permitindo o controle preciso de variáveis como pH, temperatura e taxa de oxigênio, facilitando sua aplicação em larga escala (SIMOMUKAY, *et al.*, 2022).

A fotofermentação envolve o uso de bactérias fotossintéticas púrpuras não sulfurosas (PNS) que têm a capacidade de transformar substratos orgânicos em hidrogênio na presença de luz e ausência de oxigênio. É nesse contexto que estudos para produção de hidrogênio via rota metabólica de microrganismos têm ganhado notoriedade.

O hidrogênio ( $H_2$ ) é visto como o futuro dos combustíveis por causa de seus muitos benefícios técnicos, econômicos e ambientais. Ele possui a maior quantidade de energia por peso entre todos os combustíveis conhecidos (142 kJ/g ou 61.000 Btu/lb) e pode ser transportado facilmente para uso em casas e indústrias. O gás  $H_2$  é mais seguro para ser usado do que o gás natural usado em residências. Atualmente, o hidrogênio é reconhecido mundialmente como uma fonte de energia segura para o meio ambiente e renovável, sendo uma ótima alternativa aos combustíveis fósseis que contribuem para o aquecimento global. Além disso, como o único combustível sem carbono, o hidrogênio, quando queimado, só produz água (Equação 1) (DAS, *et al.*, 2008).



Com base no viés ambiental, no uso de biohidrogênio como combustível limpo, para a redução da emissão de gás carbônico, o presente trabalho visou o estudo do uso de melão de cana como substrato para bactéria PNS *Rhodospirillum rubrum* na produção de hidrogênio.

## METODOLOGIA

A cepa bacteriana empregada no estudo de fotofermentação foi a PNS *Rhodospirillum rubrum* DSM 467, sendo essa uma bactéria fotossintetizante obtida da DSMZ (Coleção Alemã de Microrganismos e Cultura de Células).

A bactéria foi cultivada em meio basal RCV conforme descrito por Weaver et al. (1975). Para o experimento, utilizou-se um meio modificado denominado RCV, preparado dissolvendo os reagentes do meio basal RCV e adicionando melaço de cana-de-cana de açúcar como substrato alternativo para o microrganismo, substituindo o ácido málico como fonte de carbono. Na Tabela 01 é mostrado os dados de melaço de cana-de-açúcar.

Tabela 01 – Dados do Melaço de Cana-De-Açúcar

| Amostra | Sacarose | Glicose | Frutose | Total |
|---------|----------|---------|---------|-------|
| Melaço  | 41,8%    | 8,0%    | 11,8%   | 61,5% |

O estudo para a produção de H<sub>2</sub> foi realizado em duplicata em pequena escala, utilizando-se biorreatores (Figura 01) de 50 mL (frascos de penicilina) postos em uma incubadora com iluminação constante e temperatura de  $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Os reatores continham um volume útil de 37 mL, sendo 32 mL de meio fermentável (RCV modificado) e 5 mL de inóculo. Após a inoculação, o meio foi colocado na presença de argônio, durante um tempo de 3 minutos, de modo a deixar o meio em ambiente anaeróbico com posterior vedação.

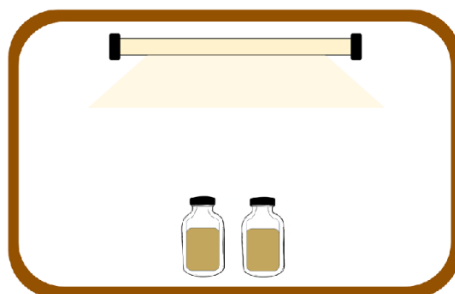


Figura 01 – Biorreatores de 50 mL (Frascos de penicilina) contendo o meio de fermentação.

As amostras de biogás foram coletadas diariamente com o uso de seringas com graduação de 10 mL em um período de 7 dias. Após coletadas, as amostras foram armazenadas em ampolas gasométricas para posterior análise em cromatografia gasosa, com o auxílio do aparelho Shimadzu (modelo 2014), conforme esquema abaixo (Figura 02).

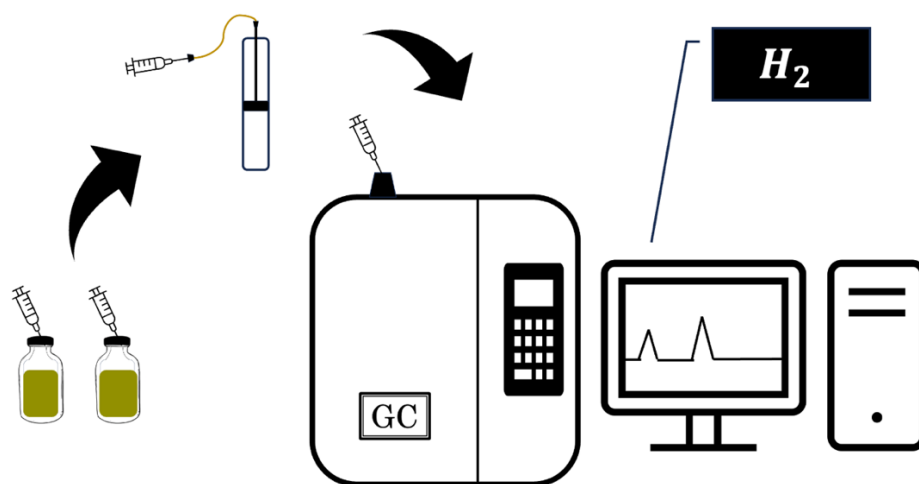


Figura 02 – Esquema de análise do biogás.

Após a coleta do biogás, a solução com a cepa presente nos frascos de penicilina foi centrifugada a uma velocidade de 5000 rpm durante um intervalo de tempo de 12 minutos, o que permitiu a separação das células bacterianas do meio líquido, concentrando-as no fundo do tubo de centrifugação.

O sobrenadante obtido com a centrifugação foi armazenado e analisado para coleta de dados como pH da solução e classificação dos metabólicos resultantes da fermentação. O estudo dos produtos metabólicos presentes no meio foi realizado através da análise cromatográfica com o uso do HPLC da marca Shimadzu.

As células sedimentadas foram então ressuspensas em 37 mL de água ultrapura (Milli-Q) de maneira a garantir que todas as células fossem distribuídas uniformemente na solução.

Para a análise do crescimento celular, uma alíquota de 1 mL da solução ressuspensa foi diluída em um balão volumétrico de 25 mL. Tal diluição foi realizada para ajustar a concentração celular a um nível adequado da curva de calibração para a leitura da absorbância da mesma. A medição foi realizada em um espectrofotômetro Shimadzu com o uso de um comprimento de onda de 660 nm.

Em paralelo, com o auxílio do mesmo espectrofotômetro, foi também realizada uma análise

espectroscópica da mesma solução ressuspensa, sem a realização da diluição feita para a medição da absorbância. Esse procedimento foi realizado para a avaliação da integridade da solução bacteriana, como o estudo de possíveis danos celulares causados por algum estresse. O intervalo de comprimento de onda utilizado para a varredura foi de 300 a 900 nm.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio avaliou a produção de hidrogênio empregando o sistema de cultura pura da bactéria *Rhodospirillum rubrum* e teve duração de 120 horas. Deve-se ressaltar que para esse ensaio o meio fermentável empregado foi o RCV modificado contendo o melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono na concentração de 10 g/L de açúcares totais.

A concentração de sólidos voláteis apresentada na Figura 03 corresponde a concentração de biomassa celular.

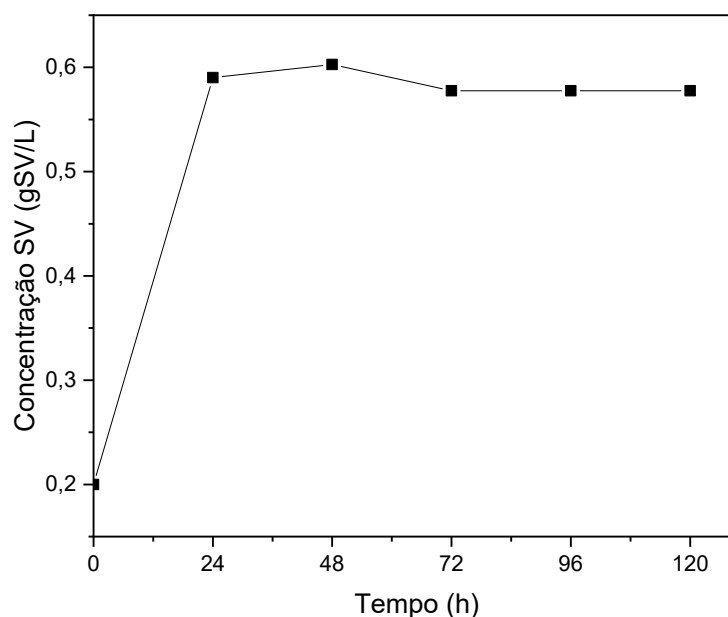


Figura 03: Perfil da Concentração de Sólidos Voláteis.

O crescimento observado representou um aumento na concentração celular de 3,014 vezes em relação ao valor inicial, com ápice de valor no tempo de 48 horas, sendo que após esse período houve uma transição para a fase estacionária sendo a biomassa 0,5776 gSV/L.

O perfil de pH foi apresentado na Figura 04.

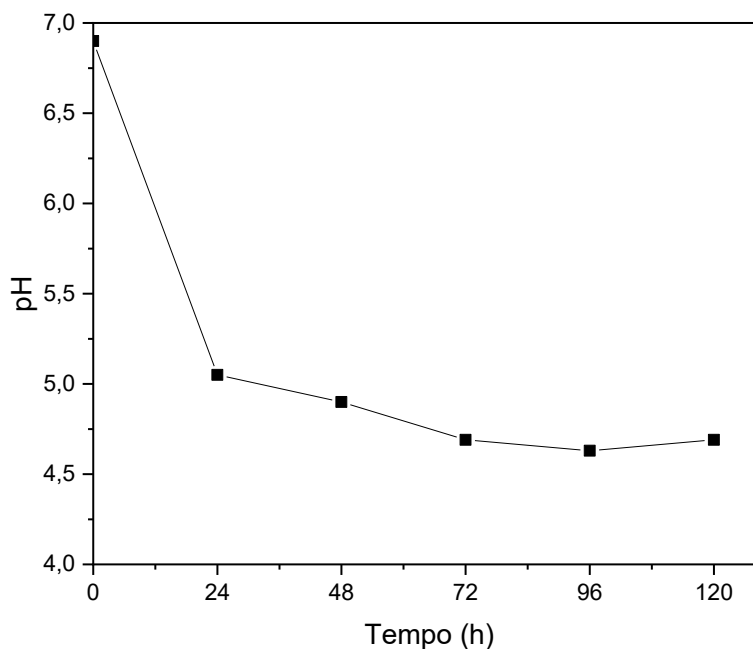


Figura 04: Perfil do pH.

O perfil do pH conforme apresentado na Figura acima diminuiu até atingir 4,63 no tempo de 96 horas. A queda do pH está relacionada com o aumento da concentração de ácidos orgânicos (Figura 05) formados durante o processo fermentativo (Moreira *et al.* 2016).

Em relação à composição dos metabólicos, observa-se a formação de ácido cítrico, láctico, acético e propiônico nas concentrações 0,31692, 3,76521, 0,4796 e 1,13382 g/L respectivamente. Nota-se que o aumento na concentração de ácido láctico ocorreu de forma expressiva após 72 do processo fermentativo.

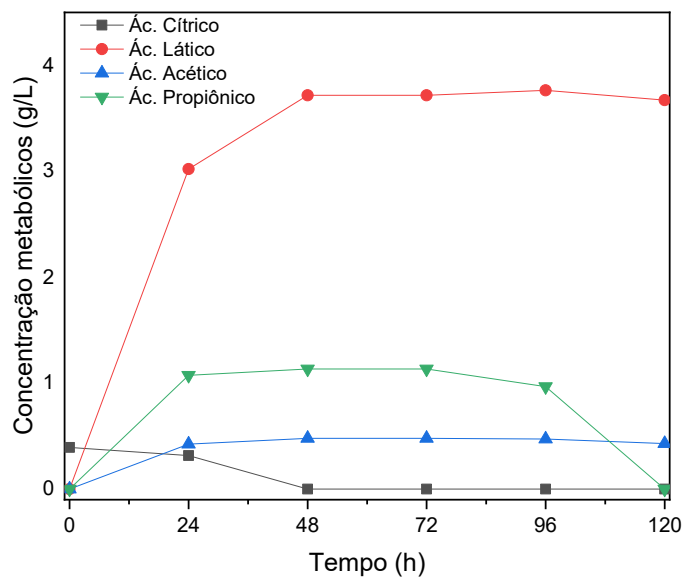


Figura 05: Perfil da Concentração de Metabólitos: Ácido Cítrico (■); Ácido Láctico (●); Ácido acético (▲) e Ácido Propiônico (▼).

Conforme apresentado pela Figura 06, a produtividade máxima de hidrogênio ocorreu no tempo de 24 horas, obtendo um valor de 0,61 mmol de H<sub>2</sub>/L.dia.

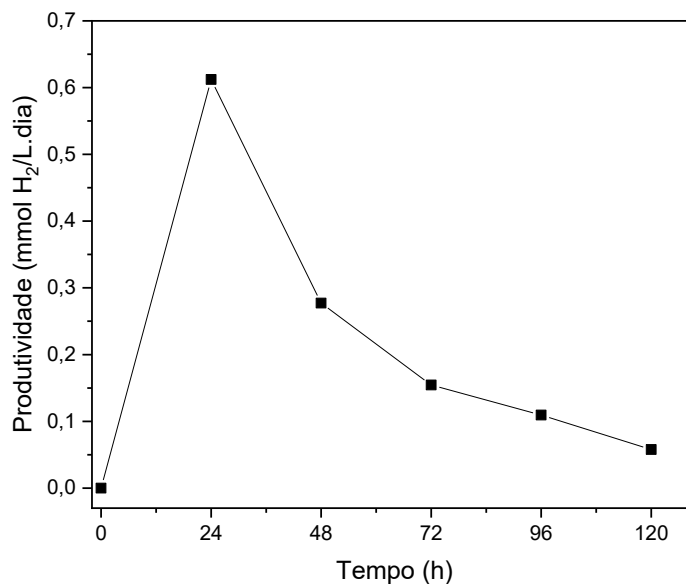


Figura 06: Perfil de Produtividade.



Segundo Moreira (2021), a produção de hidrogênio pode ser estimada por meio da produção dos metabólicos. De acordo com Levin *et al.* (2024), altos rendimentos de H<sub>2</sub> são associados a uma mistura de ácido acético e ácido butírico como produtos da fermentação, enquanto os ácidos láctico e propiônico são associados a baixos rendimentos de H<sub>2</sub>.

Observa-se na Figura 06 que a produtividade decresceu a partir de 48 horas de fermentação. Nota-se na Figura 05 que, a partir do mesmo período, a quantidade de ácido láctico e propiônico são maiores do que o ácido acético e a inexistência da formação de ácido butírico. Segundo Kadpan (2009), uma das maiores dificuldades encontradas nos processos fotofermentativos é o acúmulo de ácidos orgânicos produzidos pelo metabolismo celular que, em altas concentrações pode ter caráter inibitório na produção de hidrogênio, o que ocorreu no presente trabalho.

Na Figura 07 observa-se os açúcares totais.

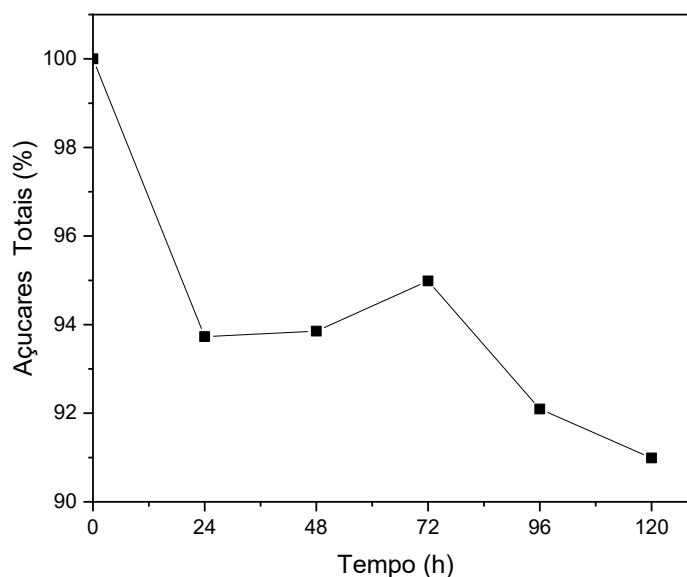


Figura 07: Açúcares Totais.

Na Figura 08 observa-se a absorbância versus comprimento de onda de amostras da bactéria longo do dia de fotofermentação, sendo MO o inóculo e M1 a M5 dos dias 1 a 5. Segundo Gobel (1978) o espectro de absorção in vivo da cepa *R. rubrum* DSM 467 apresenta um pico máximo de absorção na região do infravermelho, em 890 nm. Uma maior eficiência fotoquímica desta cepa poderia ser alcançada utilizando fontes luminosas com espectro próximo do infravermelho, uma vez que esta bactéria exibe um pico de absorção no infravermelho próximo. Nesta cepa avaliada foi observada alta





absorção também no espectro do visível e dois picos correspondentes a 805 e 880 nm.

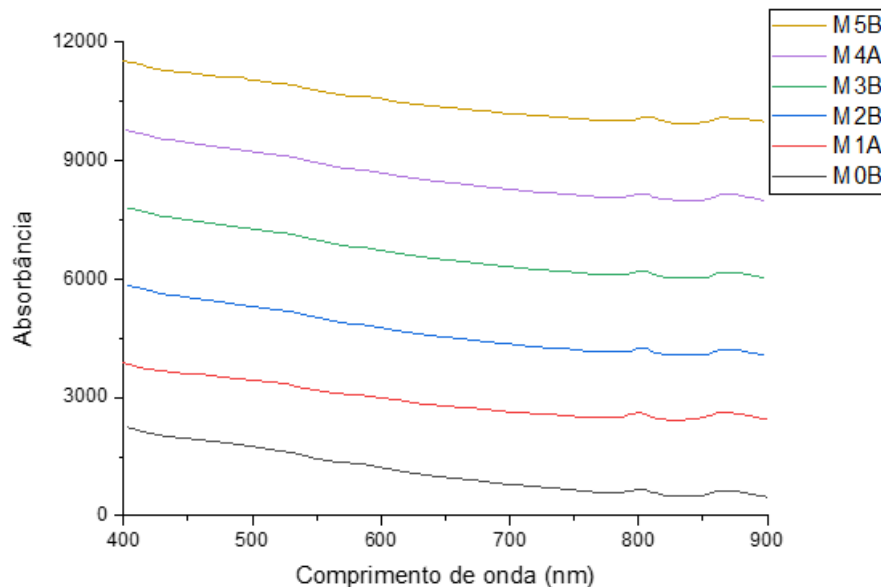


Figura 09: Absorbância vs. Comprimento de Onda.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que a fotofermentação com melado de cana como substrato é uma alternativa em potencial para a produção de hidrogênio, porém um pré tratamento do substrato ou a ambientação das bactérias deve ser estudada, visto que foi observada o consumo majoritário de glicose em relação aos outros açúcares disponíveis, sacarose e frutose.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade Federal de Uberlândia (UFU), ao NUCBIO (Núcleo de Bioprocessos) e ao apoio financeiro da FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

## REFERÊNCIAS



DAS, Debabrata; VEZIROGLU, T. Nejat. Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, [S. l.], v. 33, n. 21, p. 6046–6057, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.098>. Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S036031990800918X>.

GOBEL, Florian. Direct measurement of pure absorbance spectra of living phototrophic microorganisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 538, n. 3, p. 593–602, fev. 1978. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(78\)90420-8](https://doi.org/10.1016/0304-4165(78)90420-8).

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>

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>

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>

SIMOMUKAY, Elton; DALBERTO, Bianca T.; BALDASSARI, Lucas L.; et al. *Engenharia Bioquímica. Grupo A*, 2022. E-book. ISBN 9786556901732. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9786556901732/>. Acesso em: 19 jun. 2024.

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