



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



**PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA:
ENRIQUECIMENTO NUTRICIONAL E INFLUÊNCIA DA
LUMINOSIDADE**

Isadora Torres de Souza

Uberlândia – MG

2017



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



**PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR FERMENTAÇÃO ANAERÓBIA:
ENRIQUECIMENTO NUTRICIONAL E INFLUÊNCIA DA LUMINOSIDADE**

Isadora Torres de Souza

Orientadora: **Profa. Dra. Fabiana R. Xavier Batista**

Co-orientadora: **Profa. Dra. Vicelma Luiz Cardoso**

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

Uberlândia – MG

2017

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

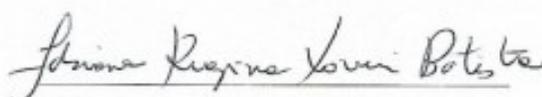
- S729p
2017
- Souza, Isadora Torres de, 1992-
Produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia [recurso eletrônico] : enriquecimento nutricional e influência da luminosidade / Isadora Torres de Souza. - 2017.
- Orientadora: Fabiana Regina Xavier Batista.
Coorientadora: Vicelma Luiz Cardoso.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.1184>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.
1. Engenharia química. 2. Fermentação. 3. Bactérias. 4. Hidrogênio.
I. Batista, Fabiana Regina Xavier (Orient.). II. Cardoso, Vicelma Luiz (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

CDU: 66.0

Maria Salete de Freitas Pinheiro - CRB6/1262

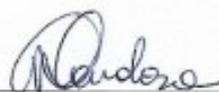
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ISADORA TORRES DE SOUZA
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA
QUÍMICA, EM 28 DE JULHO DE 2017

BANCA EXAMINADORA



Profª. Drª. Fabiana Regina Xavier Batista

Orientadora (PPGEQ/UFU)



Profª. Drª. Vicelma Luiz Cardoso

Co-orientadora (PPGEQ/UFU)



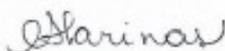
Profª. Drª. Juliana de Souza Ferreira

(FEQU/UFU)



Profª. Drª. Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros

(FEQU/UFU)



Pesquisadora Drª. Cristiane Sanchez Farinas

(EMBRAPA)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus e a Nossa Senhora Aparecida por abençoarem o meu trabalho e por colocarem pessoas iluminadas em minha vida.

Aos meus pais, Carlos e Renata, pelo amor incondicional e ensinamentos ao longo da vida. Muito obrigada por acreditarem em mim e não medirem esforços para que eu realizasse meus sonhos! Sem vocês essa conquista não seria possível, espero um dia poder retribuir toda dedicação.

À minha irmã, Geovana, pela amizade e incentivos em todos os momentos. Obrigada, por mesmo longe me proporcionar longas conversas e palavras de otimismo.

Ao Ricardo por ser meu grande incentivador em seguir a área acadêmica. Obrigada, pela amizade e carinho.

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Fabiana Regina Xavier Batista, pela confiança em meu trabalho e por todos os conhecimentos transmitidos. Obrigada, por sua dedicação, apoio e incentivo nos momentos difíceis!

À Prof^ª. Dr^ª. Vicelma Luiz Cardoso pela colaboração no desenvolver deste estudo. Obrigada por todas sugestões feitas.

Aos alunos do NUCBIO pelas conversas, conselhos e apoio no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Ao meu amigo e colega de pesquisa, Felipe Moreira, por compartilhar seus conhecimentos e experiências essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais amigos por todo apoio ao longo desta jornada.

Aos alunos de iniciação científica, Daniela, Gabriela e Erisson pela ajuda e comprometimento com o trabalho. Obrigada pelas horas de dedicação para que esse trabalho pudesse evoluir.

A todos os professores, funcionários e colegas do laboratório que também foram os essenciais pela realização do trabalho.

Aos órgãos de fomento CNPq, Fapemig, CAPES e Vale pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. A Matriz Energética.....	4
3.2. Os Biocombustíveis	5
3.3. O Hidrogênio	6
3.4. A Produção Biológica de Hidrogênio	7
3.4.1. Biofotólise da Água	9
3.4.1.1. Biofotólise Direta.....	9
3.4.1.2. Biofotólise Indireta	10
3.4.2. A Fermentação Escura.....	10
3.4.3. A Fotofermentação	13
3.4.4. O Sistema Híbrido	14
3.5. Fatores que Influenciam a Produção Biológica de Hidrogênio	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1. Microrganismos e meios de cultivo	21
4.2. Substratos.....	22
4.3. Condições para a fermentação	23
4.3.1. Fermentação em reator de 50 mL	23
4.3.2. Fermentação em reator de 1,5 L	26
4.4. Metodologia Analítica	28
4.4.1. Determinação do crescimento celular.....	28
4.4.2. Quantificação de açúcares e metabólitos.....	29

4.4.3.	Quantificação do hidrogênio.....	29
4.4.4.	Determinação do pH.....	29
4.5.	Determinação dos parâmetros cinéticos:	30
4.5.1.	Taxa de crescimento celular	30
4.5.2.	Tempo de duplicação.....	30
4.5.3.	Taxa de consumo do substrato.....	30
4.5.4.	Produtividade.....	31
4.5.5.	Rendimento.....	31
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1.	Ensaio em reatores de 50 mL.....	32
5.1.1.	Avaliação do inóculo em diferentes condições de fermentação.....	32
5.1.1.1.	<i>Lactobacillus paracasei</i>	32
5.1.1.2.	<i>Enterobacter aerogenes</i>	38
5.1.1.3.	<i>Enterobacter cloacae</i>	45
5.1.2.	Avaliação da influência do tipo de gás inerte na fermentação clara.....	50
5.1.3.	Avaliação do sistema híbrido.....	59
5.2.	Ensaio em reatores de 1,5 L.....	64
6.	CONCLUSÃO.....	74
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	76
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Ciclo do carbono formado com a utilização de biocombustíveis. (Fonte: Adaptado de Fleetcare (2016)).	5
Figura 3.2: Possíveis rotas metabólicas da fermentação escura de carboidratos.	11
Figura 3.3: Representação do sistema híbrido, combinando fermentação escura e fotofermentação. (Fonte: Adaptado de Sikora, Zielenkiewicz (2013)).	15
Figura 4.1: Fluxograma da sequência experimental.	23
Figura 4.2: Fermentação em reatores de 50 mL (a) fermentação escura; (b) fermentação clara	24
Figura 4.3: Reator STR de 1,5 L utilizado na fermentação em escala ampliada.	27
Figura 4.4: Fermentação escura em reator de 1,5 litros.	28
Figura 5.1: Perfil da densidade celular para <i>L. paracasei</i> em função do tempo de fermentação com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.	33
Figura 5.2: Perfil da concentração de açúcar para <i>L. paracasei</i> em função do tempo de fermentação com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.	34
Figura 5.3: Comportamento do pH para <i>L. paracasei</i> em função do tempo de fermentação com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.	35
Figura 5.4: Concentração de ácido acético em função do tempo de fermentação para a <i>L. paracasei</i> com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.	36
Figura 5.5: Concentração de ácido acético em função do tempo de fermentação para a <i>L. paracasei</i> com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.	36
Figura 5.6: Concentração de ácido butírico em função do tempo de fermentação para a <i>L. paracasei</i> com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.	37
Figura 5.7: Concentração de ácido lático em função do tempo de fermentação para a <i>L. paracasei</i> com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.	37

Figura 5.8: Perfil da densidade celular para <i>E. aerogenes</i> em função do tempo de fermentação com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.....	39
Figura 5.9: Perfil da concentração de açúcar para <i>E. aerogenes</i> em função do tempo de fermentação com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.....	40
Figura 5.10: Comportamento do pH para <i>E. aerogenes</i> em função do tempo de fermentação com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.....	41
Figura 5.11: Concentração do ácido acético para <i>E. aerogenes</i> em função do tempo de fermentação com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.....	42
Figura 5.12: Concentração do ácido butírico para <i>E. aerogenes</i> em função do tempo de fermentação com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.....	42
Figura 5.13: Produtividade de hidrogênio em função do tempo de fermentação para a <i>E. aerogenes</i> com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.....	44
Figura 5.14: Perfil da densidade celular para <i>E. cloacae</i> em função do tempo de fermentação com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.....	45
Figura 5.15: Perfil da concentração de açúcar para <i>E. cloacae</i> em função do tempo de fermentação com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.....	46
Figura 5.16: Comportamento do pH para <i>E. cloacae</i> em função do tempo de fermentação com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.....	47
Figura 5.17: Concentração do ácido acético para <i>E. cloacae</i> em função do tempo de fermentação com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.....	47

Figura 5.18: Concentração do ácido butírico para <i>E. cloacae</i> em função do tempo de fermentação com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.....	48
Figura 5.19: Produtividade de hidrogênio em função do tempo de fermentação para a <i>E. cloacle</i> com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.....	49
Figura 5.20: Perfil da densidade celular para <i>E. aerogenes</i> em função do tempo de fermentação com o gás inerte argônio; (▶) Glicose_Claro e (◆) Lactose_claro.	51
Figura 5.21: Perfil da concentração de açúcar para <i>E. aerogenes</i> em função do tempo de fermentação com o gás inerte argônio; (▶) Glicose_Claro e (◆) Lactose_claro.	51
Figura 5.22: Comportamento do pH para <i>E. clacae</i> em função do tempo de fermentação com o gás inerte argônio; (▶) Glicose_Claro e (◆) Lactose_claro.	52
Figura 5.23: Concentração do ácido acético para <i>E. aerogenes</i> em função do tempo de fermentação com o gás inerte argônio; (▶) Glicose_Claro e (◆) Lactose_claro.	52
Figura 5.24: Concentração do ácido butírico para <i>E. aerogenes</i> em função do tempo de fermentação com o gás inerte argônio; (▶) Glicose_Claro e (◆) Lactose_claro.	53
Figura 5.25: Produtividade de hidrogênio em função do tempo de fermentação para a <i>E. aerogenes</i> com o gás inerte argônio; (▶) Glicose_Claro, (◆) Lactose_claro.	54
Figura 5.26: Perfil da densidade celular para <i>E. cloacae</i> em função do tempo de fermentação com o gás inerte argônio; (▶) Glicose_Claro e (◆) Lactose_claro.	55
Figura 5.27: Perfil da concentração de açúcar para <i>E. cloacae</i> em função do tempo de fermentação com o gás inerte argônio; (▶) Glicose_Claro e (◆) Lactose_claro.	56
Figura 5.28: Comportamento do pH em função do tempo de fermentação para a <i>E. cloacae</i> com o gás inerte argônio; (▶) Glicose_Claro e (◆) Lactose_claro.	56
Figura 5.29: Concentração do ácido acético para <i>E. cloacae</i> em função do tempo de fermentação com o gás inerte argônio; (▶) Glicose_Claro e (◆) Lactose_claro.	57
Figura 5.30: Concentração do ácido butírico para <i>E. cloacae</i> em função do tempo de fermentação com o gás inerte argônio; (▶) Glicose_Claro e (◆) Lactose_claro.	57
Figura 5.31: Produtividade de hidrogênio em função do tempo de fermentação para a <i>E. cloacae</i> com o gás inerte argônio; (▶) Glicose_Claro e (◆) Lactose_claro.....	59

Figura 5.32: Perfil da densidade celular para <i>E. cloacae</i> em função do tempo para a fermentação clara utilizando o efluente da fermentação; (■) Efluente bruto, (●) Efluente + Glicose e (▲) Efluente + Glicose + <i>E. cloacae</i> .	60
Figura 5.33: Perfil do consumo de açúcar para <i>E. cloacae</i> em função do tempo para a fermentação utilizando o efluente da fermentação escura; (■) Efluente, (●) Efluente + Glicose e (▲) Efluente + Glicose + <i>E. cloacae</i> .	60
Figura 5.34: Comportamento do pH para <i>E. cloacae</i> em função do tempo para a fermentação utilizando o efluente da fermentação escura; (■) Efluente, (●) Efluente + Glicose e (▲) Efluente + Glicose + <i>E. cloacae</i> .	61
Figura 5.35: Concentração do ácido acético para <i>E. cloacae</i> em função do tempo de fermentação com o gás inerte argônio; (■) Efluente, (●) Efluente + Glicose e (▲) Efluente + Glicose + <i>E. cloacae</i> .	62
Figura 5.36: Concentração do ácido butírico para <i>E. cloacae</i> em função do tempo de fermentação com o gás inerte argônio; (■) Efluente, (●) Efluente + Glicose e (▲) Efluente + Glicose + <i>E. cloacae</i> .	62
Figura 5.37: Produtividade de H ₂ para <i>E. cloacae</i> em função do tempo para a fermentação utilizando o efluente da fermentação escura; (■) Efluente, (●) Efluente + Glicose e (▲) Efluente + Glicose + <i>E. cloacae</i> .	64
Figura 5.38: Perfil da densidade celular para fermentação escura (<i>E. cloacae</i> , reator de 1,5 L).	65
Figura 5.39: Perfil da concentração de glicose para fermentação escura (<i>E. cloacae</i> , reator de 1,5 L).	65
Figura 5.40: Comportamento do pH para a fermentação escura com <i>E. cloacae</i> em reator de 1,5 L.	66
Figura 5.41: Concentração de ácido acético na fermentação escura (<i>E. cloacae</i> , reator de 1,5 L).	66
Figura 5.42: Concentração de ácido butírico na fermentação escura (<i>E. cloacae</i> , reator de 1,5 L).	67
Figura 5.43: Concentração de ácido lático na fermentação escura (<i>E. cloacae</i> , reator de 1,5 L).	68
Figura 5.44: Concentração de ácido propiônico na fermentação escura (<i>E. cloacae</i> , reator de 1,5 L).	68

Figura 5.45: Concentração de etanol na fermentação escura (<i>E. cloacae</i> , em reator de 1,5 L).	69
Figura 5.46: Concentração de ácido acético na fermentação escura (<i>E. cloacae</i> , reator de 1,5 L).	69
Figura 5.47: Perfil da densidade celular para a fermentação clara com <i>E. cloacae</i> em reator de 1,5 L; (■) Efluente concentrado, (●) Efluente diluído.....	71
Figura 5.48: Perfil do consumo de açúcar para a fermentação clara com <i>E. cloacae</i> em reator de 1,5 L; (■) Efluente concentrado, (●) Efluente diluído.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Aplicações do hidrogênio na indústria	7
Tabela 3.2: Microrganismos, vantagens e desvantagens para a produção de H ₂	8
Tabela 4.1: Composição do meio Caldo Nutriente (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).....	21
Tabela 4.2: Composição do meio <i>Lactobacillus</i> MRS (DEMAN; ROGOSA; SHARPE, 1960).	22
Tabela 4.3: Características do permeado de soro de queijo da Empresa Sooro Concentrado Indústria de Produtos Lácteos Ltda.	22
Tabela 4.4: Ensaio em reatores de 50 mL com avaliação de microrganismos, substratos e condições de luminosidade com borbulhamento do gás inerte nitrogênio.....	24
Tabela 4.5: Ensaio em reatores de 50 mL com avaliação do gás inerte argônio.	25
Tabela 4.6: Ensaio da fermentação híbrida realizada em reatores de 50 mL utilizando o efluente da fermentação escura.....	26
Tabela 5.1: Taxa de crescimento, tempo de duplicação e consumo de substrato para <i>L.</i> <i>paracasei</i>	33
Tabela 5.2: Taxa de crescimento, tempo de duplicação e consumo de substrato para <i>E.</i> <i>aerogenes</i>	39
Tabela 5.3: Concentração inicial e final do ácido lático, ácido propiônico e etanol nos ensaios com <i>E. aerogenes</i>	43
Tabela 5.4: Taxa de crescimento, tempo de duplicação e consumo de substrato para <i>E.</i> <i>Cloacae</i>	45
Tabela 5.5: Concentração inicial e final do ácido lático, ácido propiônico e etanol para <i>E.cloacae</i>	48
Tabela 5.6: Concentração inicial e final do ácido lático, ácido propiônico e etanol para <i>E.</i> <i>aerogenes</i> com o gás inerte argônio.	53
Tabela 5.7: Concentração inicial e final do ácido lático, ácido propiônico e etanol para <i>E.</i> <i>cloacae</i> com o gás inerte argônio.	58
Tabela 5.8: Concentração inicial e final do ácido lático, ácido propiônico e etanol para <i>E.</i> <i>cloacae</i> em sistema híbrido.	63
Tabela 5.9: Tabela comparativa dos dados apresentados neste trabalho.....	72

RESUMO

O hidrogênio é considerado como um dos portadores de energia mais promissores, o que se deve à sua alta eficiência de conversão em energia. Neste sentido, a investigação intensiva da produção sustentável de hidrogênio atrai cada vez mais pesquisadores. No presente trabalho, estudou-se o potencial produtor de hidrogênio das bactérias *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae* variando-se parâmetros operacionais. As fermentações realizadas em batelada avaliaram a influência da luz e das fontes de carbono, glicose e permeado do soro de leite. Além disso, também foi verificada a influência dos gases inertes nitrogênio e argônio na fermentação clara para as bactérias produtoras de hidrogênio. Na primeira etapa deste trabalho, os ensaios realizados ocorreram em reatores de 50 mL com duração de 108 horas. Para a *E. aerogenes*, o substrato foi a variável que mais influenciou a fermentação. O volume de hidrogênio obtido utilizando glicose como substrato foi superior à fermentação com permeado de soro de queijo, sendo que as melhores condições fermentação dos respectivos substratos geraram 3,18 e 0,86 mmol de H₂. Verificou-se também que a incidência de luz gerou resultados positivos, sendo o rendimento da fermentação com glicose na presença e ausência de luz foi de 1,51 e 0,94 mols H₂/mol de hexose, respectivamente. Entretanto, para *E. cloacae*, a influência do substrato e da iluminação foram menos expressivas. Na fermentação escura os rendimentos para glicose e lactose foram de 1,60 e 1,39 mols H₂/mol de hexose, respectivamente. Enquanto que, na fermentação clara o rendimento foi equivalente para a glicose e superior em 33% para a lactose, quando comparados a situação escura. Em relação a substituição do gás inerte nitrogênio por argônio, apenas a *E. cloacae* apresentou melhora nos resultados, o que foi observado para ambos os substratos em estudo. O rendimento na presença do gás argônio foi superior em 47% e 37% para glicose e lactose, respectivamente, quando comparados a mesma condição com o gás nitrogênio. Este melhor resultado indica uma mudança na rota metabólica do microrganismo, sendo uma possibilidade a utilização da enzima nitrogenase para a síntese de H₂. Verificando melhores resultados para a *E. cloacae*, o microrganismo foi avaliado na condição de sistema híbrido, em reator de 50 mL. O sobrenadante gerado na fermentação escura pela *E. cloacae* foi utilizado na mesma bactéria na fase clara, o que gerou um rendimento de 2,01 mols de H₂/mol de hexose. O aumento na escala de fermentação para um reator de tanque agitado de 1,50 L foi empregado para *E. cloacaena* condição escura. Neste sistema, a fermentação escura ocorreu por 432 horas, período em que foi observado a produção de biogás. A produtividade máxima obtida com o sistema foi de 110,09 mmol H₂/L·dia e o rendimento de 2,16 mols H₂ mol/mol hexose. A produção de ácidos orgânicos e etanol também foi verificada, sendo o ácido butírico o metabólico com maior expressão no meio. De forma geral, foi verificado que a *E. cloacae* se mostrou mais promissora à produção de hidrogênio utilizando tanto glicose como lactose como fonte de carbono, sendo os resultados deste microrganismo otimizados na presença do gás inerte argônio.

Palavras-chave: Fermentação, bactérias fermentativas, hidrogênio.

ABSTRACT

Hydrogen is considered one of the most promising energy carriers due its high energy conversion efficiency. In this way, the intensive investigation of the sustainable production of hydrogen attracts more and more researchers. In the present work, the potential hydrogen producer by the bacteria *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* was studied for different parameters. The batch fermentations evaluated the influence of light and sources of carbon, glucose and whey permeate. In addition, the influence of inert gases nitrogen and argon in the light fermentation for hydrogen producing bacteria was also verified. The tests were carried out in 50 mL reactors during 108 hours. In the case of *E. aerogenes* the substrate was the variable that most influenced the fermentation. The volume of hydrogen obtained using glucose as substrate was higher than the fermentation with cheese whey permeate, and the best fermentation conditions of the respective substrates generated 3.18 and 0.86. It was also verified that the influence of the light got positive results, being the fermentation yield with glucose in the presence and absence of light of 0.94 and 1.51 mols H₂/mol of hexose, respectively. However, the influence of *E. cloacae* in the substrate and illumination was less expressive. In the dark fermentation the yields for glucose and lactose were 1.60 and 1.39 mols H₂/mol of hexose, respectively. While in the light fermentation the yield was equivalent to glucose and 33% higher for lactose when compared to the dark situation. About the inert gas, only the *E. cloacae* showed improvement in the results. The yield in the presence of argon gas and was higher by 47% and 37% for glucose and lactose, respectively, when compared to the same condition with nitrogen gas. Verifying better results for *E. cloacae*, the microorganism was evaluated in the hybrid system condition in a 50 mL reactor. The effluent generated in the dark fermentation was used in the light phase, which generated a yield of 2.01 mols H₂/mol hexose. The increase in fermentation scale for a stirred tank reactor of 1.5 L was proposed for *E. cloacae*. In this system, the dark fermentation happened for 432 hours while the biogas production was verified, obtaining a maximum yield of 110.09 mmol H₂/L·day and yield of 2.16 mols H₂ mol/mol hexose. In general, *E. cloacae* showed to be more promising for the production of hydrogen using both glucose and lactose as carbon source, and the results of this microorganism were optimized in the presence of inert gas argon.

Keywords: Fermentation, fermentative bacteria, hydrogen.

1. INTRODUÇÃO

O aumento da população mundial e da industrialização nas últimas décadas está atrelado aos problemas de crescimento do consumo energético e de um possível racionamento das principais fontes energéticas utilizadas até o momento, os combustíveis fósseis. Neste cenário, os combustíveis gerados a partir da biomassa renovável como o hidrogênio passam a ser investigados intensivamente como alternativa para a geração de energia limpa (AZADI et al., 2017).

O hidrogênio é visto com uma fonte energética promissora e quando comparado aos demais combustíveis apresenta o maior potencial energético por unidade de peso 120,7 KJ/g (RAMACHANDRAN; MENON, 1998). Embora tecnologias para emprego do hidrogênio já estejam disponíveis em veículos, a oferta do gás como combustível ainda é limitada. A maior parte do hidrogênio comercializado no mundo é destinado a setores da indústria química, alimentícia e farmacêutica.

Dentre as principais tecnologias utilizadas para produção industrial do hidrogênio encontram-se a reforma do gás natural e a gaseificação do carvão, que apresentam como desvantagem a continuação da dependência de combustível não renovável. Além disso, contribuem para a emissão de gases do efeito estufa e demandam altas condições de temperatura e pressão (DINCER; ACAR, 2015). A eletrólise da água é outra metodologia utilizada, porém mesmo com abundância da matéria-prima na natureza o processo demanda alta taxa energética tornando o processo inviável.

Alternativamente às metodologias térmicas, a produção biológica de hidrogênio apresenta-se mais sustentável, pois há a conversão de biomassa orgânica de baixo custo em hidrogênio (URBANIEC; BAKKER, 2015). Entretanto, ainda sem aplicação industrial, faz-se necessário aumentar a eficiência destas rotas para aplicação em larga escala, o que tem levado ao crescente número de pesquisas na área. Microalgas, cianobactérias e bactérias fermentativas e fotossintetizantes são microrganismos estudados a fim de se alcançar o sucesso das rotas biológicas.

Dentre as bactérias fermentativas, as espécies *Enterobacter cloacae* e *Enterobacter aerogenes* são microrganismos com potencial para a produção de H₂. Estes microrganismos são comumente empregados em sistemas denominados de fermentação escura (RAFIEENIA; LAVAGNOLO; PIVATO, 2017). Contudo, a eficiência do sistema ainda é limitada pela ausência do estabelecimento das condições ótimas de parâmetros como pH, temperatura, substrato e luminosidade.

Na fermentação por bactérias a exigência é que os substratos sejam ricos em hidratos de carbono, que servirão como doadores de elétrons para produção de hidrogênio (BUNDHOO; MOHEE, 2016). Uma grande variedade de carboidratos pode ser empregada nas rotas biotecnológicas. Glicose e sacarose, são facilmente degradadas por bactérias fermentativas, entretanto substratos puros representam alto custo para o processo. Uma alternativa a este problema é o emprego de efluentes industriais ricos em carboidratos (TRCHOUNIAN; SAWERS; TRCHOUNIAN, 2017). Neste caso, os resíduos da indústria de queijo apresentam-se como matéria-prima promissora por serem gerados em grandes quantidades e terem lactose como um dos principais componentes (GHIMIRE et al., 2015).

Além da necessidade de diminuição dos custos com matéria-prima, é preciso que o rendimento da fermentação seja potencializado para a produção de hidrogênio. A fermentação escura tem um rendimento teórico máximo de 4 mols de H_2 /mol de hexose, valor que pode ser alterado de acordo com a rota metabólica seguida pela bactéria que poderá sintetizar, além do hidrogênio, etanol e os ácidos láctico, acético, propiônico e butírico (BUNDHOO; MOHEE, 2016). Para aumentar o rendimento, o sobrenadante gerado na fermentação escura rico em metabólitos poderá ser utilizado como fonte de elétrons na fotofermentação por microrganismos fotossintetizantes. Esta associação de dois sistemas fermentativos recebe o nome de sistema híbrido e tem como objetivo o aumento do rendimento do sistema.

Os microrganismos podem ser utilizados tanto na forma de cultura pura, co-cultura ou cultura mista. Quando este último é utilizado, a diversidade de microrganismo no meio será alta. Bactérias do gênero *Lactobacillus* são comumente encontradas nestes inóculos em que ocorre a produção de hidrogênio, mesmo não sendo uma bactéria produtora de hidrogênio é necessário aprofundar os estudos nas influências que este microrganismo pode causar ao meio, para que metodologias de inibição ou fortificação desta cepa sejam realizadas a fim de se otimizar as rotas biológicas produtoras de hidrogênio (PALOMO-BRIONES et al., 2017).

2. OBJETIVOS

O trabalho desenvolvido apresentou como objetivo geral avaliar a produtividade de hidrogênio utilizando as bactérias *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter Cloacae* com a variação de parâmetros operacionais. Dentre os objetivos específicos destacaram-se:

- Avaliar o potencial produtor de hidrogênio das bactérias na fermentação clara e escura com as fontes de carbono glicose e permeado de soro de queijo, sendo a condição de anaerobiose garantida com o gás inerte nitrogênio.
- Estudar a influência da substituição do gás inerte nitrogênio por argônio na fermentação clara com os substratos glicose e permeado de soro de queijo.
- Avaliar a produção de hidrogênio empregando o sistema híbrido, sendo que o efluente gerado na fermentação escura será utilizado pela mesma bactéria na fermentação clara.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. A Matriz Energética

A demanda global de energia tem aumentado rapidamente com o crescimento da população mundial e da economia industrializada. De acordo com *U.S. Energy Information Administration* (2016), o consumo mundial de energia em 2012 foi de 21,6 trilhões de KWh e a expectativa é que esse valor aumente aproximadamente 70% até 2040. Salienta-se que as questões energéticas estão diretamente ligadas a políticas econômicas, uma vez que o desenvolvimento dos países é dependente de uma infraestrutura energética capaz de suprir as necessidades da população e da economia (ZOU et al., 2016).

Os combustíveis fósseis, petróleo e gás natural, são as principais matérias-primas utilizadas para obtenção da energia (BP GLOBAL, 2016). Entretanto, a dependência de fontes energéticas não renováveis leva a situações graves, devido ao limitado estoque de combustível. Apesar da possibilidade de existência de novas reservas, estas serão mais raras, menos acessíveis e terão maiores custos de prospecção e perfuração (DE OLIVEIRA; COELHO, 2017)

Poucas áreas possuem as características geológicas necessárias para a formação e acumulação de quantidades significativas de petróleo, dessa forma, as reservas são distribuídas de forma irregular. Além disso, grande parte desse combustível encontra-se em áreas de instabilidade política e social, como é o caso do Oriente Médio que detêm cerca de 65% das reservas mundiais de petróleo (ESCOBAR et al., 2009). Aliados aos estoques limitados, essas questões aumentam a instabilidade dos preços.

A liberação de gases do efeito estufa na combustão dos combustíveis fósseis é outro problema que têm incentivado a redução na utilização desta fonte energética (KREWITT et al., 2009). Sanções impostas em conferências internacionais, como o Protocolo de Quioto de 1997 e assinado por mais de 50 países, pressionam a redução das emissões de carbono e o desenvolvimento das fontes de energias renováveis (SOLOMON; KRISHNA, 2011). É neste contexto que a utilização de energias renováveis tem se tornado cada vez mais recorrente. Definem-se como energias renováveis aquelas obtidas a partir de recursos naturais que podem ser reestabelecidos pela natureza. Dentre as principais formas, encontram-se a energia hidroelétrica, eólica, solar e os biocombustíveis. Vale ressaltar ainda que todas essas estão sendo alvo de estudos para o desenvolvimento de novas tecnologias que visam o atendimento da demanda energética.

3.2. Os Biocombustíveis

A produção de biocombustíveis teve ascensão com a crise mundial do petróleo na década de 70. De forma geral, estes são fontes energéticas empregadas em motores de combustão interna, podendo ser utilizados puros ou misturados aos combustíveis convencionais. Apresentam-se como uma forma mais limpa de satisfazer as necessidades energéticas, uma vez que participam do ciclo de carbono, no qual o CO₂ liberado durante a combustão pode ser empregado em rotas fotossintéticas (Figura 3.1) (ESCOBAR et al., 2009).

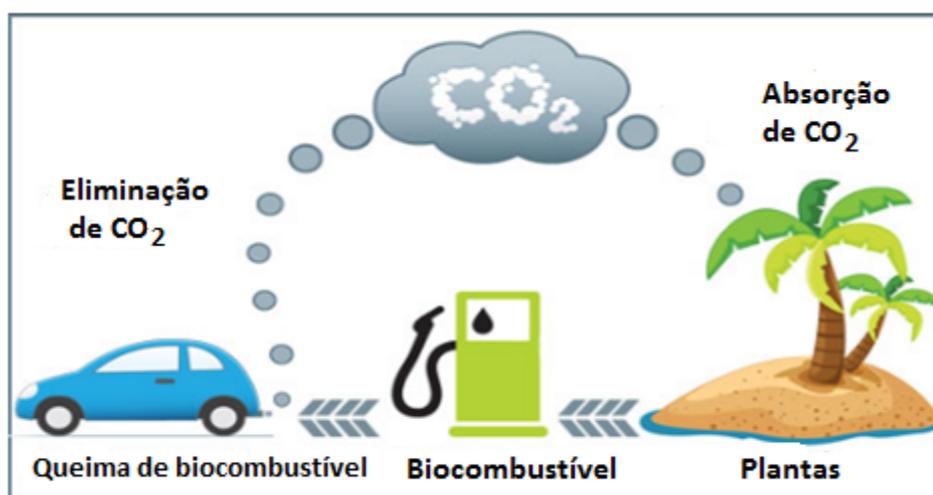


Figura 3.1: Ciclo do carbono formado com a utilização de biocombustíveis. (Fonte: Adaptado de Flectcare (2016)).

Os biocombustíveis podem ser divididos em três gerações de acordo com a natureza da biomassa. A primeira geração, forma mais empregada na produção industrial, utiliza produtos agrícolas ricos em açúcares ou triglicerídeos. Já a segunda e terceira geração, ainda com pouca aplicação industrial, utilizam a biomassa lignocelulósica (resíduo da primeira geração ou resíduos não comestíveis) e a biomassa de rápido crescimento (microalgas rica em óleo ou carboidratos), respectivamente (CARNEIRO et al., 2017).

Atualmente, o etanol e o biodiesel são os principais biocombustíveis produzidos. O etanol pode ser produzido a partir da biomassa que possui quantidades consideráveis de açúcares ou materiais que possam ser convertidos em açúcar, como amido ou celulose. Já o biodiesel é formado por reações de transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais (KUCEK et al., 2007).

Como um país agrícola, o Brasil conseguiu ampliar a produção de matérias-primas e se tornou um dos maiores produtores de biocombustíveis. Cenário que se estabeleceu com o desenvolvimento de políticas como o Pró- Álcool em 1975 e que teve ênfase em 2003 com o desenvolvimento de motores *flex*. O país também é destaque na produção de biodiesel e espera-se que nos próximos anos, 20% de biodiesel seja misturado ao diesel (SOLOMON; KRISHNA, 2011), assim como o álcool é misturado à gasolina.

Entretanto, mesmo com as altas produções, esses biocombustíveis ainda não são capazes de suprir toda demanda energética atual. Dessa forma, é essencial a utilização de combustíveis mais eficientes, como o hidrogênio que possui o maior conteúdo energético por unidade de peso (120kJ/g) quando comparado a outros biocombustíveis (ARGUN et al., 2008).

3.3. O Hidrogênio

Incolor, inflamável e com massa atômica de 1 g/mol, o hidrogênio é o mais leve dos elementos químicos. É um dos elementos mais abundantes e reativos, encontrase constantemente ligado a outros elementos ou ligado entre si formando o gás hidrogênio, H₂, que por ser menos denso que o ar sua concentração na atmosfera é de apenas 0,07% (LOSS, 2011). O gás hidrogênio foi reconhecido e caracterizado pela primeira vez em 1766 por Henry Cavendish, que posteriormente o queimou e verificou que sua combustão produzia água, segundo a Eq. 3.1 (CRUZ, 2010). O H₂ é visto como recurso energético do futuro, entretanto sua produção sustentável em larga escala ainda é um desafio.



Cerca de 50 milhões de toneladas de hidrogênio são comercializadas anualmente no mundo (WINTER, 2005); e grande parte dessa produção é utilizada como reagente químico sendo destinada a setores industriais de insumos químicos, alimentícios, energético (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Aplicações do hidrogênio na indústria

Segmento	Aplicação
Refino de Petróleo	Remoção de enxofre de combustíveis (dessulfurização) hidrocrackeamento
Processos Químicos	Fabricação de Amônia, Metanol, cloro e soda cáustica
Indústria Farmacêutica	Fabricação de sorbitol, utilizado em cosméticos, vitaminas e surfactantes
Indústria Alimentícia	Utilizado na hidrogenação de óleos e no aumento da saturação de gorduras
Processos Metalúrgicos	Agente redutor de minérios metálicos
Indústria Eletrônica	Utilizado no processo de fabricação de semicondutores
Geração de Energia	Utilizado como fonte de energia térmica em queimadores ou como insumo em células combustível

Fonte: Adaptado de Cruz (2010).

Atualmente a maior parte da produção de H_2 é gerada a partir do gás natural, no processo denominado reforma a vapor do gás natural. Outras formas de produção utilizando combustíveis fósseis (carvão, óleo pesado e nafta) também são muito utilizadas e por empregarem matérias-primas não renováveis continuam atreladas aos problemas citados anteriormente, além disso, demandam altas condições de temperatura e pressão e liberam gases do efeito estufa (ARGUN et al., 2008; RAHMAN et al., 2016). Por outro lado, a produção de hidrogênio a partir da água em rotas como hidrólise e fotólise também são alternativas para produção de H_2 , porém, por exigirem altas taxas energéticas tornam a produção inviável. Neste cenário de busca por processos eficientes, a produção biológica se torna cada vez mais explorada.

Além dos desafios da produção sustentável o alto poder de combustão de hidrogênio e sua baixa densidade são desafios para o transporte. O hidrogênio necessita de um sistema de armazenamento de grande volume e pressão, e quando no estado líquido, precisa que o seu armazenamento utilize sistemas criogênicos, ou seja, em baixíssima temperatura ($-253^{\circ}C$) (NAVARRO, 2013)

3.4. A Produção Biológica de Hidrogênio

A produção de hidrogênio por rotas biológicas é uma das metodologias mais promissoras para o futuro. Embora plantas industriais ainda não tenham se tornado realidade para a produção biológica de hidrogênio, o número de pesquisas nessas áreas teve um aumento acentuado (GHIMIRE et al., 2015). Com o estabelecimento de rotas mais eficientes,

essas metodologias podem se tornar mais competitivas em termos de custos por poderem utilizar biomassa de resíduos de baixo custo. Outras vantagens incluem a baixa emissão de gases do efeito estufa e o baixo gasto energético, com a possibilidade de utilização de temperatura e pressão ambientes (HSU; LIN, 2016).

Nos procedimentos biológicos, bactérias e microalgas têm sido relatadas como microrganismos com potencial para a produção de hidrogênio. As rotas metabólicas desses microrganismos utilizam processos fotossintéticos ou fermentativos. Metodologias de biofotólise (direta e indireta), fermentação escura, fotofermentação e sistema híbrido (que consiste na utilização de mais de uma rota biológica) são as principais rotas atualmente investigadas. A

Tabela 3.2 apresenta as vantagens e desvantagens de cada uma das metodologias citadas.

Tabela 3.2: Microrganismos, vantagens e desvantagens para a produção de H₂

Processo	Microrganismo	Vantagens	Desvantagem
Biofotólise direta	Microalgas	Pode produzir H ₂ diretamente a partir da água e luz solar. Alta eficiência na conversão de luz e ciclo isento de carbono	Requer alta intensidade de luz. Síntese de O ₂ que é um inibidor para o sistema.
Biofotólise indireta	Cianobactérias	Pode produzir H ₂ a partir de H ₂ O. Habilidade de fixar N ₂ .	Alto gasto de ATP. Síntese de O ₂ que é um inibidor para o sistema.
Fotofermentação	Bactéria púrpura não sulfurosa	Pode utilizar efluentes ricos em substratos orgânicos.	O ₂ é um inibidor. Necessidade de iluminação constante. CO ₂ presente no gás.
Fermentação	Bactérias anaeróbias	Pode produzir hidrogênio na ausência de iluminação. Diversidade de substratos. Produção de metabólitos intermediários de valor agregado.	Necessita de tratamento do efluente após a fermentação. CO ₂ presente no gás.
Sistema híbrido		Aumento do rendimento da produção de H ₂	Utilização de dois reatores. CO ₂ presente no gás.

Fonte: Adaptado de Rai e Singh, 2016.

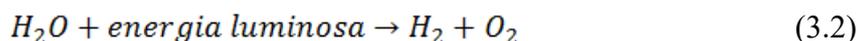
3.4.1. Biofotólise da Água

Na biofotólise a síntese de hidrogênio por microrganismos é resultante do processo fotossintético, que consiste na conversão de energia solar em energia química. O sistema biológico sofre intervenção de luz causando a decomposição do substrato (H₂O) e tornando possível a síntese de H₂, sendo que esse processo pode ocorrer de forma direta ou indireta.

3.4.1.1. Biofotólise Direta

As microalgas são os principais microrganismos utilizados no processo de biofotólise direta da água. As microalgas *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella fusca* e *Scenedesmus obliquus* tem sido relatadas pela literatura como produtoras de hidrogênio por esta rota, que apresenta como uma das principais vantagens a não utilização de carbono orgânico como substrato. O crescimento fotossintético é dependente de CO₂ e de água (NAGARAJAN et al., 2017)

Para que a produção de hidrogênio ocorra é necessário que o sistema opere em fotoperíodo. Inicialmente, a luz fornecerá a energia que será absorvida por pigmentos fotossintéticos no fotossistema II. Este fotossistema absorverá a energia gerando a excitação dos elétrons e a quebra da molécula de H₂O em O₂ e prótons H⁺. Os elétrons seguirão por uma cadeia transportadora de elétrons até que atingir a molécula de ferredoxina, juntamente com os elétrons excitados no fotossistema I. A fase escura é requerida para que a [FeFe] hidrogenase, enzima capaz de catalisar a oxidação reversível do hidrogênio molecular, seja produzida e ativada. Essa enzima combinará os prótons de H⁺ gerados na quebra da molécula de água com os elétrons doados pela ferredoxina, formando assim o hidrogênio molecular (Eq. 3.2) (HALLENBECK e BENEMANN, 2002).

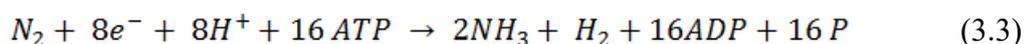


A limitação da biofotólise está relacionada ao acúmulo de oxigênio no meio, uma vez que esse pode reagir com o ferro no centro catalítico inativando a enzima [FeFe] hidrogenase que é muito sensível a presença do O₂. Uma das possibilidades para minimizar esse problema é o controle da pressão parcial de O₂ (HALLENBECK e BENEMANN, 2002).

3.4.1.2. Biofotólise Indireta

A biofotólise indireta é realizada por cianobactérias e assim como a biofotólise direta é depende de um período com incidência de luz e um período de escuro. Alguns exemplos de cianobactérias que realizam esse procedimento são *Nostoc*, *Anabaema*, *Calothrix* e *Oscillatoria* (MONA; KAUSHIK; KAUSHIK, 2011).

Na fase clara, a luz atua como fonte de energia para que o CO₂ sofra reação química com a molécula de água gerando hidratos de carbono (C₆H₁₂O₆) e O₂. Em uma segunda fase anaeróbica e na ausência de luz, os elétrons e prótons gerados serão utilizados para a produção de H₂. Além da fixação de CO₂ pelas células vegetativas, algumas cianobactérias têm a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico em condições anóxicas, através de células especializadas denominadas de heterocistos (MASUKAWA et al., 2014; SILVA, 2015). A enzima nitrogenase na presença de nitrogênio provoca sua redução à amônia gerando gás hidrogênio como subproduto (Eq. 3.3) (LINDBERG et al., 2002; EROGLU; MELIS, 2011). Esta reação tem um alto gasto energético, 16 ATP, e um baixo rendimento de H₂, sendo necessária alimitação de nitrogênio para que os elétrons catalisados pela nitrogenase sejam utilizados na produção de H₂ e o rendimento da biofotólise superior para a produção de hidrogênio.



3.4.2. A Fermentação Escura

Já a produção de hidrogênio por fermentação escura utiliza bactérias fermentativas nas condições de anaerobiose. Durante essa fermentação, as bactérias desintegram os substratos ricos em carboidratos em produtos como hidrogênio, etanol e ácidos orgânicos (RAI; SINGH, 2016). Ressalta-se que a possibilidade de se trabalhar na ausência de luz faz com que essa metodologia se torne vantajosa por possibilitar a utilização de reatores mais simples e economia energética.

Para que a fermentação ocorra são necessárias matérias-primas ricas em carboidratos, como os substratos empregados na fermentação de primeira geração e material lignocelulósico(cana de açúcar, trigo, milho, beterraba). Linhas de pesquisas com vertentes mais sustentáveis têm sido desenvolvidas utilizando resíduos de efluentes agrícolas,

industriais e urbanos, que além de diminuir os custos da matéria-prima auxiliam no tratamento da carga orgânica (TURON et al., 2016).

Um processo fermentativo interessante é a utilização de biomassa de microalgas e cianobactérias como fonte de carboidratos. Estas possuem rápido crescimento e baixo custo de manutenção. Em geral, para a aplicação em rotas de produção de biocombustíveis, a biomassa deve ser submetida à pré-tratamentos para hidrólise de carboidratos e, em seguida, ser fermentada (SAMBUSITI et al., 2015).

Embora diferentes carboidratos possam ser utilizados no processo fermentativo, a representação da rota metabólica utilizando glicose é amplamente aceita na literatura. A Figura 3.2 mostra de forma simplificada as reações bioquímicas até que hidrogênio e/ou metabólitos sejam produzidos.

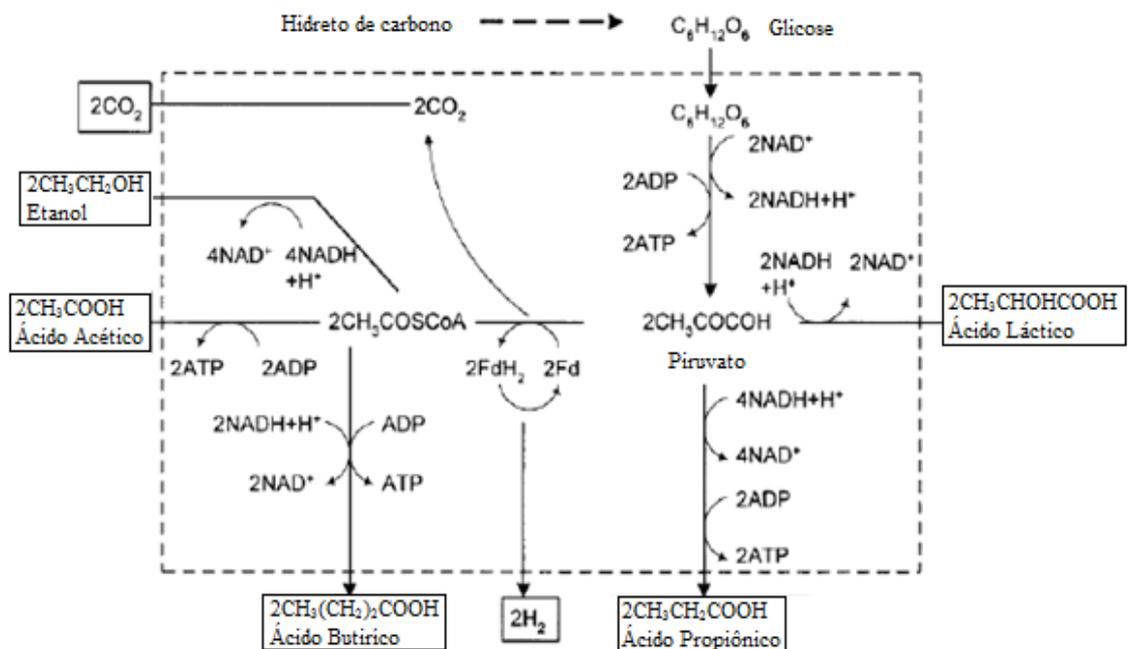
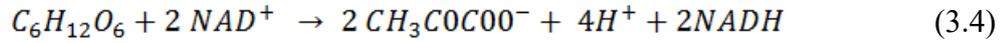


Figura 3.2: Possíveis rotas metabólicas da fermentação escura de carboidratos.

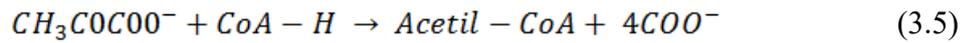
(Fonte: Adaptado de Ren; Wang; Huang, (1997)).

As reações da fermentação escura se dividem em duas etapas: glicólise e redução do ácido pirúvico, que ocorrerão no citoplasma celular conforme explicado por Bundhoo e Mohee (2016). Durante a primeira etapa ocorre a oxidação da glicose que passará por uma série de reações dando origem ao ácido pirúvico. Nesta etapa, também ocorrerá a formação de 2 ATPs e a liberação de quatro elétrons e quatro íons H^+ . Dos quatro íons H^+ , dois ficarão livres no citoplasma, enquanto os outros dois, juntamente aos quatro elétrons, serão

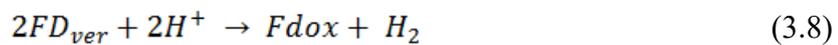
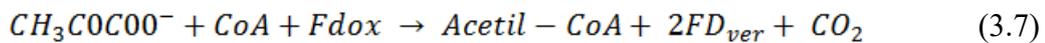
capturados pelo dinucleotídio de nicotinamida-adenina (NAD^+) e formarão o NADH (Eq. 3.4).



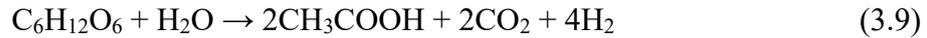
O piruvato é um produto intermediário da fermentação escura e poderá ser anaerobicamente oxidado a acetil-coenzima A (Acetil-CoA) ou formar os ácidos láctico ou propiônico. O processo de oxidação dependerá da bactéria e das condições do sistema podendo seguir duas vias metabólicas: piruvato liase (PFL) ou piruvato ferredoxina – redutase (PFOR). Pela rota do piruvato liase, o piruvato será degradado pela ação da coenzima A (CoA-H) que origina a acetil-CoA e o formiato (Eq. 3.5), que em condições ácidas ativará a liase de hidrogênioformiato (FHL), sendo o ácido fórmico convertido em CO_2 e H_2 (Eq. 3.6).



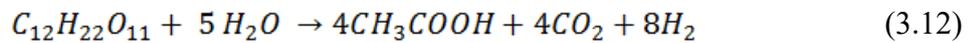
Já pela rota do piruvato ferredoxina redutase (PFOR), o piruvato é oxidado por ação da coenzima A (CoA-H) e a ferredoxina oxida-se (Fdox) para acetil-CoA, ferredoxina redutase (Fdver) e CO_2 (Eq. 3.7). A ferredoxina redutase reduz os íons H^+ para H_2 e é oxidado para Fdox (Eq. 3.8).



O NADH residual gerado como subproduto pode ser re-oxidado para produzir H_2 , produção que poderá ter diferentes rendimentos de acordo com o produto gerado pela reação da Acetil-CoA (Eq. 3.9, 3.10 e 3.11). Caso o ácido acético seja um dos produtos finais, 4 mols de H_2 /mol de glicose poderão ser formados, mas se o etanol for produzido junto com o ácido acético a produção será de 2 mols de H_2 /mol de glicose. O mesmo rendimento pode ser observado caso o ácido butírico seja o produto final.



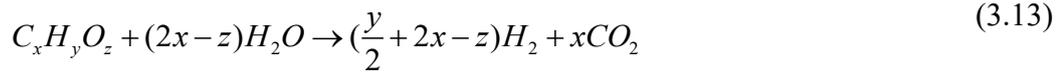
A lactose é outra fonte de carbono com potencial a ser explorado pelas rotas de produção de hidrogênio, uma vez que o rendimento teórico da fermentação pode alcançar até 8 mols de H_2 /mol de lactose (Eq. 3.12). Uma das vantagens desse substrato é a possibilidade de redução de custos com a matéria-prima, visto que pode ser obtida a partir de resíduos do soro de queijo (MORENO et al., 2015).



É essencial ressaltar ainda a impossibilidade das rotas fermentativas atingirem os rendimentos teóricos descritos, uma vez que parte dos substratos é utilizado na manutenção e no crescimento do microrganismo, ou ainda, utilizados em rotas que não levam a formação de hidrogênio.

3.4.3. A Fotofermentação

Bactérias fotossintetizantes são relatadas pela literatura como produtoras de hidrogênio a partir de hidratos de carbono em reações dependentes de luz (HALLENBECK; ABO-HASHESH; GHOSH, 2012). Estes microrganismos produzem o hidrogênio molecular catalisado pela enzima nitrogenase sob condições anaeróbicas deficientes de N_2 (MASEPOHL; HALLENBECK, 2010). Eroglu e Melis (2011) relatam que bactérias fotossintetizantes possuem um potencial promissor para produção de hidrogênio devido à capacidade elevada de taxa de conversão de substratos e a flexibilidade de substratos orgânicos que podem ser convertidos no produto alvo. Na Eq. 3.13, Loss (2011) apresenta a quantidade teórica de hidrogênio que poderia ser obtida através de hidratos de carbono no processo fotofermentativo.



Diferentemente das cianobactérias, as bactérias fermentativas possuem apenas o fotossistema I, que reduz $NADP^+$ a $NADPH$. Com a ausência do fotossistema II, as células não possuem mecanismo para a quebra da molécula de água, apresentando a vantagem de não gerar moléculas de O_2 que é um inibidor da enzima nitrogenase, catalisadora da produção de hidrogênio. Entretanto, sem a hidrólise da água, uma deficiência de elétrons para a geração de hidrogênio pode ser verificada (SAKURAI et al., 2013).

Em condições anaeróbicas, os ácidos orgânicos obtidos na fermentação escura podem ser utilizados como doares de elétrons para a produção de H_2 , conforme representado nas Eq. 3.14 a 3.17 (BARBOSA et al., 2001). A integração desses dois sistemas tem sido largamente estudada por acarretar o aumento da produtividade e diminuição de custos.

Ácido acético:



Ácido láctico:



Ácido propiônico



Ácido butírico



3.4.4. O Sistema Híbrido

Embora efluentes de processos industriais ricos em compostos orgânicos tenham sido largamente estudados como substrato na produção de hidrogênio, um crescente interesse tem sido observado no desenvolvimento de estudos sobre a interação entre processos de fermentação escura e clara. Denominados de sistemas híbridos, o efluente da fermentação escura serve como substrato para uma segunda etapa microbiológica para a produção de hidrogênio. A integração desses dois sistemas tem apresentado resultados positivos, uma vez que os efluentes são ricos em ácidos orgânicos e podem atuar como substrato para bactérias produtoras de hidrogênio (ARGUN et al., 2008).

O sistema híbrido faz com que as etapas de produção de hidrogênio se tornem complementares, sendo que essa integração pode ocorrer em um ou dois estágios. Grande parte dos estudos considera a separação do processo em dois estágios (Figura 3.3), o que permite a aplicação de condições ótimas de operação para cada sistema. Em muitos casos, a transição das fases exige que um pré-tratamento seja realizado para eliminação da biomassa da fase escura e diluição do substrato. Entretanto, a divisão das etapas exige a manutenção de dois biorreatores acarretando no aumento de custos (RAI; SINGH, 2016).

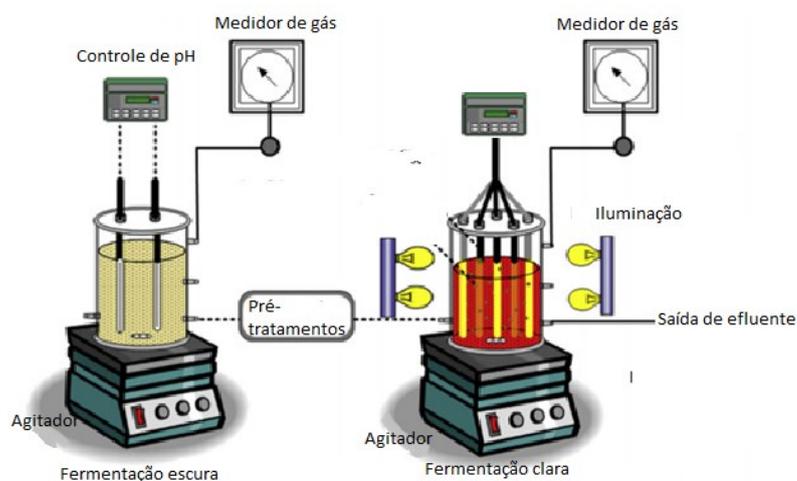


Figura 3.3: Representação do sistema híbrido, combinando fermentação escura e fotofermentação. (Fonte: Adaptado de Sikora, Zielenkiewicz (2013)).

Embora a fermentação simultânea de bactérias fermentativas e fotofermentativas ocorrendo em um mesmo biorreator seja menos descritas pela literatura, Rai e Singh (2016) relatam que esta integração pode acarretar na otimização do processo e dos custos. Com esse processo seria evitado o pré-tratamento de mudança de estágio e o ajuste constante do pH, uma vez que os ácidos produzidos poderiam ser simultaneamente consumidos pelas bactérias fotofermentativas. Além disso, o tempo de fermentação seria reduzido e o rendimento de hidrogênio aumentado.

A utilização de sistemas híbridos pode resultar em rendimentos teóricos de até 12 mol H_2 /mol de glicose (EROGLU; MELIS, 2011). Esse valor pode ser obtido caso o ácido acético fosse o subproduto da fermentação escura, que tem como rendimentos 4 mol H_2 /mol de glicose e convertidos na fase clara, gerando 8 mols de H_2 . Contudo, como já dito em tópicos anteriores, esse rendimento teórico não é obtido devido à utilização das fontes de carbono nas taxas de crescimento e nas rotas metabólicas que não levam a formação de hidrogênio.

3.5. Fatores que Influenciam a Produção Biológica de Hidrogênio

Os principais desafios para utilização de rotas bioquímicas em plantas industriais estão relacionados à sustentabilidade econômica do processo que ainda é limitada pela baixa produtividade de hidrogênio. A otimização de parâmetros essenciais como inóculo, temperatura, pH, substrato e pressão parcial de H₂ ainda estão em fase de desenvolvimento.

Um grande número de microrganismos pode ser empregado nas rotas de produção de hidrogênio. Entretanto, a definição do inóculo desempenha um papel fundamental na eficiência do processo, uma vez que os produtos finais são influenciados pelo metabolismo bacteriano. Os sistemas de cultivo encontrados na literatura se dividem em puros, co-cultura e culturas mistas.

A utilização de apenas um microrganismo nas rotas produtoras de hidrogênio representa o sistema de culturas puras. *Clostridium* e *Enterobacter* são alguns dos microrganismos com potencial produtivo que tem sido estudado nessas condições. Esse sistema apresenta como uma das principais vantagens a revelação de informações importantes sobre o metabolismo de cada microrganismo, bem como o seu comportamento em relação a diferentes substratos. Em sistemas de cultura pura as alterações metabólicas são mais facilmente detectadas devido à reduzida diversidade da biomassa (ELSHARNOUBY et al., 2013). Apesar das vantagens citadas, esse sistema apresenta como desvantagem a necessidade de cuidados especiais com a esterilização e fontes limitadas de substratos (LEE; SHOW; SU, 2011).

Na forma de co-cultura o meio é enriquecido com mais de uma espécie de bactéria gerando um efeito sinestésico. Vários estudos relatam que, do ponto de vista técnico, este sistema apresenta melhores resultados quando comparados a culturas puras devido à melhora na hidrólise de açúcares complexos e por fornecer uma gama mais ampla de pH para bactérias fermentarem e produzirem hidrogênio (ELSHARNOUBY et al., 2013). Uma forma interessante de co-cultura é a associação de bactérias fermentativas produtoras de ácidos orgânicos e bactérias consumidoras desses metabólitos. Nesse sistema, os ácidos se tornariam matéria-prima para a produção do hidrogênio evitando grandes variações de pH e a intoxicação do meio por ácidos, que em grandes quantidades são um inibidor para as bactérias fermentativas (LU et al., 2007).

Solo e lodo de efluentes são alguns dos ambientes em que uma grande mistura de bactérias pode ser encontrada, dentre os quais bactérias fermentativas. Assim, estes materiais podem ser utilizados como fonte de inóculo para o processo fermentativo no processo denominado de cultura mista (KUMAR et al., 2017). Algumas pesquisas indicam que culturas mistas aceitam uma maior variedade de substratos, tem melhor adaptação ao meio de cultivo e maior eficiência de produção de hidrogênio. Entretanto, bactérias consumidoras de hidrogênio podem estar presentes no inóculo o que se torna uma desvantagem do processo. Os principais consumidores de H₂ incluem metanogênios, bactérias homoacetogênicas e bactérias redutoras de sulfato (GHIMIRE et al., 2015).

Visando a eliminação dos microrganismos indesejáveis na cultura mista e aumento da eficiência na produção de hidrogênio, muitos trabalhos relatam a aplicação de pré-tratamentos, sendo que os mais descritos pela literatura são: térmicos, ácidos ou básicos (LI; FANG, 2007). De acordo com Wong; Wu e Juan (2014) os microrganismos formadores de esporos tem maior chance de sobreviver quando sofrem algum processo previamente a fermentação, enquanto algumas espécies metanogênicas podem ser eliminadas em pH inferior a 6 ou superior a 7,8. Contudo, a aplicação desses pré-tratamentos precisa ser precisamente avaliada para evitar que microrganismos produtores de hidrogênios sejam extintos do meio (GHIMIRE et al., 2015).

Com o crescente interesse pela produção biológica de hidrogênio algumas bactérias do gênero *Enterobacter* passaram a ser estudadas devido ao possível potencial produtor do gás de interesse. *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae* são alguns dos representantes desse grupo formado por microrganismos anaeróbicos facultativos, gram-negativos em forma de bastonete (KUMAR; DAS, 2000). As vantagens desses microrganismos em rotas de produção incluem a rápida taxa de crescimento e baixo custo de manutenção.

Por outro lado, conhecidas pelo potencial produtor de ácido láctico, as bactérias do gênero *Lactobacillus* são formadas por mais de 400 espécies de microrganismos gram-positivos (SIKORA et al., 2013). Embora não sejam produtoras de hidrogênio, a utilização em processos fermentativos com esta finalidade é relatada pela literatura. Pesquisas com aplicação dos sistemas de co-cultura e sistema híbrido tem como principal objetivo que a *Lactobacillus* produza ácido láctico e que este metabólito seja utilizado por bactérias em rotas de produção de hidrogênio, como é o caso das bactérias fotofermentativas (ASADA et al., 2006).

Ainda em se tratando de condições essenciais à produção de H₂, meios de cultivo ricos em carbono são efetivos para a produção bacteriológica deste biocombustível. Glicose, isômeros de hexoses ou polímeros como amido e celulose são largamente descritos pela literatura como potenciais matérias-primas na síntese de hidrogênio. Contudo, a utilização de diferentes substratos pode acarretar em variações significativas na síntese do hidrogênio (BOODHUN et al., 2017).

Glicose e sacarose são comumente empregadas como fonte de açúcar para a produção de hidrogênio por bactérias. Apesar dos bons resultados obtidos a eficiência econômica do processo com esses substratos pode ser ameaçada devido aos altos investimentos na matéria-prima. Matérias-primas de baixo custo e abundantes podem estar contidas em resíduos de indústrias de alimentos, papel e biocombustíveis. Estes materiais são ricos em compostos orgânicos e poder ser utilizados como substrato na produção biológica de hidrogênio. Além da queda nos custos, essa aplicação auxiliaria no tratamento dos efluentes que precisam passar por tratamentos antes de serem despejados na natureza, como acontece com o soro do leite gerado na produção de queijo. Os resíduos de soro do leite são uma potencial matéria-prima por conter a lactose disponível no meio (FERCHICHI et al., 2005; YANG et al., 2007; DAVILA-VAZQUEZ et al., 2008). De acordo com Ozmihci e Kargi (2007), a concentração de lactose no efluente é estimada em torno de 6% m/v e para melhores rendimentos na produção de hidrogênio o efluente deverá passar por tratamentos químicos para concentração do açúcar na forma de pó. Além da estrutura, a concentração dos carboidratos tem papel fundamental no processo fermentativo como apresentado no trabalho Romão (2014). Além das fontes de açúcar, o meio também deve conter outros elementos essenciais como macronutrientes e micronutrientes, uma vez que estes ajudam no desenvolvimento do metabolismo bacteriano, no crescimento celular e na ativação de enzimas relacionadas à produção de hidrogênio (BUNDHOO; MOHEE, 2016).

De forma complementar, por estar diretamente relacionado a vias metabólicas, o pH é uma parte fundamental no processo da produção de hidrogênio. As principais influências do pH estão relacionadas a composição do biogás, o teor de ácidos orgânicos e a taxa de crescimento do microrganismo (HWANG et al., 2004). Embora muitos estudos relatem que a produção de hidrogênio ocorre em intervalos de pH entre 5 e 8, é difícil propor um valor exato que resulte em uma maior produtividade de hidrogênio, pois este parâmetro está atrelado às condições do meio de cultura e as características do inóculo (FANG; LIU, 2002;

SHIN; YOUN; KIM, 2004). Contudo, para culturas isoladas, propõe valores em torno de 6,5 (PACHAPUR *et al.*, 2015).

Ressalta-se que na etapa inicial o pH irá afetar a duração da fase *lag* e a síntese de enzimas. Durante a fermentação escura este valor tende a apresentar variações devido à produção de ácidos orgânicos ao longo do processo (SIVAGURUNATHAN *et al.*, 2017). O controle do pH é uma maneira de se evitar que a acidez possa inibir a ação da hidrogenase (FANG; LIU, 2002). Sem a correção, o pH final pode atingir valores na faixa de 4 a 4,8, independentemente do valor inicial (KUMAR *et al.*, 2017).

Já a temperatura tem papel fundamental para as bactérias produtoras de hidrogênio, pois pode atuar acelerando ou inibindo o metabolismo celular. A determinação das temperaturas pode ser feita inicialmente com base no grupo térmico em que a bactéria se encontra, que se dividem em: mesófila (25-40°C), termófila (50-65°C), termofílica (65-80°C) ou hipertermófila (> 80°C) (KUMAR *et al.*, 2017). A maioria dos processos estudados até o momento relatou a utilização de microrganismos mesófilos, entretanto, a temperatura ideal para aumento do rendimento do sistema deve ser avaliada individualmente para cada processo.

Nos sistemas em que microalgas, cianobactérias e bactérias fotossintéticas são empregadas para a produção de hidrogênio a luminosidade tem papel essencial na fermentação. A luz promove a energia necessária para o desencadeamento de um gradiente de prótons no metabolismo do microrganismo (HALLENBECK; LIU, 2016). A dependência deste parâmetro é vista como uma desvantagem por potencializar os custos da fermentação.

Em relação às bactérias fermentativas, a influência da luz foi pouco relatada pela literatura (ZAGRODNIK; LANIECKI, 2016). Entretanto, sabe-se que os metabólitos gerados por estas bactérias podem ser utilizados por bactérias fotofermentativas com o intuito de aumentar os rendimentos do processo (MASEPOHL; HALLENBECK, 2010). Desta forma, é essencial que um estudo dos efeitos da luminosidade em bactérias fermentativas seja realizado para que a formação de uma co-cultura híbrida, onde ambas as fermentações ocorram simultaneamente, possam ser aprofundados. A formação deste sistema poderia possibilitar a redução do tempo de fermentação e aumento da produtividade de hidrogênio (ZAGRODNIK; LANIECKI, 2016)



4. MATERIAL E MÉTODOS

Neste tópico está estruturada a metodologia e os materiais utilizados para os experimentos da produção biológica de hidrogênio.

4.1. Microrganismos e meios de cultivo

Neste estudo foram utilizadas culturas puras das bactérias *Enterobacter aerogenes* (CT) ATCC 13048, *Enterobacter cloacae subsp. cloacae* (CT) ATCC 13047 e *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* ATCC 335 provenientes da coleção de microrganismos da Fundação Oswaldo Cruz. Os inóculos foram mantidos em meio sólido e refrigerados na temperatura de $4 \pm 2^\circ\text{C}$ e repicados mensalmente. Neste período, as cepas de *Enterobacter* foram cultivadas em meio sólido de caldo nutriente (Tabela 4.1) e a *Lactobacillus paracasei* no meio *Lactobacillus* MRS (Tabela 4.2).

Os meios de cultivo foram preparados dissolvendo-se os reagentes em água destilada, sendo o pH ajustado com hidróxido de sódio (0,1 M). Em seguida, os meios juntamente com as vidrarias utilizadas foram esterilizados a $121 \pm 1^\circ\text{C}$, a 1 kgf/cm^2 por 20 minutos.

Após o repique em meio sólido, as cepas permaneceram cerca de 24 horas em estufas a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ e, em seguida, foram encaminhadas para a geladeira ou transferidas para o meio líquido, sem adição de ágar. Caso transferidas para o meio líquido, as cepas permaneciam neste por 48 horas e, posteriormente, eram utilizadas no processo fermentativo. É importante ressaltar que todos os procedimentos de inoculação ocorreram em câmara de fluxo laminar.

Tabela 4.1: Composição do meio Caldo Nutriente (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Reagentes	Concentração (g/L)
Extrato de Carne	3,00
Peptona	10,00
Fosfato de potássio dibásico	1,00
Cloreto de Sódio	5,00
Ágar	30,00

pH ajustado para $6,8 \pm 0,2$.

Tabela 4.2: Composição do meio *Lactobacillus* MRS(DEMAN; ROGOSA; SHARPE, 1960).

Reagentes	Concentração (g/L)
Peptona	10,00
Extrato de Carne	10,00
Extrato de Levedura	5,00
Glicose	20,00
Polisorbato 80	1,00
Citrato de Amônio	2,00
Acetato de Sódio	5,00
Sulfato de Magnésio	0,10
Sulfato de Manganês	0,05
Fosfato Dipotássico	2,00
Ágar	12,0

pH ajustado para $6,5 \pm 0,2$.

4.2. Substratos

Glicose e permeado do soro de queijo (adquirido da empresa Sooro Concentrado Indústria de Produtos Lácteos Ltda) foram os substratos utilizados como fonte de carbono para a produção do hidrogênio. Estes, tinham a concentração final de açúcar ajustada para 10,00 g/L. É importante ressaltar ainda que, para os ensaios de controle foram utilizados os meios apresentados nas Tabela 4.1 e 4.2, sem modificação.

A caracterização do permeado de soro de queijo foi realizado pela própria empresa e está apresentada na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Características do permeado de soro de queijo da Empresa Sooro Concentrado Indústria de Produtos Lácteos Ltda.

Parâmetros	Especificação	Valores Análise
Umidade (%)	Máximo 4,0	1,05
Acidez (%)	Máximo 2,0	1,93
Gordura (%)	Máximo 1,5	0
Ph	6,0 - 6,7	6,25
Proteína (%)	Mínimo 3,0	1,42
Cinzas (sais minerais) (%)	Máximo 6,0	4,56
Lactose (%)	Mínimo 80	92,97

Fonte: Empresa Sooro

4.3. Condições para a fermentação

O processo fermentativo foi realizado em reatores de 50 mL (frascos de penicilina) e em reator tanque agitado (STR) de 1,5 L. Para todos os ensaios foi fixada a relação de 1,6% v/v de inóculo em condição de anaerobiose (ROMÃO *et al.*, 2014). É importante ressaltar que, além do microrganismo, o inóculo também continha metabólitos da bactéria, dessa forma no início da fermentação ácidos e etanol já podiam estar presentes no meio.

A sequência dos ensaios pode ser verificada na Figura 4.1.

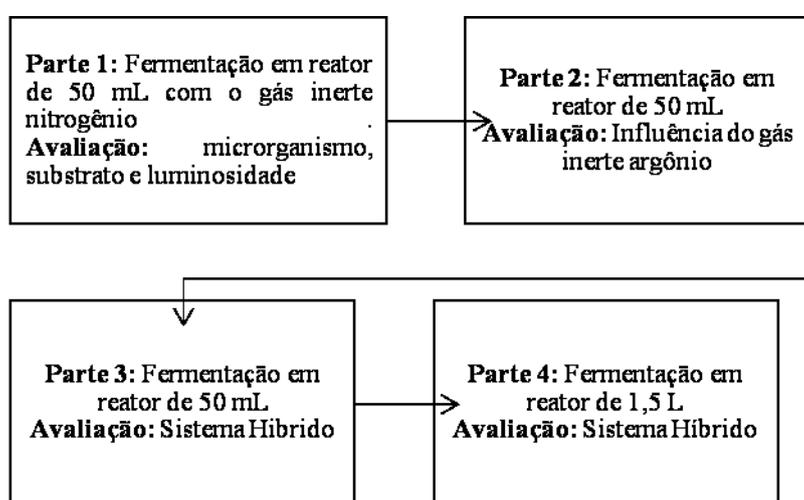


Figura 4.1: Fluxograma da sequência experimental.

4.3.1. Fermentação em reator de 50 mL

A preparação dos reatores de 50 mL (frascos de penicilina) foi realizada inicialmente com a esterilização por autoclavagem a $121 \pm 1^\circ\text{C}$, a 1 kgf/cm^2 por 20 minutos, juntamente com os septos utilizados para lacrar os frascos. Em seguida, o material permanecia por 20 minutos no fluxo laminar sob incidência de luz ultravioleta. Após este processo, a luz ultravioleta era desligada para que os frascos pudessem ser preenchidos com o volume útil de 37,5 mL do meio a ser fermentado, bem como o inóculo da bactéria em estudo. Gás inerte era borbulhado por 30 ± 5 segundos em cada reator. Logo após, os frascos eram lacrados e seringas eram conectadas ao septo para armazenagem do gás produzido.

As fermentações duravam um período médio de 108 horas com amostras retiradas em intervalos de 6 e 12 horas, estes intervalos de tempo foram adotados com base nos trabalhos de Moreira (2016) e Silva (2015). Os ensaios buscaram avaliar o comportamento das bactérias

em relação à produção de biogás, consumo do substrato, produção de ácidos e taxa de crescimento. Todo o procedimento foi realizado em triplicata utilizando-se frascos de sacrifício. O biogás armazenado nas seringas foi transferido para ampolas gasométricas (Construmaq LTDA, Brasil) para posterior análise no equipamento CG. Amostras de 10 mL de caldo fermentado foram retiradas e centrifugadas por 10 minutos a uma rotação de 8.000 rpm (12.096 g). Após esse procedimento, a biomassa celular foi separada do sobrenadante, sendo que este último foi armazenado para posterior análise da concentração de açúcar e metabólitos no HPLC. A biomassa celular foi lavada com água destilada e a densidade celular determinada através de espectrofotometria (metodologia explicada no tópico 4.4.1).

Os reatores foram armazenados em ambientes de acordo com a necessidade de incidência de luz. No caso da fermentação escura os frascos permaneceram em ambiente escuro que bloqueavam a passagem de luz (Figura 4.2.a). Enquanto que na fermentação clara um ambiente com luz incidente foi preparado para iluminação constante (Figura 4.2.b). Em ambas as condições a temperatura de fermentação foi a ambiente.

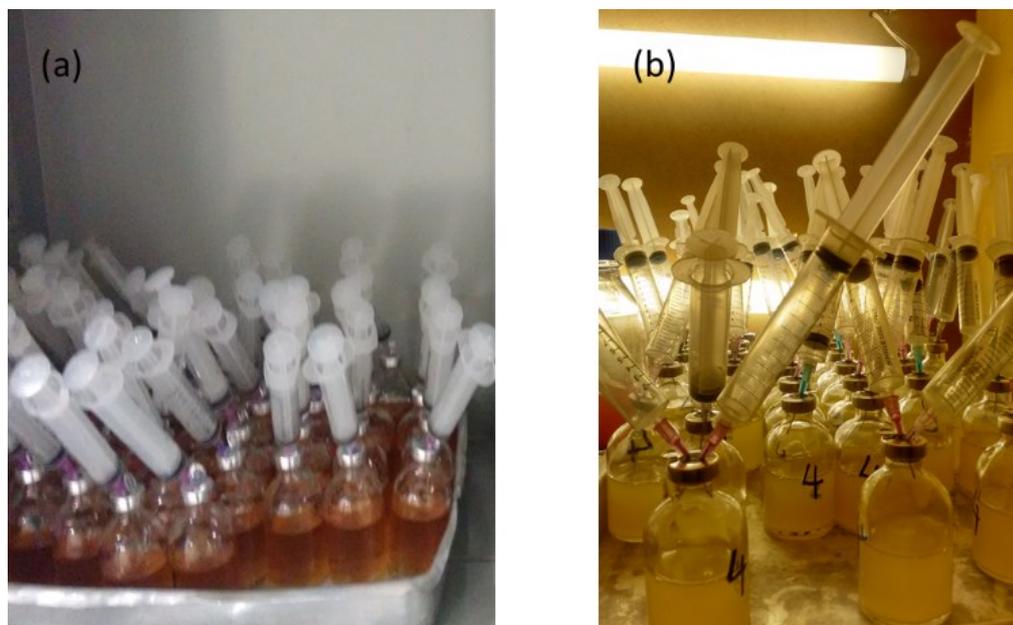


Figura 4.2: Fermentação em reatores de 50 mL (a) fermentação escura; (b) fermentação clara

Os testes realizados na primeira etapa do trabalho estudaram a influência do meio de cultivo (que foram estudados como uma forma de controle, para saber a influência que os reagentes poderiam causar na fermentação), a fonte de açúcar e a ausência e presença de luz constante com a utilização do gás inerte nitrogênio. A Tabela 4.4 apresenta a organização dos experimentos realizados.

Tabela 4.4: Ensaio em reatores de 50 mL com avaliação de microrganismos, substratos e condições de luminosidade com borbulhamento do gás inerte nitrogênio.

Ensaio	Microrganismo	Substrato	Luminosidade
1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Meio <i>Lactobacillus</i> MRS	Ausente
2		Meio <i>Lactobacillus</i>	Presente
3		MRS*+ Glicose	Ausente
4		Meio <i>Lactobacillus</i>	Presente
5		MRS*+ Lactose	Ausente
6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Meio caldo nutriente	Ausente
7		Meio caldo nutriente +	Presente
8		Glicose	Ausente
9		Meio caldo nutriente +	Presente
10		Lactose	Ausente
11	<i>Enterobacter cloacae</i>	Meio caldo nutriente	Ausente
12		Meio caldo nutriente +	Presente
13		Glicose	Ausente
14		Meio caldo nutriente +	Presente
15		Lactose	Ausente

* Meio sem glicose.

Em uma segunda etapa, a influência do gás inerte foi avaliada na fermentação clara para a produção de hidrogênio (Tabela 4.5). Dessa forma, as bactérias do gênero *Enterobacter* eram novamente avaliadas alterando-se o gás nitrogênio, utilizado na etapa anterior, para argônio.

Tabela 4.5: Ensaio em reatores de 50 mL com avaliação do gás inerte argônio.

Ensaio	Microrganismo	Substrato
16	<i>Enterobacter Aerogenes</i>	Meio caldo nutriente + Glicose
17		Meio caldo nutriente + Lactose
18	<i>Enterobacter Cloacae</i>	Meio caldo nutriente + Glicose
19		Meio caldo nutriente + Lactose

Por fim, o sistema híbrido foi testado em reatores de 50 mL. O efluente gerado na fermentação escura da *E. cloacae* com o substrato glicose e gás inerte nitrogênio foi empregado em uma segunda etapa de fermentação clara com o gás inerte argônio. Eram realizados três testes com este efluente, ressaltando que nenhum tratamento era realizado na transferência das fases e que o efluente já possuía microrganismos.

No ensaio 20 o efluente foi apenas transferido para os frascos de penicilina sem nenhuma suplementação, funcionando como branco para verificação do comportamento do microrganismo no efluente. Nos ensaios 21 e 22, glicoseeraadicionada na concentração de 10,0 g/L, sendo que no ensaio 22 também houve acréscimo de inóculo na relação de 1,6% v/v.

Tabela 4.6: Ensaios da fermentação híbrida realizada em reatores de 50 mL utilizando o efluente da fermentação escura.

Ensaio	Microrganismo	Substrato
20	<i>Enterobacter Cloacae</i>	Efluente
21		Efluente + Glicose
22		Efluente + Glicose + <i>E. Cloacae</i>

4.3.2. Fermentação em reator de 1,5 L

Após definir as melhores condições de fermentação, o Módulo Fermentador Tec-Bio-Flex Tecnal[®] do tipo tanque agitado (STR) de 1,5 L foi utilizado para as fermentações em escala ampliada com o volume útil de 700 mL (Figura 4.3). O reator foi higienizado com álcool 70 % e permaneceu por 40 minutos sob incidência de luz ultravioleta no fluxo laminar. Logo após, a luz ultravioleta foi desligada e o meio a ser fermentado e a bactéria foram adicionados ao reator. Gás inerte foi borbulhado por $3 \pm 0,5$ minutos para garantir a condição de anaerobiose. Em seguida, o reator foi lacrado e permaneceu a temperatura de $32 \pm 1^\circ\text{C}$ com agitação de 120 rpm.



Figura 4.3: Reator STRde 1,5 L utilizado na fermentação em escala ampliada.

A fermentação ocorreu até que a produção de biogás fosse extinta. Amostras foram coletadas em intervalos periódicos (10 - 14 horas). O volume de biogás produzido foi quantificado por um medidor de vazão volumétrica MilliGasCounter da Ritter Tipo MGC-1 e parte deste armazenado em ampolas gasométricas para análise da composição do biogás. Do meio fermentado, 10 mL foram retirados para análise da densidade celular e concentração de açúcar e metabólitos.

Observando-se o consumo e concentrações inferiores a 3 g/L, houve a adição de mais 10,0 g/L de açúcar no meio. O pH também foi periodicamente corrigido para um valor de $6,8 \pm 0,2$.

Para a fermentação escura (Ensaio 23), o biorreator foi recoberto com papel alumínio para garantir a ausência de luz (Figura 4.4). Nos testes de fermentação clara o mesmo reator, sem a cobertura, foi utilizado com incidência de luz constante nos comprimentos 2200 lux (Figura 4.3).



Figura 4.4: Fermentação escura em reator de 1,5 litros

Encerrada a fermentação escura, o efluente obtido foi centrifugado e autoclavado para sua aplicação nos ensaios 24 e 25 que ocorreram na presença de luz constante. No ensaio 24 foi utilizado o efluente bruto, enquanto que no ensaio 25 houve diluição deste em 50% com o meio caldo nutriente. Em ambos a bactéria *Enterobacter Cloacae* (relação de 1,6 % v/v) e glicose (10,0 g/L) foram utilizadas.

4.4. Metodologia Analítica

4.4.1. Determinação do crescimento celular

A quantificação da densidade celular foi realizada através da relação de sólidos voláteis e absorvância no comprimento de onda de 650 nm. Para essa análise uma curva de calibração foi previamente construída relacionando as variáveis citadas anteriormente. A absorvância foi medida utilizando o espectrofotômetro modelo Shimadzu UVmini-1240.

Para análise, a bactéria foi separada do meio fermentado e, em seguida, lavada com água destilada, sendo que ambos os procedimentos foram realizados por centrifugação por 10 minutos a 12.096 g. Ao sedimento formado água destilada foi adicionada no mesmo volume da solução inicial, formando assim uma solução de bactérias. A absorvância da solução foi medida e, posteriormente, convertida em concentração de células (g/L), através da curva de calibração.

4.4.2. Quantificação de açúcares 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. Os metabólitos analisados neste trabalho foram glicose, lactose, etanol 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.

4.4.3. Quantificação do hidrogênio

A concentração do hidrogênio produzido foi determinada através da injeção do biogás no Cromatógrafo Shimadzu modelo GC 17-A, 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.

4.4.4. 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, era previamente calibrado com solução tampão pH 4 e pH 7.

4.5. Determinação dos parâmetros cinéticos:

4.5.1. Taxa de crescimento celular

A taxa específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) foi determinada durante a fase de crescimento exponencial, através do coeficiente angular da reta ajustada para a variação do logaritmo neperiano da densidade celular com o tempo (Eq. 4.1).

$$\mu_{m\acute{a}x} = \frac{\Delta(\ln X)}{\Delta t} \quad (4.1)$$

Sendo:

X = Densidade da biomassa

t = Tempo

4.5.2. Tempo de duplicação

O tempo de duplicação celular (t_d) foi determinado pela razão entre o logaritmo neperiano de 2 e $\mu_{m\acute{a}x}$, como mostra a Eq. 4. 2.

$$t_d = \frac{(\ln 2)}{\mu_{m\acute{a}x}} \quad (4.2)$$

4.5.3. Taxa de consumo do substrato

Os coeficientes de consumo específicos (q_i) de glicose e lactose foram determinados na fase de crescimento exponencial. A relação do consumo de substrato e crescimento da biomassa em relação tempo foi utilizada para a determinação deste parâmetro cinético conforme mostrado na Eq. 4.3.

$$q_i = \frac{\left(\frac{DS}{dt}\right)}{\left(\frac{dX}{dt}\right)} * \mu_{m\acute{a}x} \quad (4.3)$$

Sendo: S= Concentração de glicose ou lactose.

4.5.4. Produtividade

O cálculo da produtividade de hidrogênio em relação ao tempo foi determinado pela Eq. 4.4.

$$Produtividade = \frac{mmol\ de\ H_2}{volume\ reacional * tempo} \quad (4.4)$$

4.5.5. Rendimento

A relação entre o consumo de substrato e o volume de hidrogênio produzido durante a fermentação foi determinado através da Eq. 4.5.

$$Rendimento = \frac{mol\ de\ H_2}{mol\ de\ substrato\ consumido} \quad (4.5)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Ensaio em reatores de 50 mL

As fermentações em reatores de 50,0 mL com volume útil de 37,5 mL foram conduzidas à temperatura ambiente com a concentração do inóculo na relação 1,6% v/v. As fontes de carbono glicose, além de lactose proveniente do soro de leite em pó, foram adicionadas ao meio de cultivo do microrganismo na concentração de 10,0 g/L. Ensaio de controle avaliando a influência do meio de cultivo, apresentados nas Tabelas 4.1 e 4.2, na ausência de luz também foram avaliados para descrever o comportamento do microrganismo e a influência deste na produção de metabólitos. As fermentações duraram 108 horas e, além disso, frascos de sacrifício permitiram retirar amostras em intervalos de 12 e 6 horas para análise do biogás e do meio fermentado.

5.1.1. Avaliação do inóculo em diferentes condições de fermentação

Neste tópico serão apresentados os ensaios de 1 ao 15, nos quais os microrganismos *Lactobacillus paracasei*, *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae* foram fermentados em condições de anaerobiose garantida através do borbulhamento com gás inerte nitrogênio.

5.1.1.1. *Lactobacillus paracasei*

Embora não seja produtora de hidrogênio, a *L. paracasei* é frequentemente encontrada em fermentações em que culturas mistas são utilizadas para a produção do hidrogênio (SIKORA et al., 2013). Dessa forma, é essencial um estudo detalhado deste microrganismo para verificação do comportamento e se a interação deste com as bactérias fermentativas *E. aerogenes* e *E. cloacae* em sistemas de co-cultura seria vantajosa. Nesta seção, o principal interesse foi avaliar o comportamento da *L. paracasei* em relação aos ácidos orgânicos.

O comportamento da biomassa da *L. paracasei* nos ensaios 1 ao 5 pode ser observado na Figura 5.1. É verificado que a bactéria apresentou um comportamento similar em todas as situações estudadas. Em geral, este comportamento foi marcado por uma fase de adaptação ao meio nas primeiras 12 horas, seguido por um crescimento exponencial e com a densidade celular permanecendo constante a partir de 48 horas. A concentração inicial de microrganismo

no meio foi de aproximadamente 0,006 g/L. Pela Figura 5.1 é possível observar que o meio de controle apresentou o maior valor de densidade de biomassa (1,62 g/L) durante a fermentação, o que pode ser justificado pela concentração de glicose de 20,0 g/L no meio de cultivo enquanto os demais ensaios partiram da concentração de açúcar de 10,0 g/L.

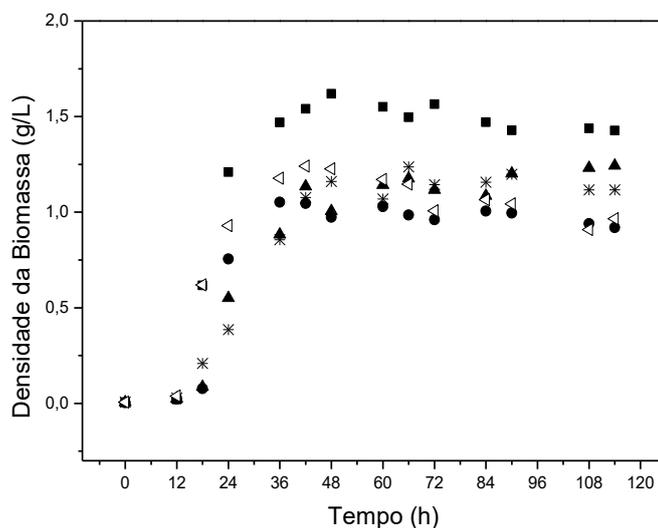


Figura 5.1: Perfil da densidade celular para *L. paracasei* em função do tempo de fermentação com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro, (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.

A presença de uma maior concentração de substrato (20,0 g/L) no meio de controle escuro ocasionou o maior consumo da fonte de carbono e menor tempo de duplicação (2,03 horas) ao microrganismo na fase exponencial, quando comparado aos demais meios (Figura 5.1).

Tabela 5.1: Taxa de crescimento, tempo de duplicação e consumo de substrato para *L. paracasei*

Condição	μ_m^* (h ⁻¹)	T _d ** (h)	Consumo do substrato
			(g _{substrato} /g _{biomassa} * h)
Controle Escuro	0,33	2,03	2,01
Glicose Claro	0,21	3,18	1,05
Glicose Escuro	0,29	2,36	1,45
Lactose Claro	0,26	2,60	1,56
Lactose Escuro	0,22	2,69	1,47

- * μ_m = Taxa de crescimento celular; ** T_d = Tempo de duplicação

Nos meios em que a concentração de açúcar foi de 10,0 g/L a densidade da biomassa alcançou valores máximos próximos (entre 1,04 e 1,24 g/L), evidenciando que houve pouca diferença em relação ao substrato ou a presença da luz. Contudo, a taxa de crescimento exponencial foi superior em aproximadamente 38% para o meio com glicose na ausência de luz em comparação a mesma condição no claro, o que causou o menor tempo de duplicação a este meio. Já no meio com lactose, o meio com incidência de luz apresentou a taxa de crescimento superior em aproximadamente 17%.

Em relação ao substrato, foi verificado que nos meios em que a concentração foi de 10,0 g/L o consumo deste acompanha a velocidade de crescimento da biomassa. Nestes ensaios, a fonte de açúcar foi totalmente consumida em até 48 horas, tempo em que a densidade de biomassa se torna constante (Figura 5.2). Embora, o meio de controle tenha apresentado a maior taxa de consumo de substrato ($2,01 \text{g}_{\text{substrato}}/\text{g}_{\text{biomassa}}\text{h}$), é observado que a glicose não foi totalmente consumida ao final das 108 horas. Além disso, também pode ser considerado, que mesmo com fonte de carbono disponível no meio, a densidade da biomassa fica constante a partir de 48 horas, o que pode ter sido causado pela limitação de outro nutriente no meio.

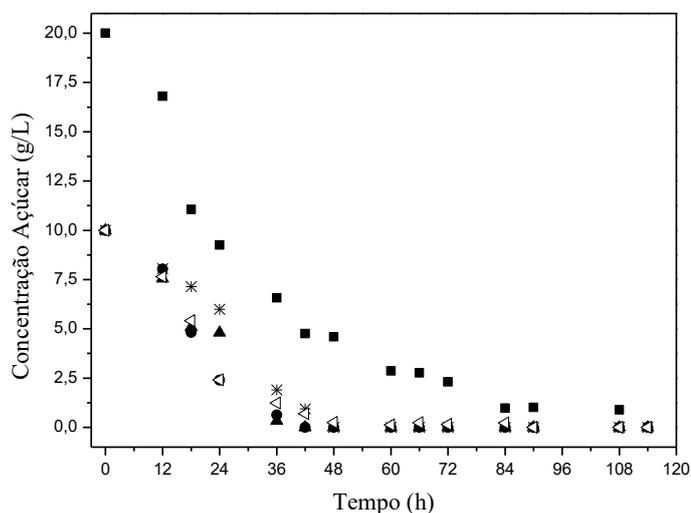


Figura 5.2: Perfil da concentração de açúcar para *L. paracasei* em função do tempo de fermentação com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro..

O pH foi outra variável avaliada no trabalho e está representada na Figura 5.3. Neste caso também é possível verificar o comportamento similar em todas as condições de

fermentação, quando é observado uma queda constante até 60 horas. Essa diminuição no pH pode ser justificada pela produção de ácidos orgânicos.

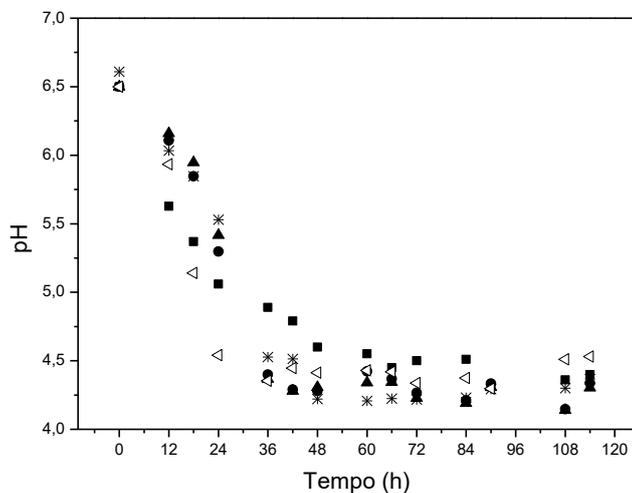


Figura 5.3: Comportamento do pH para *L. paracasei* em função do tempo de fermentação com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.

Nas Figura 5.4 e 5.5 estão apresentadas o perfil de concentração dos ácidos acético e propiônico para a *L. paracasei*, que diferentemente das outras situações apresentadas até o momento esses ácidos apresentaram comportamentos particulares de acordo com as condições de fermentação oferecidas. Nos ensaios 1, 2, 3 e 5 é possível observar que os ácidos em estudo podem ter suas concentrações consideradas como constantes ao longo de toda fermentação. Enquanto que, no meio claro com lactose (ensaio 4) ocorre a produção de ambos os ácidos, sendo a síntese de ácido acético de 5,15 g/L e a de ácido propiônico de 3,73 g/L.

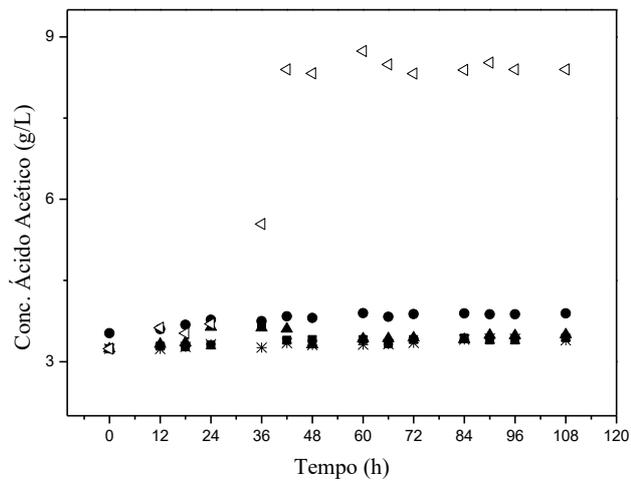


Figura 5.4: Concentração de ácido acético em função do tempo de fermentação para a *L. paracasei* com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.

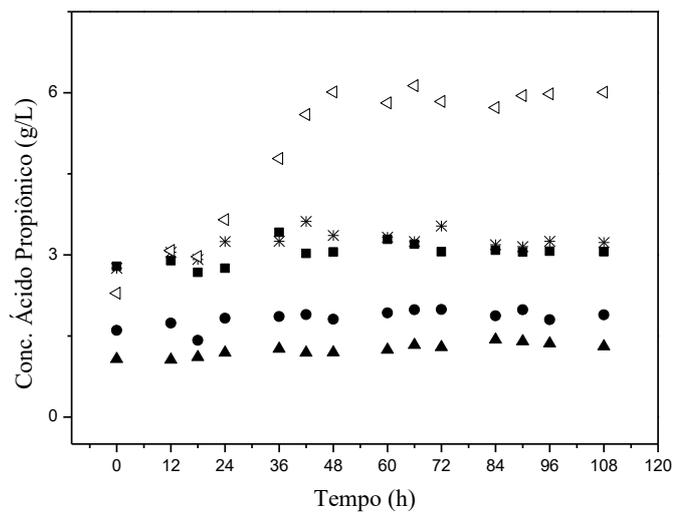


Figura 5.5: Concentração de ácido acético em função do tempo de fermentação para a *L. paracasei* com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.

A Figura 5.6 representa a relação ao ácido butírico, sendo que o ensaio de controle é o único a apresentar síntese significativa do metabólito (0,91 g/L). Nos ensaios 2 ao 5 a concentração do ácido no meio pode ser considerada constante.

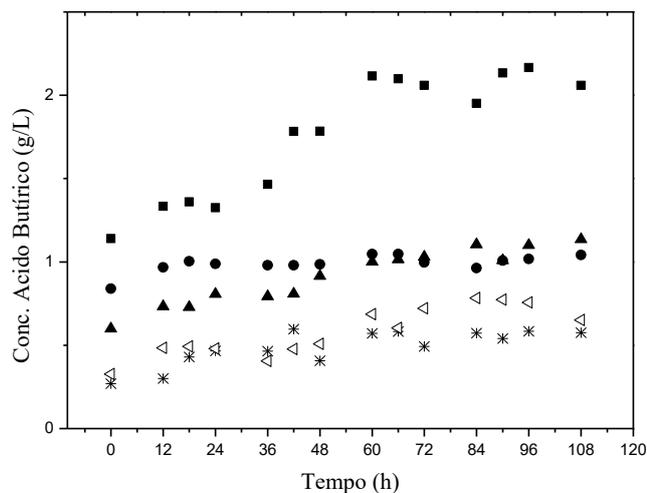


Figura 5.6: Concentração de ácido butírico em função do tempo de fermentação para a *L. paracasei* com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro,(x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro,(◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.

Para o ácido láctico, principal metabólito produzido pelas bactérias do gênero *Lactobacillus*, é possível observar que, em todos os ensaios, sua produção foi verificada (Figura 5.7). Nos ensaios 1 e 4a concentração final de lactado ficou em torno de 18,0 g/L, maiores concentrações quando comparada às demais fermentações. Para o ensaio 1 esta concentração é atingida nas primeiras 12 horas, enquanto que no ensaio 4 a concentração de 18,0 g/L só é alcançada em 84 horas. Nos demais ensaios, a concentração máxima fica em torno de 11,0 g/L, valor atingido a partir de 48 horas de fermentação.

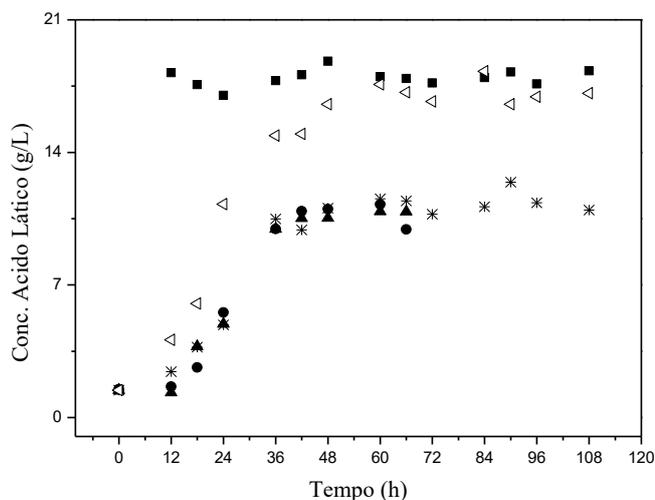


Figura 5.7: Concentração de ácido láctico em função do tempo de fermentação para a *L. paracasei* com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro,(x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro,(◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.

Chojnacka et al.(2011) relataram que nas condições ótimas de produção de hidrogênio em sistemas de consórcio microbiano os gêneros *Clostridium*, *Enterobacter* e bactérias heteroláticas(produtoras de ácido lático e etanol) foram os microrganismos dominantes no meio. Avaliando o sistema de co-cultura entre *Lactobacillus* *Clostridium*, bactéria comumente empregada na fermentação escura, Noike et al. (2002) relata que a produção de hidrogênio foi mínima no sistema de co-cultura. O estudo sugeriu ainda que os metabólitos sintetizados pela *Lactobacillus* inibiram a produção de hidrogênio pela *Clostridium*. É importante ressaltar que a utilização do *Lactobacillus* com bactérias do gênero *Enterobacter* em sistemas de co-cultura não foi relatada na literatura pesquisada. Contudo, este trabalho inicialmente vislumbrou a execução deste sistema na tentativa de potencializar a produção de hidrogênio. Entretanto, ao analisar o comportamento isolado da *L. paracasei* a ideia foi abortada uma vez que o microrganismo poderia inibir a produção de hidrogênio ao competir pelo substrato para a síntese de ácido lático, além de causar queda no pH do sistema.

Já em relação a associação entre bactérias fotossintetizantes e bactérias do gênero *Lactobacillus* a literatura apresenta trabalhos com resultados positivos em sistemas de co-cultura ou pela formação de sistema híbrido entre as espécies (ASADA *et al.*, 2006; LAOCHAROEN *et al.*, 2015). O ácido lático sintetizado pela *Lactobacillus* pode atuar com substrato na fotofermentação, sendo o rendimento teórico dessa reação de 12 mols de H₂/mol de glicose (CHEN *et al.*, 2011). O sistema de co-cultura entre *Lactobacillus* e a bactéria fotofermentativa *Rhodobacter sphaeroides* foi estudado por Asada *et al.* (2006) que obtiveram um rendimento de 7,1 mols de H₂ /mol de glicose. Laocharoen *et al.* (2015) também realizaram um estudo da formação de co-cultura entre as bactérias do ácido lático e bactérias fotossintetizantes, a fim de obter melhores rendimentos de hidrogênio. Em seus ensaios, o pesquisador encontra a relação 1:12 m/m das bactérias *Lactobacillus delbrueckii* e *Rhodobacter sphaeroides* e um rendimento de 9,6 mols de H₂/mol de glicose

5.1.1.2. *Enterobacter aerogenes*

A avaliação do comportamento da *E. aerogenes* foi realizada nos ensaios 6 ao 10, quando foram determinadas as influências do substrato e da presença de luminosidade na fermentação.

A Figura 5.8 apresenta a comportamento da biomassa durante 108 horas de fermentação. A partir da densidade celular inicial de 0,02 g/L nos ensaios, é verificado que o substrato foi um parâmetro com influência no crescimento do microrganismo. Nas condições

em que a glicose foi utilizada como substrato, a *E. aerogenes* apresentou uma rápida taxa de crescimento, fase exponencial entre 0 e 12 horas, seguida pela estabilização do valor máximo da densidade de biomassa com a concentração do microrganismos ficando em torno de 0,9 g/L. Enquanto que, os ensaios que utilizaram lactose como fonte de carbono, o crescimento da biomassa ocorreu de forma mais lenta, com o tempo de duplicação sendo até três vezes superior ao observado para os meios com glicose (Tabela 5.2).

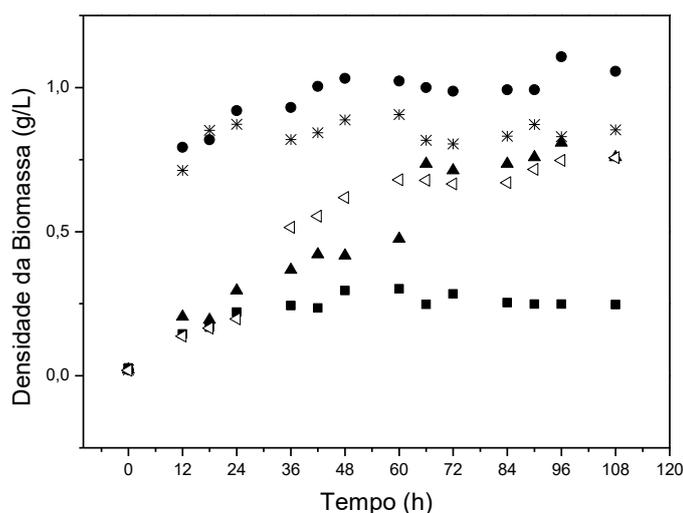


Figura 5.8: Perfil da densidade celular para *E. aerogenes* em função do tempo de fermentação com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.

Tabela 5.2: Taxa de crescimento, tempo de duplicação e consumo de substrato para *E. aerogenes*.

Condição	μ_m (h ⁻¹)	T _d (h)	Consumo do substrato (g _{Substrato} /g _{biomassa} *h)
Controle Escuro	0,09	7,02	--
Glicose Claro	0,29	2,35	2,77
Glicose Escuro	0,30	2,28	2,40
Lactose Claro	0,08	7,85	0,87
Lactose Escuro	0,11	6,27	1,10

- * μ_m = Taxa de crescimento celular; ** T_d = Tempo de duplicação

Além do maior tempo de duplicação em relação ao meio com glicose, os ensaios com lactose apresentaram menor consumo de substrato associado ao crescimento, sendo estes inferiores em 68% e 55% para os meios com e sem incidência de luz, respectivamente. O

maior tempo de duplicação do ensaio controle escuro (7,02 horas) pode ser justificado pela ausência de açúcar no meio.

Na Figura 5.9 verifica-se que a concentração de glicose apresenta uma rápida queda nas primeiras 24 horas, sendo que a completa exaustão deste açúcar no meio ocorreu em 48 horas. A pouca afinidade da *E. aerogenes* pela lactose, diferentemente da glicose, fica explícita ao se verificar que este substrato não é totalmente consumido durante a fermentação, cerca de 50% da lactose permaneceu no meio ao final das 108 horas de fermentação.

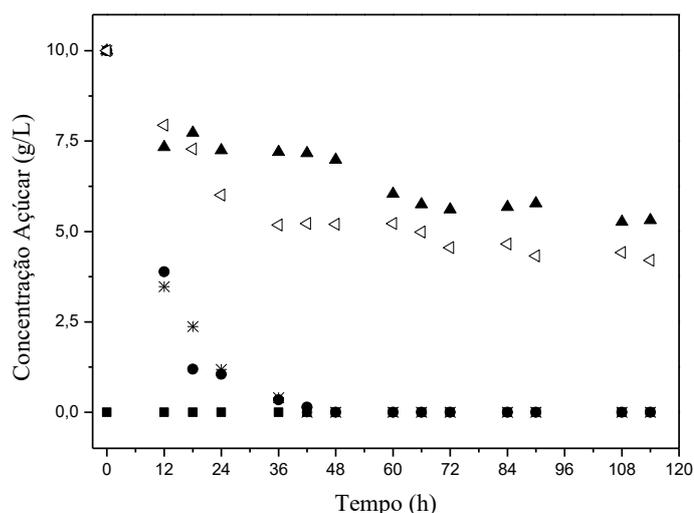


Figura 5.9: Perfil da concentração de açúcar para *E. aerogenes* em função do tempo de fermentação com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro, (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.

Em relação ao pH, todos os ensaios, com exceção do controle, apresentaram queda ao longo do tempo, o que pode ser justificado pelo fato da rota metabólica da *E. aerogenes* estar associada à produção de ácidos orgânicos, conforme verificado na Figura 3.2. Através da Figura 5.10 é possível observar que nos meios com glicose essa queda ocorreu de forma mais rápida nas primeiras 24 horas. No meio controle, a oscilação do pH em torno de 6,8 pode ser justificada pela ausência de fonte de carbono, substrato para síntese de ácidos.

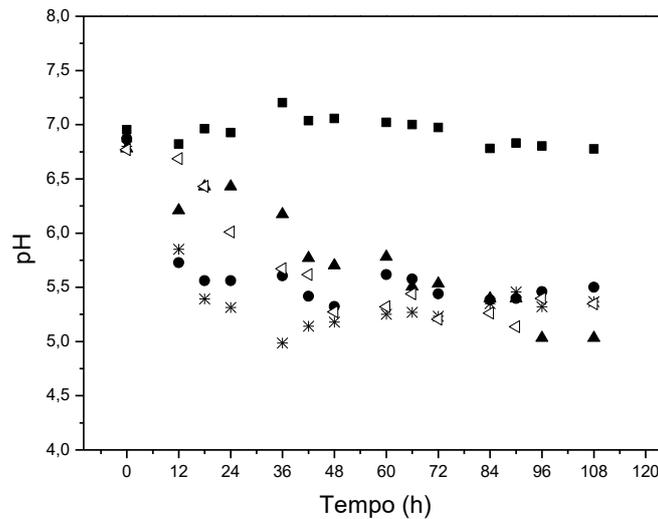


Figura 5.10: Comportamento do pH para *E. aerogenes* em função do tempo de fermentação com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.

As Figuras 5.11 e 5.12 apresentam o comportamento dos ácidos acético e propiônico ao longo da fermentação. Para os ensaios de controle é verificado que as concentrações dos ácidos permanecem constante ao longo da fermentação. Nos ensaios 9 e 10, em que a lactose foi utilizada como fonte de carbono, as concentrações também podem ser consideradas constantes, visto que a maior diferença observada entre a concentração inicial e final foi de 0,24 g/L no ensaio com lactose na ausência de iluminação para o ácido acético. Já nos ensaios com glicose é possível observar a síntese de ambos os ácidos. A produção do ácido acético pode ser verificada até em torno de 42 horas, sofrendo poucas oscilações a partir deste tempo. A variação da concentração do ácido acético no meio escuro com glicose foi de 0,51 g/L enquanto no meio claro a variação foi de 0,57 g/L. Já em relação ao ácido butírico, é verificado que nos meios com glicose a produção ocorre ao longo de toda fermentação, sendo a produção em ambas as situações com glicose de aproximadamente 1,0 g/L.

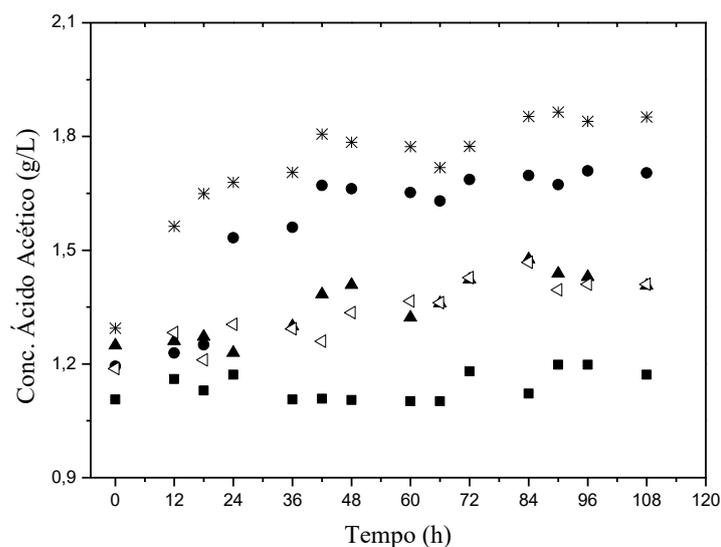


Figura 5.11: Concentração do ácido acético para *E. aerogenes* em função do tempo de fermentação com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro,(x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro,(◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.

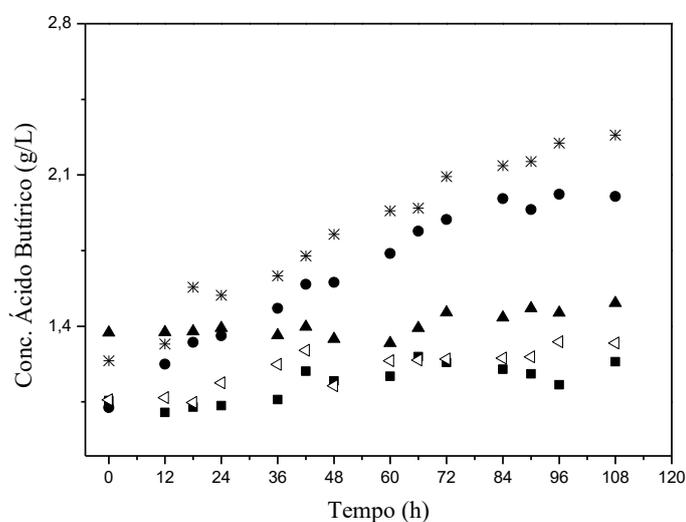


Figura 5.12: Concentração do ácido butírico para *E. aerogenes* em função do tempo de fermentação com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro,(x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro,(◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.

Pela Tabela 5.3 é verificado que os ácidos láctico e propiônico (metabólitos que quando sintetizados não geram nenhuma molécula de hidrogênio) também são produzidos em ao longo da fermentação. O ensaio que teve a maior produção de ácido láctico foi o meio com glicose na condição escura, sendo a síntese de 0,46 g/L. Já para o ácido propiônico, os meios

que utilizaram lactose como substrato apresentaram a produção superior a 1,0 g/L, enquanto nos meios com glicose a variação ficou em torno de 0,4 g/L.

Tabela 5.3: Concentração inicial e final do ácido láctico, ácido propiônico e etanol nos ensaios com *E. aerogenes*.

Condição	Ácido Láctico (g/L)			Ácido Propiônico (g/L)			Etanol (g/L)		
	Inicial	Final	Δ	Inicial	Final	Δ	Inicial	Final	Δ
Controle Escuro	1,84	1,93	0,09	1,8	2,05	0,25	--	--	--
Glicose Claro	1,84	2,16	0,32	2,2	2,65	0,45	0,61	1,79	1,18
Glicose Escuro	1,21	1,67	0,46	1,51	1,93	0,42	0,31	1,59	1,28
Lactose Claro	1,84	2,21	0,37	1,32	2,67	1,35	0,36	0,77	0,41
Lactose Escuro	1,36	1,6	0,24	1,14	2,16	1,02	0,34	0,8	0,46

A síntese de etanol também pode ser observada na Tabela 5.3, para este metabólito é verificado que os meios com glicose apresentaram produtividade superior aos meios com lactose. A fermentação clara com glicose foi superior em 187% a fermentação clara com lactose, enquanto na condição escura a superioridade para a glicose foi de 178%.

A produtividade de hidrogênio, os ensaios com *E. aerogenes* evidenciaram mais uma vez a pouca afinidade do microrganismo com a lactose. Na Figura 5.13, pode ser observado que na presença de lactose a produtividade de hidrogênio foi menos expressiva, quando comparado aos meios com glicose. Nos meios com lactose a produtividade máxima foi de 15,48 e 1,18 mmol de H₂/L·dia para a condição clara e escura, respectivamente. Com o substrato glicose, a produtividade do sistema com incidência de luz foi de 73,75 mmol de H₂/L·dia, sendo superior em 21% em relação ao meio sem presença de luz.

A influência da iluminação na produção de hidrogênio nos meios com glicose também pode ser observada pelos melhores rendimentos obtidos no meio com incidência de luz, quando este apresentou um rendimento de 1,51 mols de H₂/mol de hexose, sendo superior em 61 % em relação a condição sem iluminação. Para os meios com lactose os rendimentos foram de 0,23 e 0,05 mol de H₂/mol de hexose para os sistemas com e sem iluminação, respectivamente.

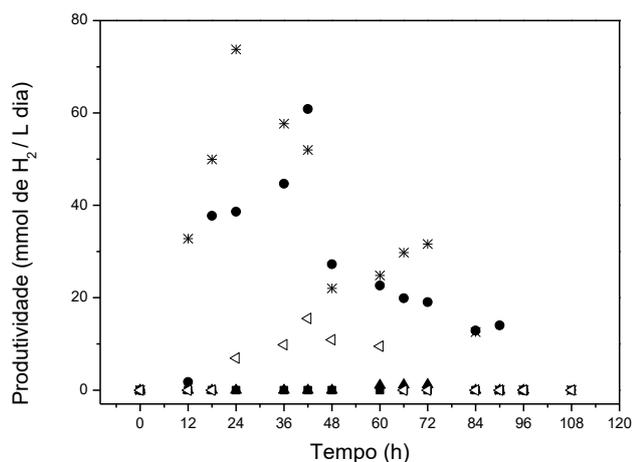


Figura 5.13: Produtividade de hidrogênio em função do tempo de fermentação para a *E. aerogenes* com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.

Zhao *et al.*, (2017) em seu estudo propuseram uma comparação entre a produtividade de hidrogênio entre cepas distintas de *E. aerogenes*, com e sem modificação genética, investigando a expressão da enzima [FeFe] hidrogenase. Em seus ensaios de fermentação escura a glicose foi utilizada como substrato e o gás nitrogênio garantiu a condição de anaerobiose. As produtividades de hidrogênio foram de 57,3 e 51,4 mmol de H₂/L·dia para os microrganismos com e sem modificação genética, respectivamente. Com relação ao rendimento, estes autores relataram que a conversão com a espécie sem modificação foi de 1,2 mols de H₂/mol de glicose, sendo que a espécie modificada teve o rendimento superior em 86%. Quando os rendimentos obtidos por Zhao *et al.* (2017) são comparados aos encontrados para *E. aerogenes* neste trabalho é verificado que a condição clara com glicose apresentou resultados superiores em 25% à espécie sem modificação, entretanto os rendimentos foram inferiores aos da espécie com modificação.

Diferentemente do observado neste trabalho, Rai e Singh (2016) obtiveram sucesso na fermentação utilizando soro de queijo como substrato na fermentação com bactéria *E. aerogenes*. O rendimento encontrado para a fermentação escura foi de 1,02 mol de H₂/mol de hexose, sendo a principal diferença com o presente trabalho o controle da temperatura em 34°C. Os rendimentos obtidos por Rai e Singh (2016) foram superiores em, aproximadamente, 20 vezes ao encontrado neste trabalho para a lactose no escuro.

É importante ressaltar que a diferença no comportamento para o sistema de controle em relação aos demais deveu-se a ausência de glicose.

5.1.1.3. *Enterobacter cloacae*

As avaliações dos ensaios 11 ao 15 para a *E. cloacae* foram iniciadas pela observação do comportamento da biomassa durante a fermentação (Figura 5.14). É possível verificar que nenhuma das condições fermentativas utilizadas inibiu o crescimento do microrganismo, uma vez que a fase exponencial pode ser detectada no início da fermentação e que todos os meios, com exceção do controle, se aproximaram da densidade máxima de 2,5 g/L. Apesar desta similaridade, foi observado que os meios com glicose atingiram a densidade máxima em tempos inferiores aos meios com lactose, gerando assim menores tempos de duplicação (Tabela 5.4).

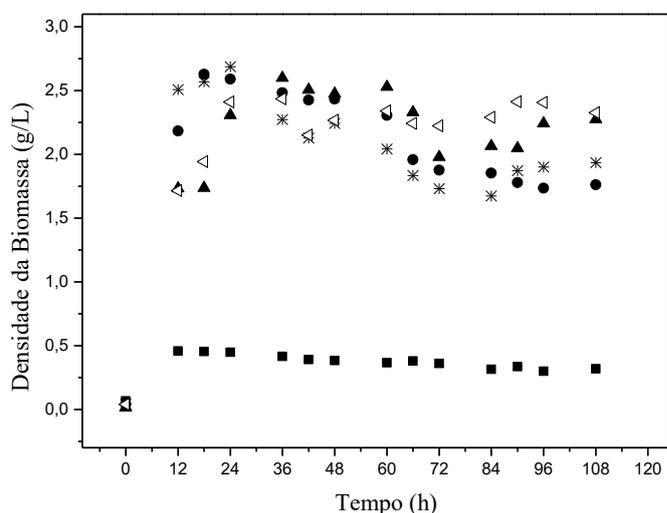


Figura 5.14: Perfil da densidade celular para *E. cloacae* em função do tempo de fermentação com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro, (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.

Tabela 5.4: Taxa de crescimento, tempo de duplicação e consumo de substrato para *E. Cloacae*

Condição	μ_m (h ⁻¹)	T _d (h)	Consumo do substrato (gSubstrato/gbiomassa*h)
Controle Escuro	0,202	3,410	---
Glicose Claro	0,344	2,010	0,946
Glicose Escuro	0,333	2,072	0,813
Lactose Claro	0,313	2,211	0,895
Lactose Escuro	0,314	2,201	0,628

- * μ_m = Taxa de crescimento celular; ** T_d = Tempo de duplicação

Em relação ao substrato é importante ressaltar que este foi totalmente consumido em até 60 horas (Figura 5.15). Avaliando-se o consumo do substrato associado ao crescimento celular, foi verificado que as taxas de consumo de glicose e lactose para os meios com presença de luminosidade foram superiores em 16% e 42%, respectivamente (Tabela 5.4).

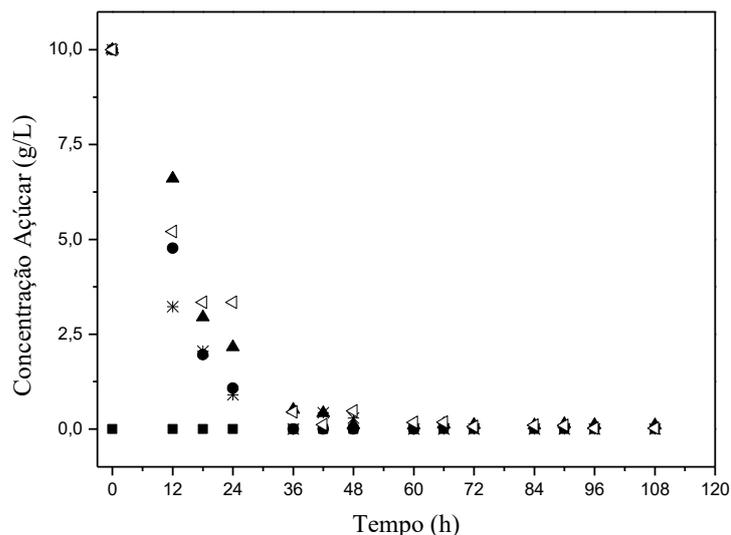


Figura 5.15: Perfil da concentração de açúcar para *E. cloacae* em função do tempo de fermentação com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.

A Figura 5.16 apresenta o comportamento do pH. Nesta figura, é verificado que todos os ensaios, com exceção do controle, apresentam queda no pH entre o tempo de 48 horas, período em que ainda havia fonte de açúcar no meio, indicando mais uma vez a produção dos ácidos (Figura 5.16).

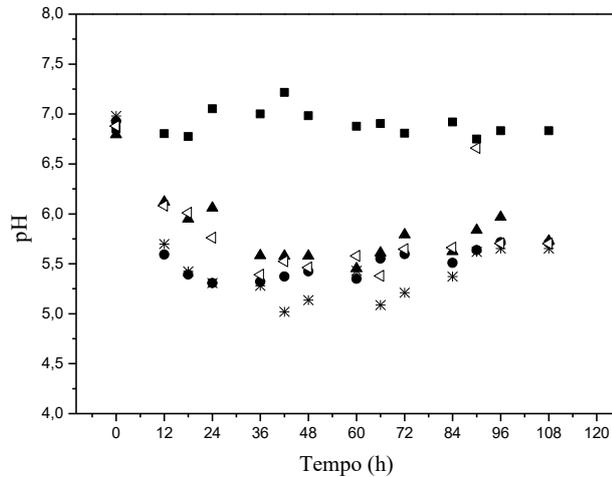


Figura 5.16: Comportamento do pH para *E. cloacae* em função do tempo de fermentação com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (✱) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.

A Figura 5.17 apresenta o comportamento do ácido acético ao longo da fermentação, na qual pode ser verificado um aumento da produção do metabólito em todos os ensaios que possuíam açúcar como fonte de carbono. O meio com glicose claro apresenta a maior síntese do metabólito sendo esta de 0,82 g/L, com a concentração final de 2,05 g/L. Nos demais meios a concentração final do ácido acético é de aproximadamente 1,80 g/L, sendo inferior em 10 % a concentração final do sistema claro com glicose.

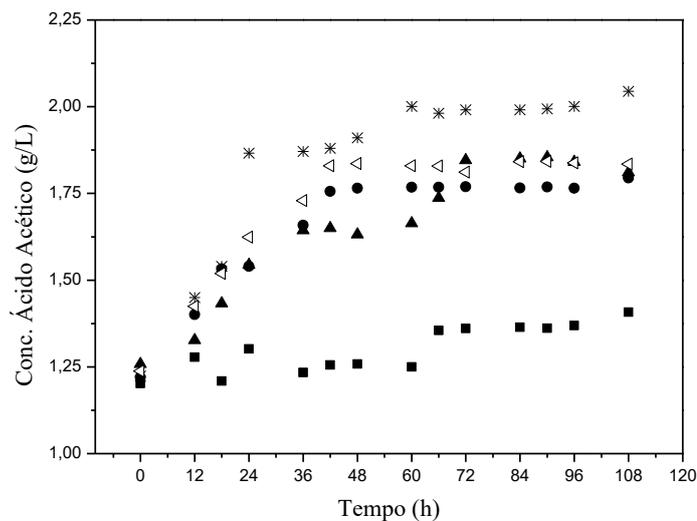


Figura 5.17: Concentração do ácido acético para *E. cloacae* em função do tempo de fermentação com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (✱) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.

O ácido butírico, metabólito que quando produzido pode ter até duas moléculas de hidrogênio associada a síntese na fermentação, está representado na Figura 5.18. Com exceção do meio de controle, todos os ensaios produziram o ácido gerando uma concentração média de aproximadamente 1,1 g/L. A variação na concentração inicial do ácido, como já citado anteriormente, se deve presença do metabólito no inóculo.

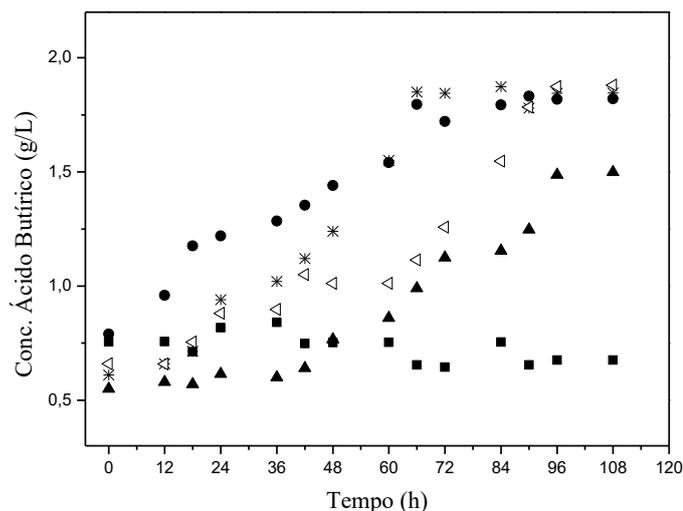


Figura 5.18: Concentração do ácido butírico para *E. cloacae* em função do tempo de fermentação com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (⊗) Glicose_Claro (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.

A Tabela 5.5 apresenta os demais metabólitos estudados neste trabalho, onde pode ser verificado que a *E. cloacae* se comportou de forma similar nos ensaios 12 ao 15. O ácido acético foi sintetizado em todas as condições com uma produção entre de 1,33 e 1,67 (condição claro com glicose e escuro com glicose, respectivamente). Em relação ao ácido propiônico, é verificado que a concentração pode ser considerada constante ao longo das 108 horas, o ensaio 13 apresenta a maior produção sendo esta de apenas 0,31 g/L. Para o etanol, todos os meios (exceto o controle) apresentaram a síntese do metabólito sem diferenças significativas dessas concentrações.

Tabela 5.5: Concentração inicial e final do ácido láctico, ácido propiônico e etanol para *E. cloacae*.

Condição	Ácido Láctico (g/L)			Ácido Propiônico (g/L)			Etanol (g/L)		
	Inicial	Final	Δ	Inicial	Final	Δ	Inicial	Final	Δ
Controle Escuro	1,15	1,26	0,11	2,64	2,77	0,13	0,39	0,42	0,03

Glicose Claro	0,50	1,83	1,33	2,07	2,22	0,13	0,22	1,63	1,41
Glicose Escuro	0,25	1,92	1,67	2,01	2,33	0,32	0,21	1,70	1,49
Lactose Claro	1,09	2,55	1,46	2,09	2,25	0,16	0,19	1,87	1,68
Lactose Escuro	0,43	1,67	1,24	2,30	2,57	0,27	0,13	1,87	1,74

Na Figura 5.19 é verificado que a *E. cloacae* produziu hidrogênio em todas as condições em que foi fornecida uma fonte de açúcar. O meio com glicose e iluminação apresentou a maior produtividade máxima (77 mmol H₂/L·dia) em 18 horas, enquanto que os demais ensaios atingiram a produtividade máxima (em torno de 50 mmol H₂/L·dia) a partir de 36 horas. Em relação ao rendimento de hidrogênio, os meios com glicose apresentaram resultados equivalentes, 1,62 e 1,60 mol H₂/mol de hexose para o meio com e sem incidência de luz, respectivamente. Já no meio com lactose a presença de luz promoveu um rendimento de 1,85 mol H₂/mol de hexose, resultado superior em 33% em relação ao meio escuro.

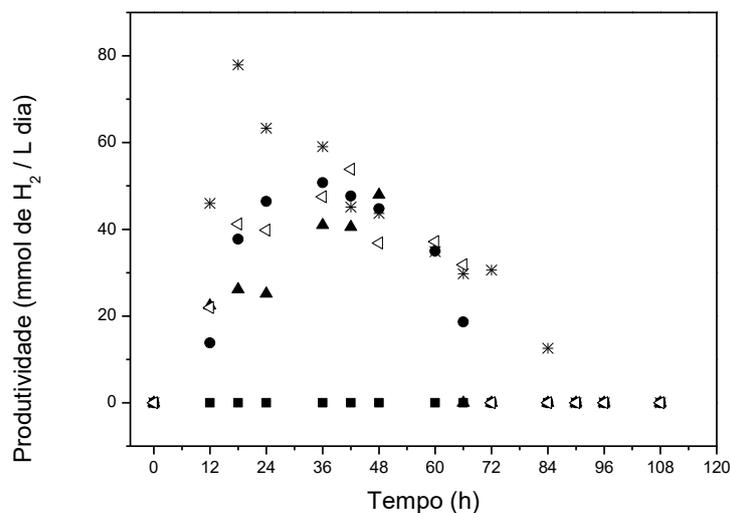


Figura 5.19: Produtividade de hidrogênio em função do tempo de fermentação para a *E. cloacae* com o gás inerte nitrogênio; (■) Controle_Escuro, (x) Glicose_Claro, (●) Glicose_Escuro, (◁) Lactose_Claro e (▲) Lactose_Escuro.

Mohanraj *et al.* (2014) apresentaram em suas pesquisas a produção de hidrogênio na condição de temperatura ambiente utilizando *E. cloacae*, com 10,0 g/L de glicose, e o gás inerte nitrogênio. O rendimento obtido na condição de fermentação escura foi de 1,44 mols de H₂/mol de glicose. Davila-Vazquez *et al.* (2008) comparou a utilização de glicose e permeado de soro de leite para a *E. cloacae* variando as concentrações de substrato e pH. Os maiores

rendimentos obtidos pelos autores foram de 1,46 mols de H₂/mol de hexose (fermentação escura e utilizando glicose) e de 1,80 mols de H₂/mol de hexose (utilizando lactose). Comparando estes dados de literatura como os encontrados no presente trabalho é verificado um rendimento equivalente na condição de luz quando a lactose foi utilizada como substrato (1,85 mols de H₂/mol de hexose), enquanto que, para a glicose este trabalho encontrou (1,65 mols de H₂/mol de hexose) resultado superior em 11% ao relatado pela literatura.

É importante ressaltar que a diferença no comportamento para o sistema de controle em relação aos demais deveu-se à ausência de açúcar.

5.1.2. Avaliação da influência do tipo de gás inerte na fermentação clara

Neste tópico será apresentado o comportamento da *E. aerogenes* e *E. cloacae* na presença do gás inerte argônio na fermentação clara. Os testes desta seção foram realizados para verificar se pode ter ocorrido alguma inibição em virtude da presença de nitrogênio nas fermentações anteriores. Sabe-se que para as cianobactérias e bactérias fotossintéticas o nitrogênio é um inibidor da produção de hidrogênio que é realizada pela enzima nitrogenase, que é a principal enzima produtora de hidrogênio nesses microrganismos (MASEPOHL; HALLENBECK, 2010).

5.1.2.1 *Enterobacter aerogenes*

Nos ensaios 16 e 17, o mesmo comportamento observado anteriormente para os substratos na presença do gás inerte nitrogênio (Ensaio 6 ao 10) foi observado para o gás argônio. A Figura 5.20 apresenta o comportamento da biomassa ao longo da fermentação, a concentração inicial de *E. aerogenes* no meio foi de 0,02 g/L. Utilizando a glicose como fonte de carbono o microrganismo apresenta um rápido crescimento com a fase exponencial ocorrendo entre 0 e 12 horas, assim como observado para o gás inerte nitrogênio. Para o meio com lactose, a falta de afinidade pelo substrato mais uma vez é evidenciada e a fase exponencial ocorre entre 36 e 42 horas. O tempo de duplicação foi de 2,72 e 5,93 horas para glicose e lactose, respectivamente.

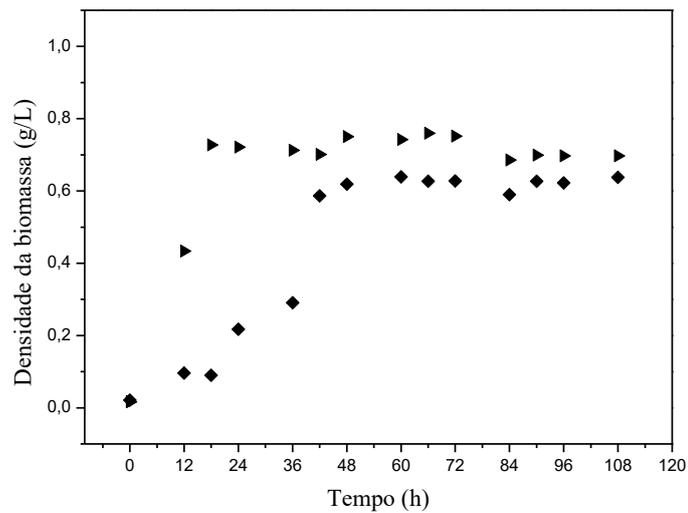


Figura 5.20: Perfil da densidade celular para *E. aerogenes* em função do tempo de fermentação com o gás inerte argônio; (►) Glicose_Claro e (◆) Lactose_claro.

A falta de afinidade pela lactose também pode ser observada na Figura 5.21. Observe-se que o consumo total de glicose foi verificado em 36 horas (6 horas antes do observado para o gás nitrogênio), enquanto aproximadamente 30% da lactose continuou no meio ao final das 108 de fermentação. Nos ensaios em que o nitrogênio foi utilizado como gás inerte para a *E. aerogenes* a concentração de lactose ao final da fermentação foi de aproximadamente 5,0 g/L.

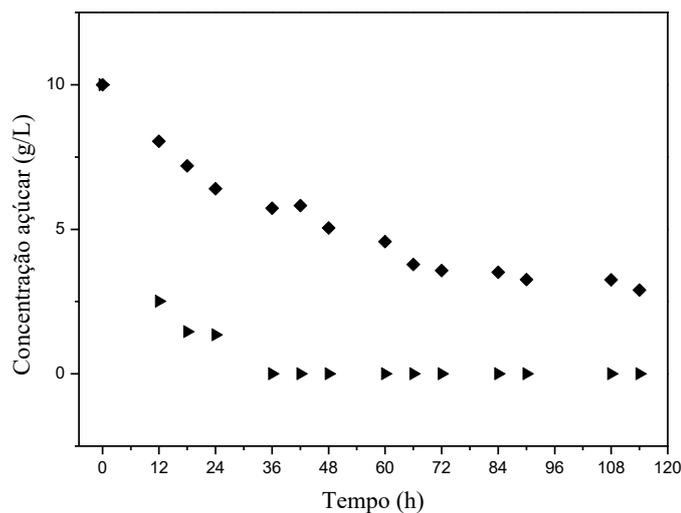


Figura 5.21: Perfil da concentração de açúcar para *E. aerogenes* em função do tempo de fermentação com o gás inerte argônio; (►) Glicose_Claro e (◆) Lactose_claro.

A Figura 5.22 apresenta o comportamento do pH em relação ao tempo para as fermentações com o gás inerte argônio. Nesta imagem, é verificado uma queda mais rápida no pH para o meio com glicose, em 12 horas o pH do ensaio 16 é de 5,56, enquanto que no ensaio com lactose este valor só é atingido em torno de 42 horas. Esse decaimento do pH que pode ser justificada pela produção de ácido, conforme pode ser verificado nas Figura 5.23 e 5.24 e na Tabela 5.6. O meio com glicose apresenta a produção exponencial do ácido láctico nas primeiras 12 horas, enquanto que no meio com lactose está produção ocorre de forma mais lenta e atinge o valor máximo (1,31 g/L) em 48 horas.

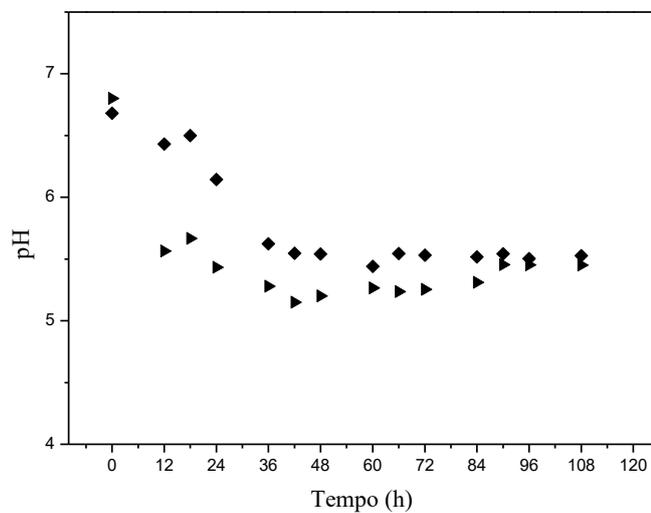


Figura 5.22: Comportamento do pH para *E. cloacae* em função do tempo de fermentação com o gás inerte argônio; (►) Glicose_Claro e (◆) Lactose_claro.

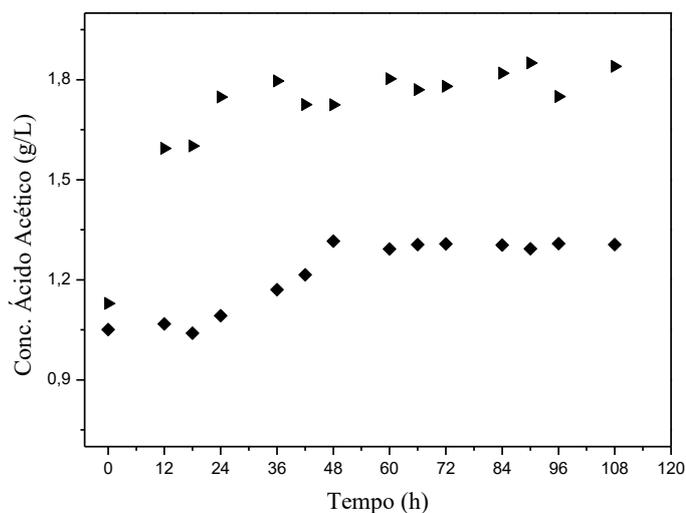


Figura 5.23: Concentração do ácido acético para *E. aerogenes* em função do tempo de fermentação com o gás inerte argônio; (►) Glicose_Claro e (◆) Lactose_claro.

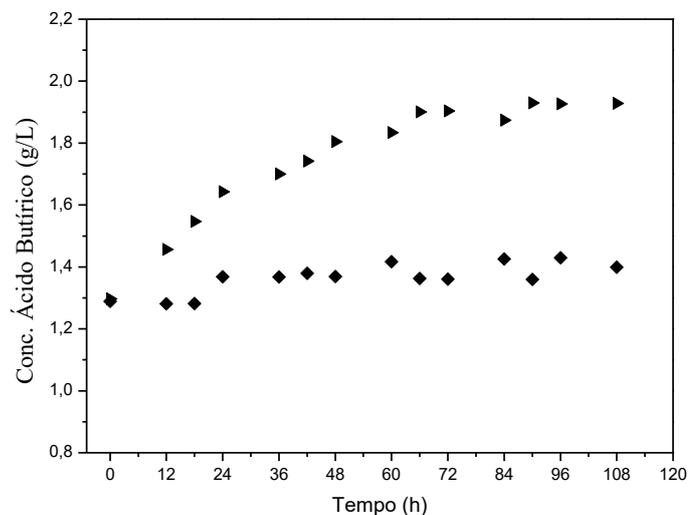


Figura 5.24: Concentração do ácido butírico para *E. aerogenes* em função do tempo de fermentação com o gás inerte argônio; (►) Glicose_Claro e (◆) Lactose_claro.

Em relação ao ácido butírico (Figura 5.24) apenas o meio com glicose apresenta a síntese significativa do metabólito, que é de aproximadamente 0,63 g/L. Já na fermentação com lactose a concentração permaneceu constante, assim como observado para a mesma condição com o gás nitrogênio.

Tabela 5.6: Concentração inicial e final do ácido láctico, ácido propiônico e etanol para *E. aerogenes* com o gás inerte argônio.

Condição	Ácido Láctico (g/L)			Ácido Propiônico (g/L)			Etanol (g/L)		
	Inicial	Final	Δ	Inicial	Final	Δ	Inicial	Final	Δ
Glicose Claro	1,70	2,05	0,35	1,88	2,49	0,61	0,53	1,35	0,82
Lactose Claro	1,77	2,18	0,41	1,85	2,88	1,03	0,26	0,81	0,55

A síntese de ácido láctico para os meios com glicose e lactose na presença do gás argônio foram de 0,35 e 0,41 g/L. A maior produção de ácido propiônico também foi verificada para o ensaio com lactose, a produção foi superior em 68% em relação ao meio com glicose. O comportamento observado para estes metabólitos com o gás inerte argônio foram similares ao ensaio com o gás nitrogênio, sendo que para o gás nitrogênio a síntese de ácido láctico ficou em torno de 0,40 g/L e a produção do ácido propiônico também foi superior

para o meio com lactose. Em relação ao etanol, a síntese foi superior em 62% no meio com glicose.

Na Figura 5.25 observa-se que a produtividade foi afetada pelo substrato, uma vez que um rendimento com glicose foi de 67,12 mmol de H₂/L·dia, sendo este superior em aproximadamente 6 vezes quando comparado ao meio com lactose. Quando comparados aos ensaios com nitrogênio na condição clara, é observado que o gás inerte nitrogênio promoveu produtividades superiores em aproximadamente 9% para glicose e 46% para lactose.

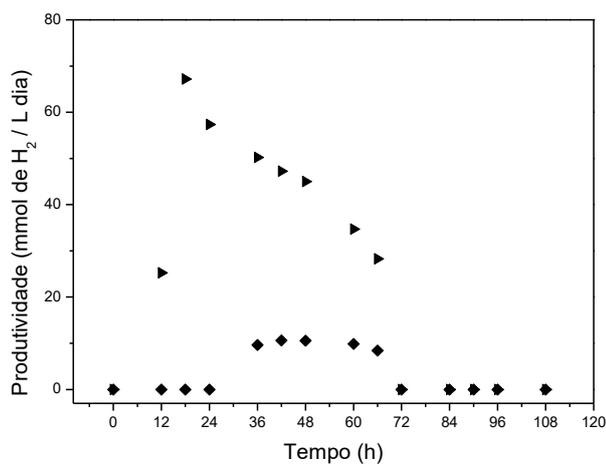


Figura 5.25: Produtividade de hidrogênio em função do tempo de fermentação para a *E. aerogenes* com o gás inerte argônio; (▶) Glicose_Claro, (◆) Lactose_claro.

Em relação ao rendimento de hidrogênio para os meios com glicose foi verificado que não houve diferença em relação ao gás inerte na condição clara, ambos os ensaios apresentaram rendimento de 1,51 mmol de H₂/mol de hexose. Entretanto, o meio com lactose e o gás inerte argônio apresentou o rendimento de 0,38 mmol de H₂/mol de hexose, sendo superior ao ensaio claro com gás inerte nitrogênio que teve rendimento de 0,23 mmol de H₂/mol de hexose. Os dados obtidos neste tópico, evidenciam que provavelmente esta bactéria por não ser fotossintetizante não utiliza a rota nitrogenase para a produção de hidrogênio, uma vez que quando os ensaios foram comparados não houve diferenças significativas.

5.1.2.2 *Enterobacter cloacae*

Os ensaios 18 e 19, utilizando glicose e lactose na presença de luminosidade e o gás inerte argônio, apresentaram o comportamento similar aos ensaios com o gás inerte nitrogênio utilizando esta cepa. Pela Figura 5.26 é verificado que ambos os ensaios tiveram a fase

exponencial nas primeiras 12 horas, com a biomassa atingindo a concentração máxima de 3,47 g/L e 3,03 g/L para glicose e lactose, respectivamente. Os tempos de duplicação da *E. cloacae* foram de 1,86 horas para glicose e 1,92 horas para lactose, estes tempos foram inferiores em 8% e 13% para os respectivos substratos na condição clara com o gás nitrogênio.

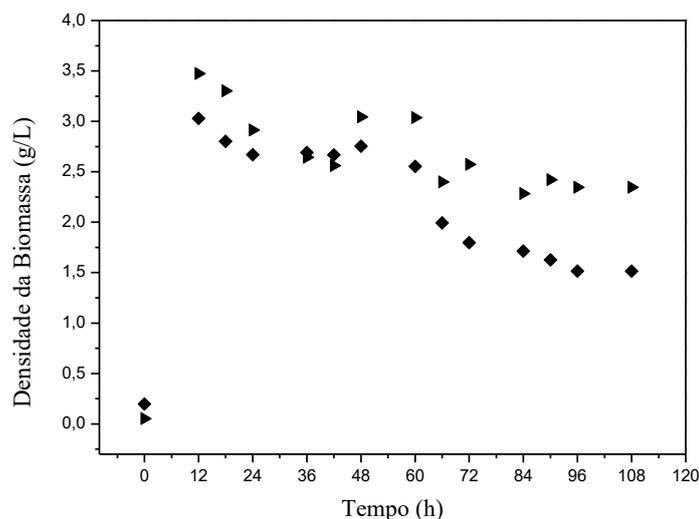


Figura 5.26: Perfil da densidade celular para *E. cloacae* em função do tempo de fermentação com o gás inerte argônio; (►) Glicose_Claro e (◆) Lactose_claro.

Em relação ao consumo de açúcar (Figura 5.27) foi verificado que tanto a glicose quanto a lactose foram consumidos em até 36 horas, período em que ocorreu a queda do pH (Figura 5.28), evidenciando assim a relação entre o consumo do substrato e a síntese de ácidos.

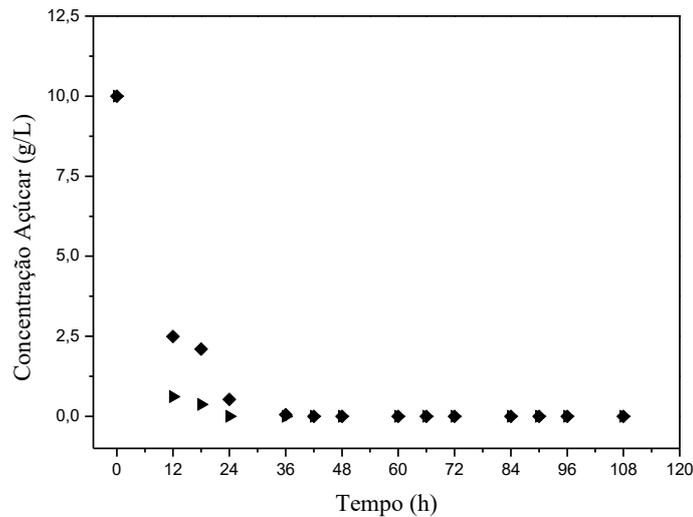


Figura 5.27: Perfil da concentração de açúcar para *E. cloacae* em função do tempo de fermentação com o gás inerte argônio; (►) Glicose_Claro e (◆) Lactose_claro.

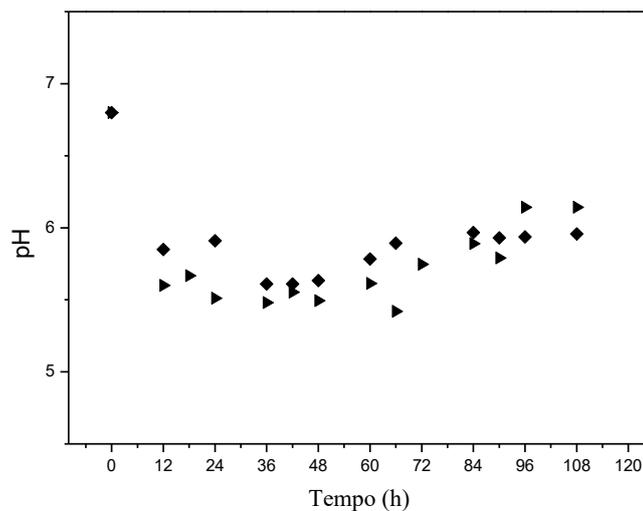


Figura 5.28: Comportamento do pH em função do tempo de fermentação para a *E. cloacae* com o gás inerte argônio; (►) Glicose_Claro e (◆) Lactose_claro.

A produção do ácido acético durante a fermentação com *E. cloacae* pode ser verificada na Figura 5.29. O perfil de síntese do metabólito foi semelhante para ambos os substratos, sendo as concentrações finais de 2,01 e 1,97 g/L para os ensaios 18 e 19, respectivamente. A síntese média de ácido foi de, aproximadamente, 0,77 g/L, enquanto que nos ensaios claro com nitrogênio a síntese média do ácido acético foi de 0,71 g/L. Vale lembrar que as rotas que levam a síntese do ácido acético na fermentação escura podem gerar o rendimento teórico máximo de 4 mols hidrogênio/mol de hexose.

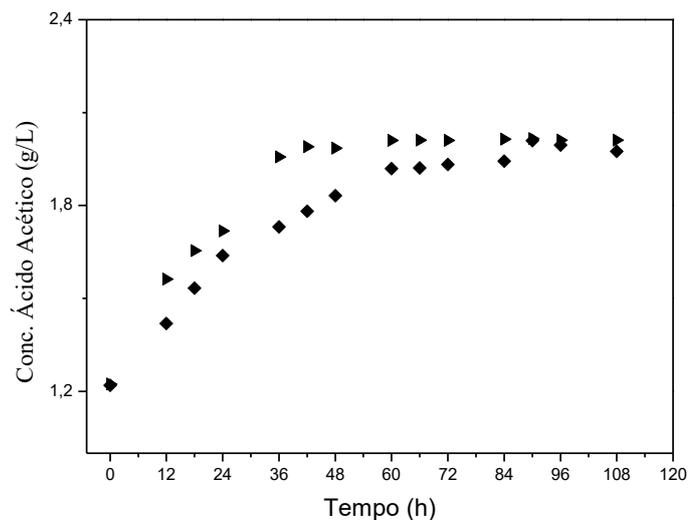


Figura 5.29: Concentração do ácido acético para *E. cloacae* em função do tempo de fermentação com o gás inerte argônio;(►) Glicose_Claro e (◆) Lactose_claro.

A síntese do ácido butírico, representada na Figura 5.30, pode ser verificada ao longo da fermentação com o gás inerte argônio, sendo a produção de 1,07 g/L para o meio com glicose e 0,87 g/L para o meio com lactose. A síntese média deste metabólito é superior em 26% a síntese média do ácido acético. A produção do ácido butírico nestes ensaios (18 e 19) se assemelham ao observado na fermentação clara com o gás nitrogênio, sendo que este último apresentou superioridade em 14% e 40% para os substratos glicose e lactose, respectivamente.

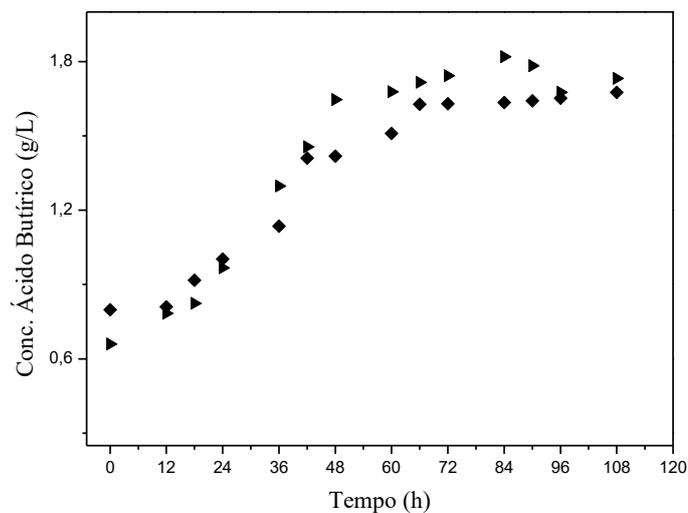


Figura 5.30: Concentração do ácido butírico para *E. cloacae* em função do tempo de fermentação com o gás inerte argônio;(►) Glicose_Claro e (◆) Lactose_claro.

Os demais metabólitos estudados neste trabalho e apresentados na Tabela 5.7 também apresentaram comportamento similar para os substratos. Comparando a síntese de etanol é verificado que a produção foi de 2,02 e 1,83 g/L para glicose e lactose, sendo estes dados superiores em 16% e 8 % aos obtidos nas mesmas condições com o gás nitrogênio.

Tabela 5.7: Concentração inicial e final do ácido láctico, ácido propiônico e etanol para *E. cloacae* com o gás inerte argônio.

Condição	Ácido Láctico (g/L)			Ácido Propiônico (g/L)			Etanol (g/L)		
	Inicial	Final	Δ	Inicial	Final	Δ	Inicial	Final	Δ
Glicose Claro	0,57	1,34	0,77	2,04	2,30	0,26	0,33	2,35	2,02
Lactose Claro	0,98	1,51	0,53	2,10	2,43	0,33	0,29	2,12	1,83

A Figura 5.31 apresenta a produtividade do hidrogênio que atingiu valores próximos em ambos os ensaios, 75,4 e 74,6 mmol de H₂/L·diapara glicose e lactose, respectivamente. Estes valores são equivalentes a produtividade na condição clara com glicose em que o gás nitrogênio foi utilizado, 77,9 mmol de H₂/L·dia. Entretanto, considerando-se o volume de hidrogênio ao longo da fermentação, as diferenças foram significativas quando considerada a influência do gás inerte. Nos ensaios 18 e 19, os rendimentos foram de 2,39 e 2,53 mmol de H₂/mol de hexose enquanto que nos ensaios com nitrogênio os rendimentos foram de 1,62 e 1,85 mol de H₂/mol para glicose e lactose, respectivamente. Sendo assim, os rendimentos para o gás inerte argônio foram superiores em 47% para glicose e 37% para lactose. Esta melhora nos rendimentos com o gás argônio indica a possibilidade da *E. cloacae* ter utilizado também as rotas da nitrogenases para a produção de hidrogênio.

A fermentação escura com o gás inerte argônio na temperatura de 37 °C para *E. cloacae* foi relatada por Khanna *et al.* (2012) utilizando 10,0 g/L de glicose como substrato. O rendimento obtido pelos pesquisadores foi de 1,9 mols de H₂/ mol de hexose. Comparando esse dado aos ensaios 18 e 19 (fermentações em que o gás argônio é utilizado), é verificado que o presente trabalho teve resultados superiores em 25% para a glicose e 33% para a lactose

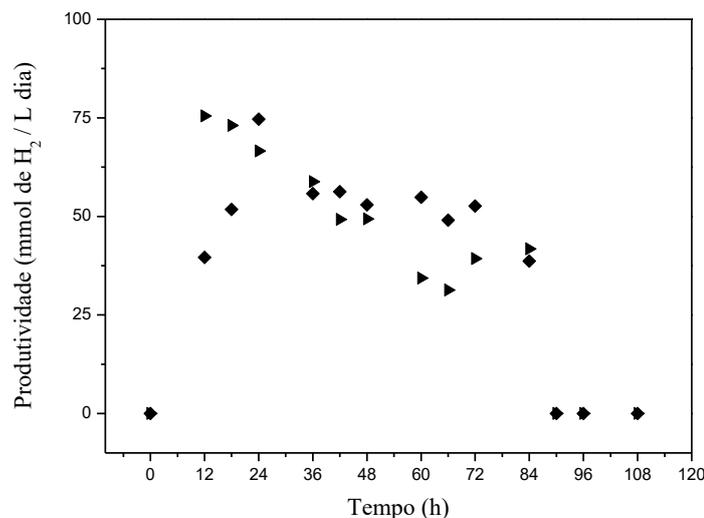


Figura 5.31: Produtividade de hidrogênio em função do tempo de fermentação para a *E. cloacae* com o gás inerte argônio; (▶) Glicose_Claro e (◆) Lactose_claro.

5.1.3. Avaliação do sistema híbrido

Verificando um melhor desempenho e produtividade da *Enterobacter cloacae* em relação *Enterobacter aerogenes*, com rendimentos superiores em até 67%(comparando-se os melhores resultados de cada microrganismo), optou-se por utilizar este microrganismo na continuidade dos experimentos. Dessa forma, o efluente gerado pela *E. cloacae* na ausência de luminosidade utilizando-se glicose como substrato foi utilizado pela mesma bactéria com iluminação constante após ser verificado o consumo do substrato, o que ocorreu em 36 horas. Ressaltando que nenhum pré-tratamento foi empregado ao efluente e que este continha uma densidade de biomassa de 2,21 g/L.

O comportamento da biomassa da *E. cloacae* nos ensaios 20, 21 e 22 pode ser avaliado na Figura 5.32. Os ensaios 20 e 21 partiram da densidade de biomassa de 2,21 g/L, já o ensaio 22, no qual houve o acréscimo de microrganismo, a densidade foi de 2,27 g/L. Na fermentação com efluente bruto, sem nenhuma suplementação, o comportamento do microrganismo permaneceu constante ao longo da fermentação, o que pode ser justificado pela ausência de fonte de carbono. O aumento da densidade foi detectado nos ensaios em que houve suplementação com glicose (Ensaio 21 e 22), sendo que a densidade apresentou uma ligeira superioridade (3%) no meio em que houve acréscimo de microrganismo.

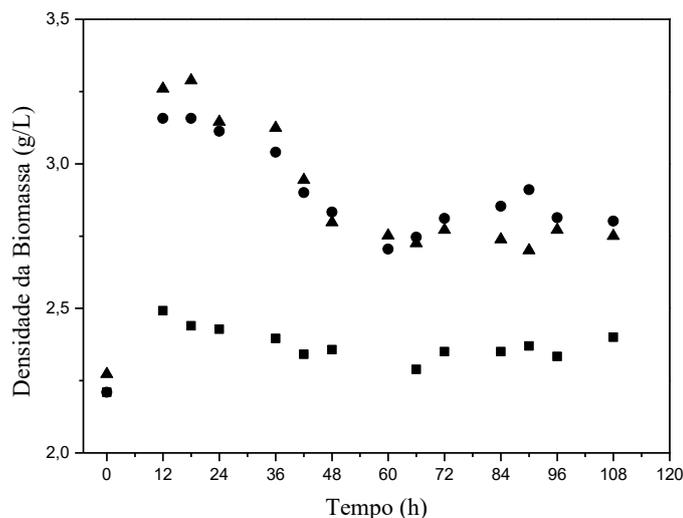


Figura 5.32: Perfil da densidade celular para *E. cloacae* em função do tempo para a fermentação clara utilizando o efluente da fermentação; (■) Efluente bruto, (●) Efluente + Glicose e (▲) Efluente + Glicose + *E. cloacae*.

Para o meio em que utilizou o efluente bruto o pH não sofreu alterações, o que pode ser justificado pela ausência de fonte de carbono não resultando assim geração de metabólitos que causassem a queda do pH (Figura 5.33 e 5.34). Nos ensaios com suplementação de glicose a queda do pH acompanhou o consumo do substrato, sendo que este parâmetro sofreu queda até que toda a glicose fosse consumida, entre 42 e 48 horas.

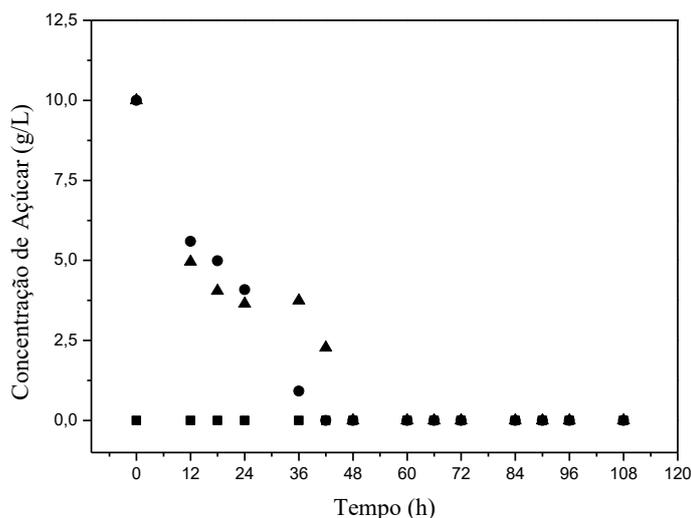


Figura 5.33: Perfil do consumo de açúcar para *E. cloacae* em função do tempo para a fermentação utilizando o efluente da fermentação escura; (■) Efluente, (●) Efluente + Glicose e (▲) Efluente + Glicose + *E. cloacae*.

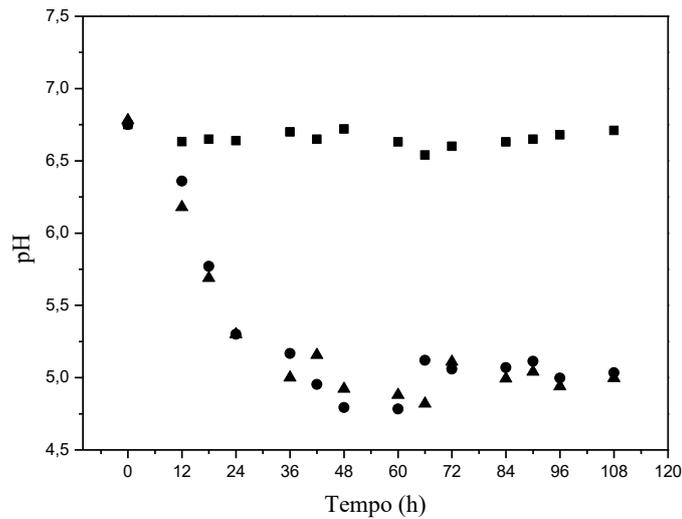


Figura 5.34: Comportamento do pH para *E. cloacae* em função do tempo para a fermentação utilizando o efluente da fermentação escura; (■) Efluente, (●) Efluente + Glicose e (▲) Efluente + Glicose + *E. cloacae*.

A síntese dos ácidos acético e butírico nos ensaios 20, 21 e 22, Figura 5.35 e 5.36, apresentaram o perfil de comportamento semelhante ao encontrado nos ensaios anteriores para *E. cloacae*. Para o meio em que o efluente bruto foi utilizado, ou seja, sem nenhuma modificação, a concentração dos metabólitos sofreram poucas alterações ao longo das 108 horas de fermentação. Enquanto que, para os meios que tiveram acréscimo de glicose a produção dos metabólitos foi verificada e constatado que não houve diferenças significativas entre os ensaios 21 e 22. Avaliando o comportamento destes ácidos a reutilização dos efluentes se mostrou satisfatória, visto que a síntese destes foi equivalente à aquela obtida pela utilização de um meio de cultivo novo.

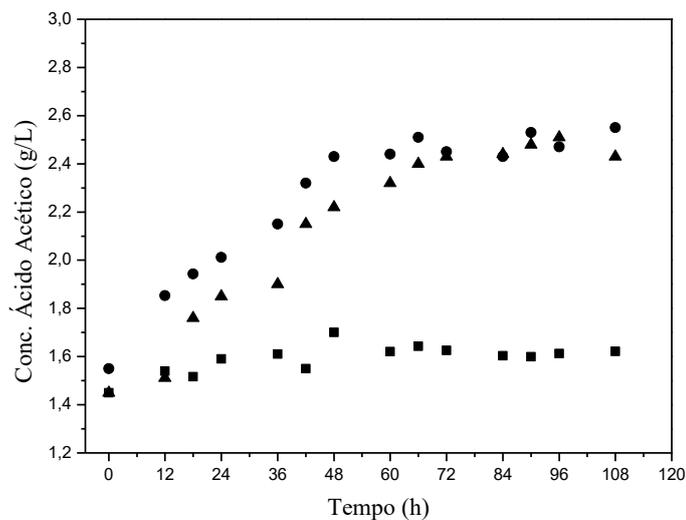


Figura 5.35: Concentração do ácido acético para *E. cloacae* em função do tempo de fermentação com o gás inerte argônio; (■) Efluentes, (●) Efluentes + Glicose e (▲) Efluentes + Glicose + *E. cloacae*.

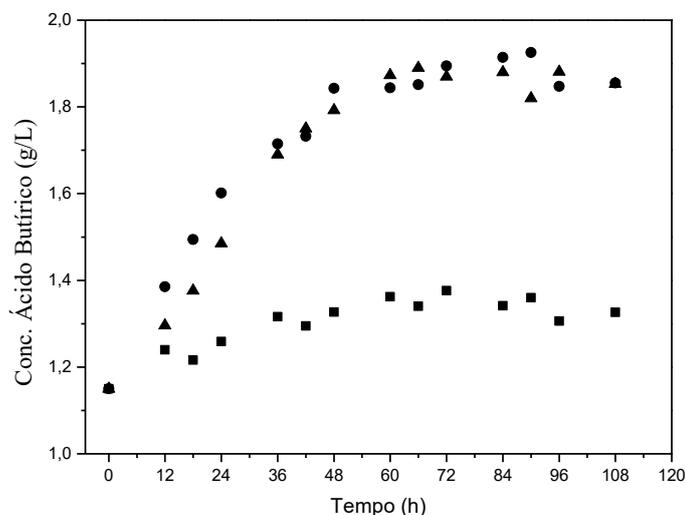


Figura 5.36: Concentração do ácido butírico para *E. cloacae* em função do tempo de fermentação com o gás inerte argônio; (■) Efluentes, (●) Efluentes + Glicose e (▲) Efluentes + Glicose + *E. cloacae*.

Em relação ao ácido láctico, a utilização do efluente suplementado com glicose gerou a síntese de 1,04 e 1,2 g/L do metabólito para os ensaios 21 e 22, respectivamente. Já o ácido propiônico, a concentração pode considerada constante ao longo da fermentação, visto que a síntese máxima foi de 0,21 g/L (Ensaio 21). Quando estes dados são comparados ao obtido para a mesma situação de fermentação com o meio caldo nutriente fresco (Ensaio 18) é

verificado que os ensaios apresentam resultados similares, uma vez que no ensaio 18 a produção de ácido láctico foi de 18 g/L e a do propiônico de 26 g/L.

Tabela 5.8: Concentração inicial e final do ácido láctico, ácido propiônico e etanol para *E. cloacae* em sistema híbrido.

Condição	Ácido Láctico (g/L)			Ácido Propiônico (g/L)			Etanol (g/L)		
	Inicial	Final	Δ	Inicial	Final	Δ	Inicial	Final	Δ
Efluente Bruto	1,98	2,25	0,27	2,61	2,74	0,13	1,60	1,87	1,87
Efluente + Glicose	1,98	3,02	1,04	2,61	2,82	0,21	1,60	3,153	3,15
Efluente + Glicose + <i>E. cloacae</i>	1,98	3,18	1,20	2,61	2,66	0,05	1,60	3,00	3,00

Para o etanol, a utilização do efluente suplementado com glicose gerou uma produção média de 1,45 g/L, este dado é inferior em 13% a síntese na fermentação clara com glicose e gás argônio (Ensaio 18).

Em relação à produtividade de H₂ os ensaios que tiveram acréscimo de glicose apresentaram a produtividade máxima em 18 horas, sendo de 83,5 e 86,1 mmol de H₂/L·diapara o ensaio 21 e 22, respectivamente (Figura 5.37). Embora o comportamento tenha sido semelhante para a produtividade, o ensaio 21 resultou em um rendimento superior atingindo a conversão de 2,01 mols H₂/mol glicose. Por outro lado, no ensaio 22 o rendimento foi de 1,73 mols H₂/mol glicose. A diferença pode ser justificada pelo fato do ensaio 22 ter tido o acréscimo de mais microrganismo, sendo assim uma maior quantidade de glicose pode ter sido utilizada para o crescimento e manutenção ao invés de ser direcionada a produção de metabolitos e hidrogênio.

Comparando a produtividade dos ensaios 18, 21 e 22, no qual a bactéria é exposta as mesmas condições de fermentação (glicose, presença de luz e gás inerte argônio), foi verificado que melhores resultados foram obtidos com o sistema híbrido, sendo que nestes houve superioridade de 10% e 15% para os ensaios 21 e 22, respectivamente, em relação ao ensaio 18.

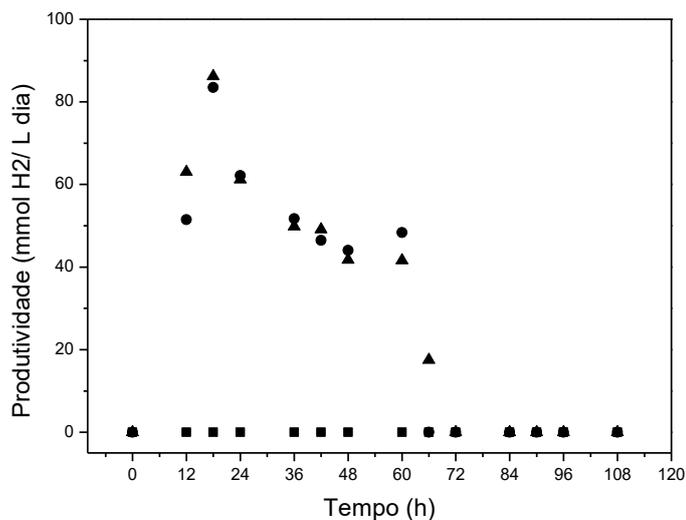


Figura 5.37: Produtividade de H₂ para *E. cloacae* em função do tempo para a fermentação utilizando o efluente da fermentação escura; (■) Efluente, (●) Efluente + Glicose e (▲) Efluente + Glicose + *E. cloacae*.

Ressalta-se que pesquisas com as bactérias do gênero *Enterobacter* são relativamente recentes, dessa forma trabalhos que comparem a utilização de luminosidade, gás inerte e substrato são escassos na literatura.

5.2. Ensaio em reatores de 1,5 L

Nesta seção serão apresentados os ensaios em escala aumentada no reator de 1,5 L. Na primeira etapa o efluente foi produzido no reator de 1,5 L na condição de ausência de luminosidade e com o substrato glicose. Neste reator a fermentação foi mantida enquanto ocorreu a produção de hidrogênio. A concentração de 10,0 g/L foi acrescentada ao reator quando o consumo era detectado e a concentração era inferior a 3,0 g/L, o pH também foi constantemente corrigido para o valor de 6,8.

Na segunda etapa, o sobrenadante da fermentação escura foi utilizado após ser centrifugado e autoclavado. Ao efluente foi acrescentada a bactéria *Enrobacter cloacae* nas condições estipuladas neste trabalho. Os ensaios 24 e 25 foram realizados com o efluente bruto e diluído em 50% com caldo nutriente, respectivamente.

5.1.1 Fermentação escura

A Figura 5.38 apresenta o comportamento da biomassa da *E. cloacae* ao longo da fermentação. Nota-se que nas primeiras 142 horas há um aumento expressivo de 0,07 g/L para 9,27 g_{biomassa}/L. Após esse período, a densidade celular se manteve com pouca variação até o tempo de 384 horas. Em seguida, ocorre um decaimento da concentração celular até o fim do processo fermentativo (432 horas). O aumento da biomassa se deve ao fato de glicose ter sido adicionada a fermentação quando o seu consumo era observado e a concentração era inferior a 3,0 g/L, o que na maioria dos casos ocorreu em intervalos de 24 horas (Figura 5.39).

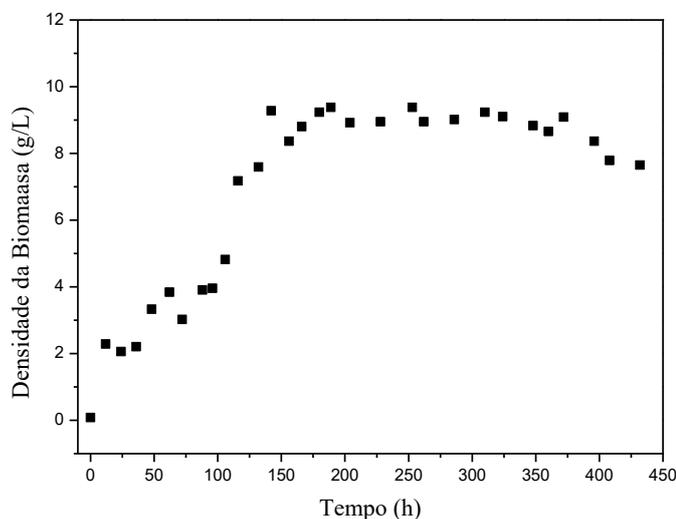


Figura 5.38: Perfil da densidade celular para fermentação escura (*E. cloacae*, reator de 1,5 L).

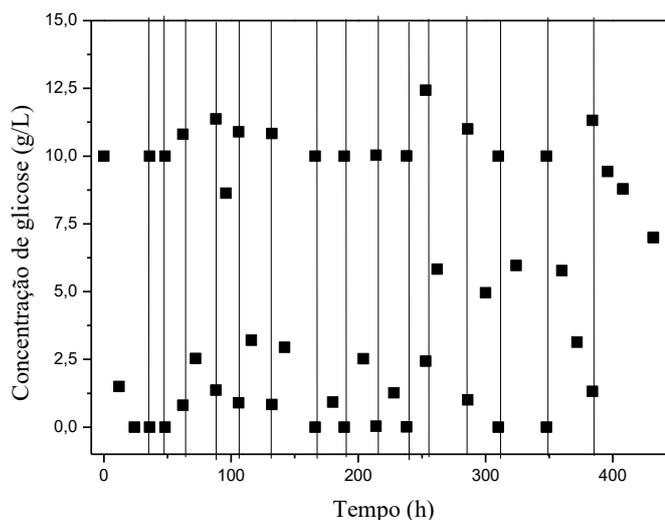


Figura 5.39: Perfil da concentração de glicose para fermentação escura (*E. cloacae*, reator de 1,5 L).

A Figura 5.40 apresenta o perfil do pH ao longo da fermentação, sendo que este foi inicialmente ajustado para 6,8 e ao longo da fermentação foi corrigido para este mesmo valor. A produção e o consumo dos ácidos orgânicos foram responsáveis pela oscilação do parâmetro observada ao longo do processo fermentativo. Na Figura 5.41, constata-se que ocorreu a produção do ácido acético durante o processo fermentativo. Observa-se também sua produção máxima nas primeiras 12 horas de fermentação, com uma concentração de 4,1 g/L, pico este que coincide com valor queda do pH para 4,62 em 12 horas de fermentação (Figura 5.40). Em seguida, sua concentração do ácido passa a oscilar entre picos de consumo e produção ficando em torno de 1,0 g/L.

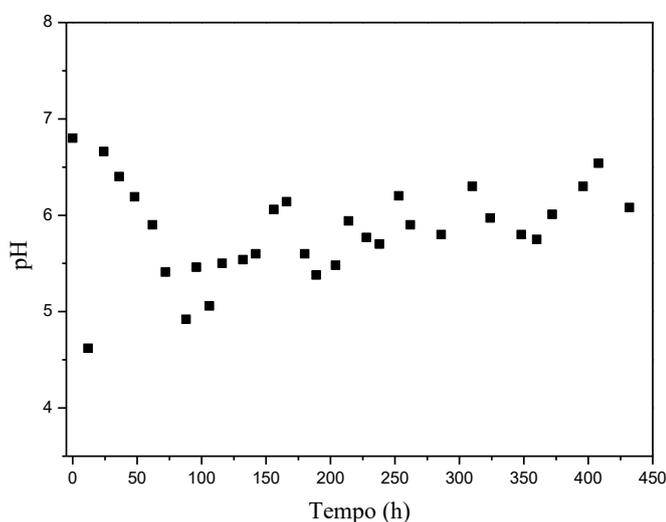


Figura 5.40: Comportamento do pH para a fermentação escura com *E. cloacae* em reator de 1,5 L.

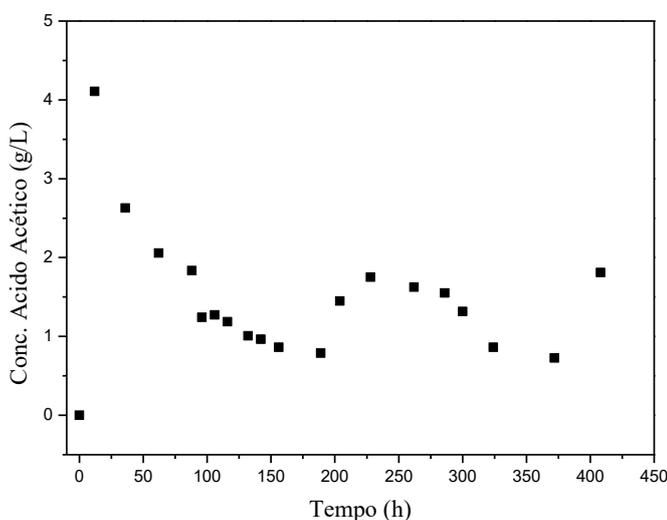


Figura 5.41: Concentração de ácido acético na fermentação escura (*E. cloacae*, reator de 1,5 L).

A Figura 5.42 apresenta a concentração do ácido butírico. Observa-se ao longo da fermentação que este metabólito apresenta uma produção gradual até 252 horas. Em seguida, até o fim da fermentação, sofre pequenas oscilações, atingindo uma concentração final de 30,7 g/L.

Khanna *et al.*, (2012) propuseram em seu trabalho o aumento dos níveis intracelulares de [FeFe] hidrogenase em culturas de *E.cloacae* com o objetivo de aumentar o rendimento de hidrogênio. No microrganismo modificado, os autores verificaram um aumento de 1,2 vezes na síntese de hidrogênio quando os níveis foram aumentados. Em relação à produção de ácidos os pesquisadores observaram que a bactéria com maior concentração nos níveis de [FeFe] hidrogenase apresentou uma maior concentração de ácido acético ao final da fermentação, enquanto que a produção do ácido butírico apresentou queda. Esses dados evidenciam a relação da produtividade de hidrogênio e de metabólitos.

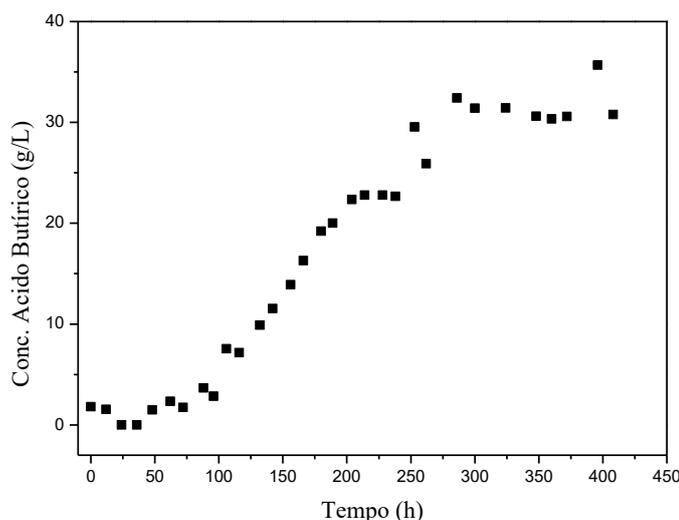


Figura 5.42: Concentração de ácido butírico na fermentação escura (*E. cloacae*, reator de 1,5 L).

A evolução dos ácidos láctico e propiônico que também foram produzidos pela *E. cloacae* está apresentada nas Figura 5.43 e 5.44. Observa-se que a produção do ácido láctico teve início apenas após 96 horas. A produção ocorre até 106 horas, quando atinge a concentração máxima de 10,7 g/L. Após este tempo, a concentração sofre oscilações e a concentração fica em torno de 9,5 g/L. A produção do ácido propiônico pode ser verificada a partir de 36 horas com uma concentração de 3,83g/L. A partir deste ponto a concentração aumenta seguida por oscilações até o final da fermentação.

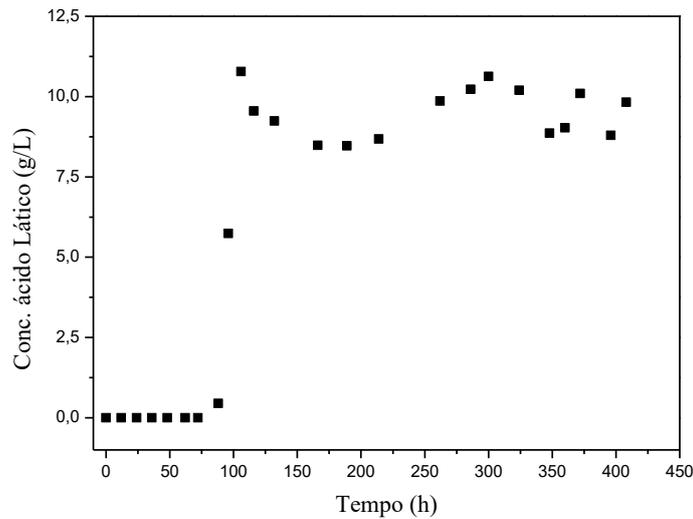


Figura 5.43: Concentração de ácido láctico na fermentação escura (*E. cloacae*, reator de 1,5 L).

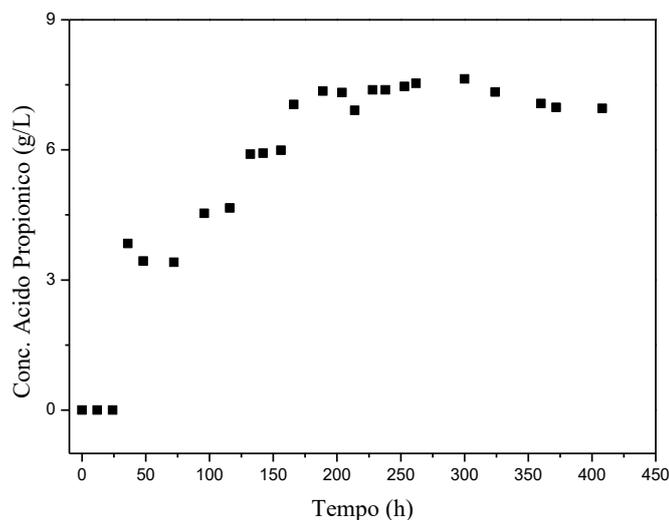


Figura 5.44: Concentração de ácido propiônico na fermentação escura (*E. cloacae*, reator de 1,5 L).

Na Figura 5.45 está apresentada a concentração de etanol que começa a ser sintetizado em torno de 12 horas. A produção ocorre até 88 horas quando a concentração atinge 6,65 g/L. Após este tempo, a concentração oscila entre 4,0 e 6,0 g/L.

Já a produtividade de hidrogênio apresentada na Figura 5.46 mostra um pico em 262 horas (110,09 mmol H₂/L·dia). Após este máximo, a produtividade permanece constante com pequenas quedas até que a produção de hidrogênio seja totalmente extinta após 432 horas. Em termos de rendimento, foi verificado que este aumentou ao longo da fermentação e atingiu ao final o valor de 2,16 mols de H₂/mol de glicose

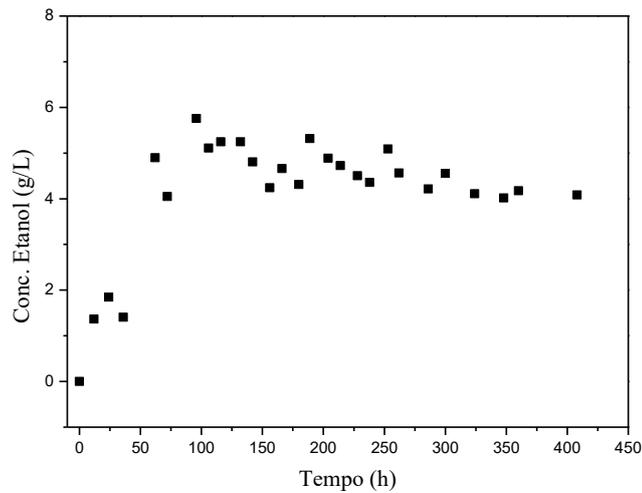


Figura 5.45: Concentração de etanol na fermentação escura (*E. cloacae*, em reator de 1,5 L).

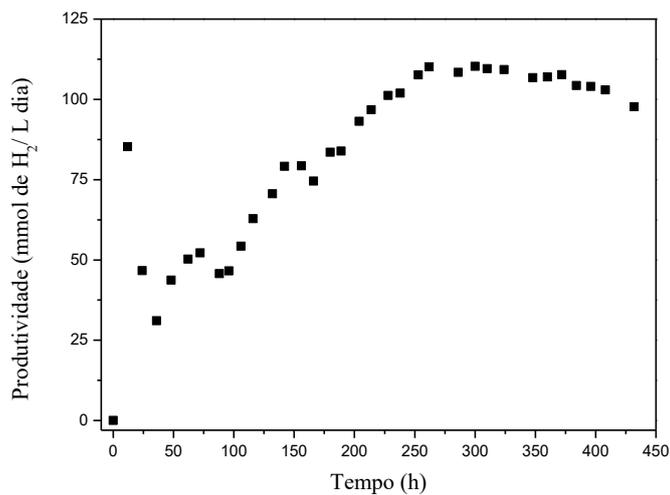


Figura 5.46: Concentração de ácido acético na fermentação escura (*E. cloacae*, reator de 1,5 L).

Comparando a produtividade obtida nas primeiras 12 horas de fermentação no reator de tanque agitado, quando apenas 10,0 g/L de glicose havia sido adicionada a fermentação, com o ensaio em reator de 50 mL utilizando glicose na ausência de luz (Ensaio 12), verifica-se uma superioridade em 40% da produtividade em hidrogênio no reator. Essa melhora pode ser justificada em razão do controle das condições operacionais (temperatura e agitação). Entretanto, essa produtividade é apenas 12 % superior a melhor condição utilizando glicose como substrato em reator de 50 mL, ensaio 18.

Moreira(2016)apresentou em seu trabalho condições equivalentes a estudada neste tópico para um sistema de cultura mista. No trabalho a produtividade máxima foi de 107,33

mmols de $H_2/L \cdot dia$, alcançada em 20 horas de fermentação escura, seguida por uma produtividade decrescente após este tempo. O que se diferencia do ensaio realizado neste tópico, uma vez que após o pico de produtividade (85,26 mmols de $H_2/L \cdot dia$) nas horas iniciais a produtividade volta a aumentar a partir de 106 horas e atinge o valor máximo de 110,09 mmol de $H_2/L \cdot dia$ em 262 horas de fermentação. Com relação ao rendimento, o trabalho de Moreira (2016) atingiu apenas 1,31 mols de H_2/mol de glicose, sendo este valor inferior em aproximadamente 40% ao obtido com a *E. cloacae*.

Além de Moreira (2016), Romão *et al.* (2014) e Silva *et al.* (2016) também estudaram a fermentação em reator CSTR em tempos superiores a 400 horas. Todos os pesquisadores observaram uma diminuição na produtividade com o passar do tempo, diferentemente do observado neste trabalho que ao final da fermentação teve a produtividade de 97,65 mmols de $H_2/L \cdot dia$.

5.2.2 Fermentação clara

A utilização do efluente da fermentação escura na etapa clara almejava a diminuição dos custos com matéria-prima e redução do volume de resíduos gerados na produção de hidrogênio. Verificados os resultados positivos da fermentação da *E. cloacae* na presença de luz utilizando efluente, o sistema híbrido foi proposto em reator de tanque agitado de 1,5 L. O efluente gerado no ensaio 23 foi utilizado na fermentação clara após ser centrifugado e autoclavado, caracterizando a formação do sistema híbrido. Os ensaios 24 e 25 permaneceram sob incidência de luz constante e utilizaram a bactéria *E. cloacae* como inóculo, na mesma relação estabelecida nos ensaios anteriores. A glicose foi utilizada como substrato e a reposição foi realizada ao se observar o consumo da glicose. Os ensaios foram realizados com o efluente bruto e diluído em 50% com caldo nutriente, ensaios 24 e 25, respectivamente.

Nos ensaios realizados nesta etapa não foi verificada a produção de hidrogênio, o que pode ser justificado pela alta concentração de ácidos no efluente gerado na fermentação escura, apresentado nos gráficos das Figuras 5.41 a 5.44. A inibição no desenvolvimento do microrganismo pode ser verificada pela Figura 5.47. No efluente concentrado a densidade da bactéria permaneceu constante e não houve consumo da glicose (Figura 5.48), evidenciando que o microrganismo não se adaptou ao meio. Já no ensaio 23, houve aumento da biomassa até 36 horas, tempo em que houve reposição da glicose e estabelecimento da densidade celular em torno de 4,0 g/L.

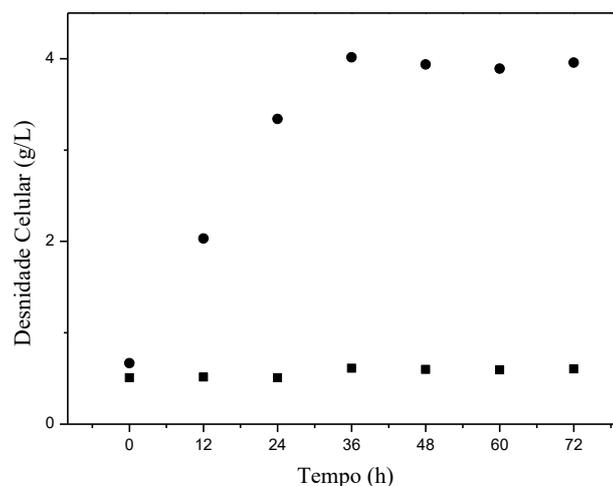


Figura 5.47: Perfil da densidade celular para a fermentação clara com *E. cloacae* em reator de 1,5 L; (■) Efluente concentrado, (●) Efluente diluído.

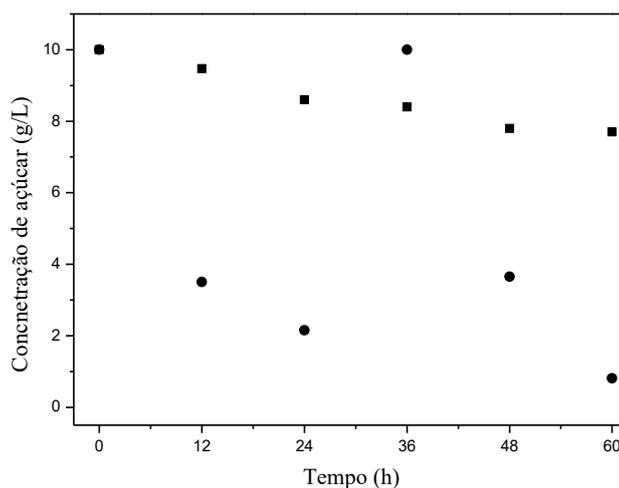


Figura 5.48: Perfil do consumo de açúcar para a fermentação clara com *E. cloacae* em reator de 1,5 L; (■) Efluente concentrado, (●) Efluente diluído.

A inibição no desenvolvimento do microrganismo nesta etapa, bem como a não produção de hidrogênio, indicam que a utilização do efluente da fermentação escura após 432 horas de fermentação não é viável para a formação do sistema híbrido. Sendo necessário que a fermentação cesse antes do meio estar exaurido e concentração de metabólitos seja baixa. Outra possibilidade seria aumentar a diluição do efluente para diminuir a toxicidade. Por fim, a Tabela 5.9 apresenta os dados sumarizados e uma breve comparação com a literatura.

Tabela 5.9: Tabela comparativa dos dados apresentados neste trabalho e segundo literatura consultada

Microrganismo	Substrato	Iluminação	Gás inerte	Volume do reator (L)	Rendimento (mol H₂/mol hexose)	Referência
<i>E. aerogenes</i>	Glicose	Ausente	Nitrogênio	0,05	0,94	Este trabalho
<i>E. aerogenes</i>	Glicose	Presente	Nitrogênio	0,05	1,51	Este trabalho
<i>E. aerogenes</i>	Glicose	Presente	Argônio	0,05	1,51	Este trabalho
<i>E. aerogenes</i>	Lactose	Ausente	Nitrogênio	0,05	0,05	Este trabalho
<i>E. aerogenes</i>	Lactose	Presente	Nitrogênio	0,05	0,23	Este trabalho
<i>E. aerogenes</i>	Lactose	Presente	Argônio	0,05	0,38	Este trabalho
<i>E. aerogenes</i> ATCC13408	Glicose	Ausente	Nitrogênio	0,3	1,2	ZHAO et al. (2017)
<i>E. aerogenes</i> ATCC13408 HycE	Glicose	Ausente	Nitrogênio	0,3	2,16	ZHAO et al. (2017)
<i>E. aerogenes</i> MTCC 2822	Lactose	Ausente	Nitrogênio	0,1	1,04	Rai e Singh (2016)
<i>E. cloacae</i>	Glicose	Ausente	Nitrogênio	0,05	1,60	Este trabalho
<i>E. cloacae</i>	Glicose	Presente	Nitrogênio	0,05	1,62	Este trabalho
<i>E. cloacae</i>	Glicose	Presente	Argônio	0,05	2,39	Este trabalho
<i>E. cloacae</i>	Lactose	Ausente	Nitrogênio	0,05	1,39	Este trabalho
<i>E. cloacae</i>	Lactose	Presente	Nitrogênio	0,05	1,85	Este trabalho
<i>E. cloacae</i>	Lactose	Presente	Argônio	0,05	2,53	Este trabalho
<i>E. cloacae</i>	Efluente + Glicose	Presente	Argônio	0,05	2,01	Este trabalho
<i>E. cloacae</i>	Efluente + Glicose + 1,6% <i>E. cloacae</i>	Presente	Argônio	0,05	1,73	Este trabalho
<i>E. cloacae</i>	Glicose	Ausente	Nitrogênio	1,5	2,16	Este trabalho
<i>E. cloacae</i>	Glicose	Ausente	Nitrogênio	0,25	1,44	Mohanraj et al. (2014)
<i>E. cloacae</i>	Glicose	Ausente	Nitrogênio	0,12	1,46	Davila-Vazquez et al. (2008)
<i>E. cloacae</i>	Lactose	Ausente	Nitrogênio	0,12	1,8	Khanna et al. (2012)

A Tabela 5.9 mostrou de forma sintetizada os rendimentos obtidos dos ensaios 1 ao 25 e algumas das referências citadas neste trabalho. De forma geral, foi verificado melhores resultados em relação à bactéria *E. cloacae*, quando comparado a *E. aerogenes*. Em relação à literatura, os ensaios apresentaram resultados superiores ou equivalentes, com exceção da fermentação utilizando lactose como substrato para *E. aerogenes*.

A produção de metabólitos também foi monitorada, sendo verificada a síntese dos metabólitos associados à produção de hidrogênio, como o etanol e os ácidos acético e butírico. O que pode indicar que a rota metabólica apresentada na Figura 3.2 foi utilizada pelas espécies, permitindo assim o melhor entendimento da produção do hidrogênio.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados foi possível observar que a utilização das bactérias *E. cloacae* e *E. aerogenes* como alternativa para obtenção de hidrogênio é uma tecnologia com potencial para a produção deste biocombustível.

Ensaio em reator de 50 mL.

- A utilização da *Lactobacillus paracasei* neste estudo não se mostrou atraente. A bactéria produtora de ácido lático se tornaria uma competidora pelo substrato o que poderia causar uma diminuição na produção de hidrogênio, caso fosse estabelecida a co-cultura com as bactérias *E. cloacae* e *E. aerogenes*.
- Nos ensaios com a *E. aerogenes* o substrato foi a variável que mais afetou a síntese de hidrogênio. A utilização do permeado de soro de queijo como fonte de carbono apresentou produtividades inferiores quando comparada as mesmas condições com a utilização da glicose. A melhor produtividade para a *E. aerogenes* com soro de queijo foi de 15,48 mmol de H₂/L·dia na condição clara com o gás nitrogênio, enquanto que com a glicose a produtividade máxima foi de 73,75 mmol de H₂/L·dia na presença de luz e gás nitrogênio.
- A incidência de luz também influenciou a produção de hidrogênio para a *E. aerogenes*, os ensaios com iluminação e utilização de glicose obtiveram resultados mais expressivos com rendimentos de 1,51 mols H₂/mol de lactose.
- Nos ensaios com *E. cloacae* foi verificado a afinidade da bactéria por ambos os substratos, além de pouca influência da luz para os ensaios com utilização do gás inerte nitrogênio.
- Para a *E. cloacae* o gás inerte argônio gerou os melhores resultados para a produção de hidrogênio, rendimentos superiores em 47% e 37% para glicose e lactose, respectivamente;
- A utilização do efluente da fermentação escura no ensaio híbrido apresentou melhores produtividades em relação aos ensaios anteriores com a *E. cloacae*. Neste teste também foi verificado que o acréscimo de mais microrganismos não gerou melhores resultados, uma vez que o rendimento foi inferior em 5%.

-
- A *E. cloacae* apresentou-se como um microrganismo promissor para a produção de hidrogênio com ambos os substratos, sendo que os dados obtidos na fermentação com gás argônio foi superior em relação aos demais ensaios deste trabalho e em relação a literatura pesquisada.

Ensaio em reator de 1,5 mL.

- Na fermentação escura a bactéria apresentou uma boa adaptação ao meio com a biomassa apresentando taxa de crescimento até 142 horas.
- Das rotas metabólicas que levam a formação do hidrogênio, observou-se o predomínio da fermentação tipo butírica. Os resultados indicam que o ácido butírico foi o principal metabólito produzido, correspondendo a aproximadamente 52 % da concentração final dentre metabolitos avaliados.
- A reposição do substrato ao meio fermentado proporcionou a produtividade máxima de 110,09 mmol de H₂/L·dia. e o rendimento de 2,16 mols de H₂/mol de hexose.
- A alta concentração de ácidos inibiu o desenvolvimento da *E. cloacae* quando o efluente da fermentação escura foi utilizado na fase clara.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Fermentação com *E. cloacae* em reator de 1,5 litros presença de luz.
- Análise mais aprofundada do emprego do sistema híbrido com a bactéria *E.cloacae*, com maior diluição do efluente da fermentação escura.
- Avaliar a fermentação em escala ampliada para o permeado de soro de leite.
- Avaliar a produção de hidrogênio com a formação de sistema híbrido entre *E. cloacae* e alguma bactéria fotossintetizante (*R. capsulatus* e *R. palustres*).
- Estudar a bioestimulação com *E.cloacae* no consórcio micrombiano.
- Investigar a influência da temperatura em sistemas com *E. cloacae*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARGUN, H.; KARGI, F.; KAPDAN, I. K.; OZTEKIN, R. Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: Effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 7, p. 1813–1819, abr. 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.01.038>

ASADA, Y.; TOKUMOTO, M.; AIHARA, Y.; OKU, M.; ISHIMI, K.; WAKAYAMA, T.; MIYAKE, J.; TOMIYAMA, M.; KOHNO, H. Hydrogen production by co-cultures of Lactobacillus and a photosynthetic bacterium, Rhodobacter sphaeroides RV. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, n. 11, p. 1509–1513, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.06.017>

AZADI, P.; MALINA, R.; BARRETT, S. R. H.; KRAFT, M. The evolution of the biofuel science. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p. 1479–1484, set. 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.181>

BARBOSA, M. J.; ROCHA, J. M. S.; TRAMPER, J.; WIJFFELS, R. H. Acetate as a carbon source for hydrogen production by photosynthetic bacteria. *Journal of Biotechnology*, v. 85, n. 1, p. 25–33, 23 jan. 2001.

[https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00368-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00368-0)

BOODHUN, B. S. F.; MUDHOO, A.; KUMAR, G.; KIM, S.-H.; LIN, C.-Y. Research perspectives on constraints, prospects and opportunities in biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.04.077>

BP GLOBAL. BP's role in a lower carbon future. Disponível em: <<http://www.bp.com/en/global/corporate/sustainability/climate-change/lower-carbonfuture.html>>.

BUNDHOO, M. A. Z.; MOHEE, R. Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 16, p. 6713–6733, 4 maio 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.057>

CARNEIRO, M. L. N. M.; PRADELLE, F.; BRAGA, S. L.; GOMES, M. S. P.; MARTINS, A. R. F. A.; TURKOVICS, F.; PRADELLE, R. N. C. Potential of biofuels from algae: Comparison with fossil fuels, ethanol and biodiesel in Europe and Brazil through life cycle assessment (LCA). **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 632–653, jun. 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.01.152>

CHEN, C.-Y.; LIU, C.-H.; LO, Y.-C.; CHANG, J.-S. Perspectives on cultivation strategies and photobioreactor designs for photo-fermentative hydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 18, p. 8484–8492, set. 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.082>

CHOJNACKA, A.; BŁASZCZYK, M. K.; SZCZĘSNY, P.; NOWAK, K.; SUMIŃSKA, M.; TOMCZYK-ŻAK, K.; ZIELENKIEWICZ, U.; SIKORA, A. Comparative analysis of hydrogen-producing bacterial biofilms and granular sludge formed in continuous cultures of fermentative bacteria. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 21, p. 10057–10064, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.063>

CRUZ, F. E. da. **Produção de hidrogênio em refinarias de petróleo: avaliação exergética e custo de produção**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica de Energia de Fluidos) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. doi:10.11606/D.3.2010.tde-17082010-123008.

DAVILA-VAZQUEZ, G.; ALATRISTE-MONDRAGÓN, F.; DE LEÓN-RODRÍGUEZ, A.; RAZO-FLORES, E. Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH.

International Journal of Hydrogen Energy, v. 33, n. 19, p. 4989–4997, out. 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.06.065>

OLIVEIRA, F. C.; COELHO, S. T. History, evolution, and environmental impact of biodiesel in Brazil: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 75, p. 168–179, ago. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.10.060>

DEMAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Bacteriol*, 1960. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>

DINCER, I.; ACAR, C. Review and evaluation of hydrogen production methods for better sustainability. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 40, n. 34, p. 11094–11111, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.12.035>

ELSHARNOUBY, O.; HAFEZ, H.; NAKHLA, G.; EL NAGGAR, M. H. A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, n. 12, p. 4945–4966, 22 abr. 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.02.032>

EROGLU, E.; MELIS, A. Photobiological hydrogen production: Recent advances and state of the art. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 18, p. 8403–8413, set. 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.026>

ESCOBAR, J. C.; LORA, E. S.; VENTURINI, O. J.; YÁÑEZ, E. E.; CASTILLO, E. F.; ALMAZAN, O. Biofuels: Environment, technology and food security. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 6–7, p. 1275–1287, ago. 2009.

FANG, H. H. P.; LIU, H. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. **Bioresource Technology**, v. 82, n. 1, p. 87–93, mar. 2002.
[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00110-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00110-9)

FERCHICHI, M.; CRABBE, E.; GIL, G.-H.; HINTZ, W.; ALMADIDY, A. Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. **Journal of Biotechnology**, v. 120, n. 4, p. 402–409, 6 dez. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.05.017>

HALLENBECK, P.; BENEMANN, J. R. Biological hydrogen production, fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 27, p. 1185-1193, 2002.
HALLENBECK, P. C.; ABO-HASHESH, M.; GHOSH, D. Strategies for improving biological hydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 1–9, abr. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.103>

HALLENBECK, P. C.; LIU, Y. Recent advances in hydrogen production by photosynthetic bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 7, p. 4446–4454, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.11.090>

HSU, C.-W.; LIN, C.-Y. Commercialization model of hydrogen production technology in Taiwan: Dark fermentation technology applications. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 7, p. 4489–4497, 23 fev. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.07.080>

HWANG, M. H.; JANG, N. J.; HYUN, S. H.; KIM, I. S. Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation: the role of pH. **Journal of Biotechnology**, v. 111, n. 3, p. 297–309, 5 ago. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.04.024>

KHANNA, N.; KUMAR, K.; TODI, S.; DAS, D. Characteristics of cured and wild strains of *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 for the improvement of biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 16, p. 11666–11676, ago. 2012. <https://doi.org/10.4056/sigs.4348035>

KREWITT, W.; TESKE, S.; SIMON, S.; PREGGER, T.; GRAUS, W.; BLOMEN, E.; SCHMID, S.; SCHÄFER, O. Energy [R]evolution 2008—a sustainable world energy perspective. **Energy Policy**, v. 37, n. 12, p. 5764–5775, dez. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2009.08.042>

KUCEK, K. T.; CÉSAR-OLIVEIRA, M. A. F.; WILHELM, H. M.; RAMOS, L. P. Ethanolysis of Refined Soybean Oil Assisted by Sodium and Potassium Hydroxides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 84, n. 4, p. 385–392, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11746-007-1048-2>

KUMAR, G.; SIVAGURUNATHAN, P.; PUGAZHENDHI, A.; THI, N. B. D.; ZHEN, G.; CHANDRASEKHAR, K.; KADIER, A. A comprehensive overview on light independent fermentative hydrogen production from wastewater feedstock and possible integrative options. *Energy Conversion and Management*, v. 141, p. 390–402, 1 jun. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.09.087>

KUMAR, N.; DAS, D. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IITBT 08. *Process Biochemistry*, v. 35, n. 6, p. 589–593, jan. 2000. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00109-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00109-0)

LAOCHAROEN, S.; REUNGSANG, A.; PLANGKLANG, P. Bioaugmentation of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* TISTR 895 to enhance bio-hydrogen production of *Rhodobacter sphaeroides* KKU-PS5. **Biotechnology for biofuels**, v. 8, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0375-z>

LEE, D.-J.; SHOW, K.-Y.; SU, A. Dark fermentation on biohydrogen production: Pure culture. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 18, p. 8393–8402, set. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.041>

LI, C.; FANG, H. H. P. Fermentative Hydrogen Production From Wastewater and Solid Wastes by mixed Culture. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 37, p. 39, 2007.

<https://doi.org/10.1080/10643380600729071>

Lindberg, P.; Schütz, K.; Happe, T.; Lindblad, P. A hydrogen-producing, hydrogenase-free mutant strain of *Nostoc punctiforme* ATCC 29133. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 11–12, p. 1291–1296, nov. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00121-0](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00121-0)

LOSS, R. A. Avaliação da produção de hidrogênio por consórcio bacteriano fotoheterotófico. 2011. Universidade de Santa Catarina, 2011. <http://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/95756>

LU, W.; WEN, J.; CHEN, Y.; SUN, B.; JIA, X.; LIU, M.; CAIYIN, Q. Synergistic effect of *Candida maltosa* HY-35 and *Enterobacter aerogenes* W-23 on hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 8, p. 1059–1066, jun. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.07.010>

MASEPOHL, B.; HALLENBECK, P. C. Nitrogen and Molybdenum Control of Nitrogen Fixation in the Phototrophic Bacterium *Rhodobacter capsulatus*. In: Hallenbeck, P. C. (Ed.). *Recent Advances in Phototrophic Prokaryotes*. New York, NY: Springer New York, 2010. p. 49–70. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1528-3_4

MASUKAWA, H.; SAKURAI, H.; HAUSINGER, R. P.; INOUE, K. Sustained photobiological hydrogen production in the presence of N₂ by nitrogenase mutants of the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 34, p. 19444–19451, 20 nov. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.09.090>

MOHANRAJ, S.; KODHAIYOLII, S.; RENGASAMY, M.; PUGALENTHI, V. Phytosynthesized iron oxide nanoparticles and ferrous iron on fermentative hydrogen production using *Enterobacter cloacae*: Evaluation and comparison of the effects. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 23, p. 11920–11929, 4 ago. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.06.027>

MONA, S.; KAUSHIK, A.; KAUSHIK, C. P. Hydrogen production and metal-dye bioremoval by a *Nostoc linckia* strain isolated from textile mill oxidation pond. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3200–3205, fev. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.005>

MOREIRA, F. S. Estudo de diferentes tipos de carbono como substrato para a produção de hidrogênio por meio de fermentação escura e fotofermentação. 2016. Universidade Federal de Uberlândia, 2016.

MORENO, R.; ESCAPA, A.; CARA, J.; CARRACEDO, B.; GÓMEZ, X. A two-stage process for hydrogen production from cheese whey: Integration of dark fermentation and biocatalyzed electrolysis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 1, p. 168–175, 5 jan. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.10.120>

NAGARAJAN, D.; LEE, D.-J.; KONDO, A.; CHANG, J.-S. Recent insights into biohydrogen production by microalgae – From biophotolysis to dark fermentation. **Bioresource Technology**, v. 227, p. 373–387, mar. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.104>

NOIKE, T.; TAKABATAKE, H.; MIZUNO, O.; OHBA, M. Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 11, p. 1367–1371, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00120-9](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00120-9)

OZMIHCI, S.; KARGI, F. Effects of feed sugar concentration on continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution (CWP). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 6–7, p. 876–880, 1 nov. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.07.015>

PALOMO-BRIONES, R.; RAZO-FLORES, E.; BERNET, N.; TRABLY, E. Darkfermentative biohydrogen pathways and microbial networks in continuous stirred tank

reactors: **Novel insights on their control.** *Applied Energy*, v. 198, p. 77–87, 15 jul. 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2017.04.051>

RAFIEENIA, R.; LAVAGNOLO, M. C.; PIVATO, A. Pre-treatment technologies for dark fermentative hydrogen production: Current advances and future directions. **Waste Management**, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.05.024>

RAHMAN, S. N. A.; MASDAR, M. S.; ROSLI, M. I.; MAJLAN, E. H.; Husaini, T.; Kamarudin, S. K.; Daud, W. R. W. Overview biohydrogen technologies and application in fuel cell technology. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 137–162, dez. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.047>

RAI, P. K.; SINGH, S. P. Integrated dark- and photo-fermentation: Recent advances and provisions for improvement. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 44, p. 19957–19971, 26 nov. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.08.084>

RAMACHANDRAN, R.; MENON, R. K. An overview of industrial uses of hydrogen. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 23, n. 7, p. 593–598, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(97\)00112-2](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(97)00112-2)

REN, N.; WANG, B.; HUANG, J. C. Ethanol-Type Fermentation from Carbohydrate in High Rate Acidogenic Reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 54, p. 428–433, 1997.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970605\)54:5<428::AID-BIT3>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970605)54:5<428::AID-BIT3>3.0.CO;2-G)

ROMÃO, B. B. Otimização das variáveis que influenciam a produção de hidrogênio por fermentação escura. 2015. Universidade Federal de Uberlândia, 2015.

ROMÃO, B. B.; BATISTA, F. R. X.; FERREIRA, J. S.; COSTA, H. C. B.; RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. L. 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. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0778-5>

SAKURAI, H.; MASUKAWA, H.; KITASHIMA, M.; INOUE, K. Photobiological hydrogen production: Bioenergetics and challenges for its practical application. **Journal of Photochemistry Reviews**, v. 17, p. 1–25, dez. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2013.05.001>

SAMBUSITI, C.; BELLUCCI, M.; ZABANIOTOU, A.; BENEDEUCE, L.; MONLAU, F. Algae as promising feedstocks for fermentative biohydrogen production according to a biorefinery approach: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 20–36, abr. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.12.013>

SHIN, H.-S.; YOUN, J.-H.; KIM, S.-H. Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 29, n. 13, p. 1355–1363, out. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2003.09.011>

SIKORA, A.; ZIELENKIEWICZ, U.; BŁASZCZYK, M.; JURKOWSKI, M. Lactic Acid Bacteria in Hydrogen-Producing Consortia: On Purpose or by Coincidence ,[2013]. <https://doi.org/10.5772/50364>

Silva, F. T. M. Produção de biohidrogênio por *Rhodobacter capsulatus* utilizando como substrato efluente da fermentação escura. 2015. Universidade Federal de Uberlândia, 2015.

SIVAGURUNATHAN, P.; KUMAR, G.; MUDHOO, A.; RENE, E. R.; SARATALE, G. D.; Kobayashi, T.; Xu, K.; Kim, S.-H.; Kim, D.-H. Fermentative hydrogen production using lignocellulose biomass: An overview of pre-treatment methods, inhibitor effects and detoxification experiences. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 77, p. 28–42, set. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.03.091>

SOLOMON, B. D.; KRISHNA, K. The coming sustainable energy transition: History, strategies, and outlook. **Energy Policy**, v. 39, n. 11, p. 7422–7431, nov. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2011.09.009>

TRCHOUNIAN, K.; SAWERS, R. G.; TRCHOUNIAN, A. Improving biohydrogen productivity by microbial dark- and photo-fermentations: Novel data and future approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 80, p. 1201–1216, dez. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.149>

TURON, V.; TRABLY, E.; FOUILLAND, E.; STEYER, J.-P. Potentialities of dark fermentation effluents as substrates for microalgae growth: A review. *Process Biochemistry*, v. 51, n. 11, p. 1843–1854, nov. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.03.018>

Urbaniec, K.; Bakker, R. R. Biomass residues as raw material for dark hydrogen fermentation – A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 40, n. 9, p. 3648–3658, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.01.073>

V.L. PACHAPUR, S.J. SARMA, S.K. BRAR, Y. LE BIHAN, G. BUELNA, M. V. Biological hydrogen production using co-culture versus mono-culture system. **Environmental Technology Reviews**, v. 4, n. 1, p. 55–70, 2015. <https://doi.org/10.1021/es001979r>

WINTER, C.-J. Into the hydrogen energy economy—milestones. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, n. 7, p. 681–685, jul. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2004.12.011>

WONG, Y. M.; WU, T. Y.; JUAN, J. C. A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 34, p. 471–482, jun. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.008>

YANG, P.; ZHANG, R.; MCGARVEY, J. A.; BENEMANN, J. R. Biohydrogen production

from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 18, p. 4761–4771, dez. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.07.038>

ZAGRODNIK, R.; LANIECKI, M. An unexpected negative influence of light intensity on hydrogen production by dark fermentative bacteria *Clostridium beijerinckii*. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 1039–1043, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.049>

ZHAO, J.; SONG, W.; CHENG, J.; LIU, M.; ZHANG, C.; CEN, K. Improvement of fermentative hydrogen production using genetically modified *Enterobacter aerogenes*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 6, p. 3676–3681, 9 fev. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.08.161>

Zou, C.; Zhao, Q.; Zhang, G.; Xiong, B. Energy revolution: From a fossil energy era to a new energy era. **Natural Gas Industry B**, v. 3, n. 1, p. 1–11, jan. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ngib.2016.02.001>