



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



**Produção de hidrogênio por fotofermentação empregando co-culturas de
bactérias**

Felipe Santos Moreira

Uberlândia – MG
2020



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



**Produção de hidrogênio por fotofermentação empregando co-culturas de
bactérias**

Felipe Santos Moreira

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

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

Uberlândia – MG
2020

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

M838 Moreira, Felipe Santos, 1990-
2020 Produção de hidrogênio por fotofermentação empregando
co-cultura de bactérias [recurso eletrônico] / Felipe
Santos Moreira. - 2020.

Orientador: Vicielma Luiz Cardoso.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pós-graduação em Engenharia Química.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.671>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Engenharia química. I. Cardoso, Vicielma Luiz,1960-,
(Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-
graduação em Engenharia Química. III. Título.

CDU: 66.0

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química
Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 1K, Sala 206 - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34)3239-4249 - www.ppgqe.ufu.br - secppgeq@feq.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Engenharia Química			
Defesa de:	Tese de Doutorado, 07/2020, PPGQE			
Data:	28 de setembro de 2020	Hora de início:	08:30	Hora de encerramento:
Matrícula do Discente:	11623EQU001			
Nome do Discente:	Felipe Santos Moreira			
Título do Trabalho:	Produção de hidrogênio por fotofermentação empregando co-cultura de bactérias			
Área de concentração:	Desenvolvimento de Processos Químicos			
Linha de pesquisa:	Engenharia Bioquímica			
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Produção de Biohidrogênio e de Bioóleo			

Reuniu-se por meio de webconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, assim composta: Professores Doutores: Bruna Vieira Cabral - ICTE/UFTM; José Roberto Delalibera Finzer - PPG-EQ/UNIUBE/Uberaba; Camila Stéfanne Dias Costa - FEQ/Unicamp; Juliana de Souza Ferreira - PPGEQ/UFU; Fabiana Regina Xavier Batista - PPGEQ/UFU e Vicelma Luiz Cardoso - PPGEQ/UFU, orientadora do candidato.

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

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

Aprovado

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

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

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



Documento assinado eletronicamente por **Bruna Vieira Cabral, Usuário Externo**, em 28/09/2020, às 11:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana de Souza Ferreira, Membro de Comissão**, em 28/09/2020, às 11:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiana Regina Xavier Batista, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/09/2020, às 11:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Camila Stéfanne Dias Costa, Usuário Externo**, em 28/09/2020, às 11:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **José Roberto Delalibera Finzer, Usuário Externo**, em 28/09/2020, às 11:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vicelma Luiz Cardoso, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/09/2020, às 11:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site
https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2280466** e o código CRC **FF10FA2F**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas oportunidades concedidas, pelas vitórias conquistadas e pelos bons momentos vividos.

Aos meus pais, José Moreira e Eliene, pelo amor incondicional, incentivo, confiança e educação. Agradeço por estarem ao meu lado em todos os momentos, pela compreensão e dedicação.

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

A minha orientadora, prof. Dr^a. Vicelma Luiz Cardoso, pela confiança, paciência, por todos os conhecimentos transmitidos, por estar sempre disposta a ajudar. Levarei comigo sempre, essa sua energia, motivação, pensamentos positivos. Muito obrigado por tudo!

Em especial as professoras Dr^a. Juliana de Souza Ferreira e Dr^a. Fabiana Regina Xavier Batista, por todo apoio, dedicação, paciência e disponibilidade.

Um agradecimento especial a professora Dr^a. Miriam Maria de Resende, por todo conhecimento de equipamentos transmitidos por ela. Você foi essencial na minha trajetória no laboratório do NUCBIO.

Em especial às minhas amigas Letícia e Marília pela amizade incondicional, pelo apoio e carinho.

Aos colegas de laboratório, que de forma direta ou indireta contribuíram para o meu crescimento profissional. Obrigado pelos ensinamentos, ajuda e amizade.

Aos alunos de iniciação científica, que tanto ajudaram na realização dos experimentos.

Aos funcionários da FEQUI: Ione, Cecília, Silvino, Silvana e Ulisses pela colaboração.

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

A Capes, FAPEMIG, CNPq e VALE S.A. pelo apoio financeiro.

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

Sumário

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	viii
SIMBOLOGIA E ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO 1	12
INTRODUÇÃO.....	12
CAPÍTULO 2	14
OBJETIVOS.....	14
CAPÍTULO 3	15
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Balânco Energético Nacional	15
3.2 Hidrogênio como fonte de energia	16
3.3 Produção biológica de hidrogênio.....	17
3.3.1 Biofotólise da água	19
3.3.3.1 Biofotólise direta	19
3.3.3.2 Biofotólise indireta	20
3.3.2 Fermentação escura (sem adição de luz)	20
3.3.3 Fotofermentação	24
3.4 Microrganismos produtores de hidrogênio	26
3.4.1 Bactérias Fermentativas	27
3.4.2 Bactérias fotossintetizantes	27
3.4.3 Co-cultura	28
3.5 Substratos utilizados para produção de hidrogênio.....	29
3.6 Produtos de valor agregado proveniente do soro de leite.....	31
3.7 Considerações Finais da Revisão Bibliográfica	33

CAPÍTULO 4	34
MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1 Microrganismos	34
4.2 Substrato	36
4.3 Reator.....	36
4.4 Condições dos Ensaios.....	37
4.5 Ensaios de fermentação escura (sem adição de luz) e fotofermentação	37
4.6 Métodos analíticos	40
4.6.1 Quantificação do crescimento celular	40
4.6.2 Quantificação de açúcares e metabólitos formados durante as fermentações.....	41
4.6.3 Quantificação de hidrogênio	41
4.7 Conversão	42
4.8 Produtividade	42
CAPÍTULO 5	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Fermentações avaliando o microrganismo <i>Enterobacter cloacae</i> , com o substrato glicose. 43	
5.1.1 Ensaio 1, com o gás inerte nitrogênio sem presença de luz.....	43
5.1.2 Ensaio 2, com o gás inerte argônio sem presença de luz.....	46
5.1.3 Ensaio 3, com o gás inerte nitrogênio com a presença de luz.....	49
5.1.4 Ensaio 4, com o gás inerte argônio com a presença de luz.....	51
5.1.5 Consolidado dos Ensaios de 1 a 4.....	54
5.2 Fermentações avaliando o microrganismo <i>Enterobacter cloacae</i> , com o substrato lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.	56
5.2.1 Ensaio 5, com o gás inerte nitrogênio sem a presença de luz.....	56
5.2.2 Ensaio 6, com o gás inerte argônio sem a presença de luz.	58
5.2.3 Ensaio 7, com o gás inerte nitrogênio com a presença de luz.....	61
5.2.4 Ensaio 8, com o gás inerte argônio com a presença de luz.....	63

5.2.5	Consolidado dos Ensaios de 5 a 8.....	66
5.3	Fermentações avaliando o sistema de co-cultura em fotofermentação com o meio basal RCV.....	68
5.3.1	Ensaio 9, com o sistema co-cultura <i>Enterobacter cloacae / Rhodopseudomonas palustris</i> , utilizando glicose como fonte de carbono.....	68
5.3.2	Ensaio 10, com o sistema co-cultura <i>Enterobacter cloacae / Rhodobacter capsulatus</i> , utilizando glicose como fonte de carbono.....	70
5.3.3	Ensaio 11, com o sistema co-cultura <i>Enterobacter cloacae / Rhodopseudomonas palustris</i> , utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono.....	73
5.3.4	Ensaio 12, com o sistema co-cultura <i>Enterobacter cloacae / Rhodobacter capsulatus</i> , utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono.....	75
5.3.5	Consolidado dos Ensaios de 9 a 12.....	78
5.4	Fermentações avaliando o sistema de co-cultura em fotofermentação com o meio de cultura Caldo Nutriente.....	80
5.4.1	Ensaio 13, com o sistema co-cultura <i>Enterobacter cloacae / Rhodopseudomonas palustris</i> , utilizando glicose como fonte de carbono	80
5.4.2	Ensaio 14, com o sistema co-cultura <i>Enterobacter cloacae / Rhodobacter capsulatus</i> , utilizando glicose como fonte de carbono.....	83
5.4.3	Ensaio 15, com o sistema co-cultura <i>Enterobacter cloacae / Rhodopseudomonas palustris</i> , utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono.....	85
5.4.4	Ensaio 16, com o sistema co-cultura <i>Enterobacter cloacae / Rhodobacter capsulatus</i> , utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono.....	88
5.4.5	Consolidado dos Ensaios de 13 a 16.....	90
5.5	Fermentações avaliando o sistema de co-cultura em fotofermentação, com os substratos glicose e a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó, com adição alternada.....	92

5.5.1	Ensaio 17, com o sistema co-cultura <i>Enterobacter cloacae</i> / <i>Rhodopseudomonas palustris</i> , utilizando o meio RCV, alternando a fonte de carbono.	93
5.5.2	Ensaio 18, com o sistema co-cultura <i>Enterobacter cloacae</i> / <i>Rhodobacter capsulatus</i> , utilizando o meio RCV, alternando a fonte de carbono.....	95
5.5.3	Ensaio 19, com o sistema co-cultura <i>Enterobacter cloacae</i> / <i>Rhodopseudomonas palustris</i> , utilizando o meio Caldo Nutriente, alternando a fonte de carbono.	98
5.5.4	Ensaio 20, com o sistema co-cultura <i>Enterobacter cloacae</i> / <i>Rhodobacter capsulatus</i> , utilizando o meio Caldo Nutriente, alternando a fonte de carbono.	100
5.5.5	Consolidado dos Ensaios de 17 a 20.....	103
5.8	Considerações Finais	105
CAPÍTULO 6	107
CONCLUSÕES	107
6.1	Sugestões de trabalhos futuros.....	108
CAPÍTULO 7	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
CAPÍTULO 8	124
APÊNDICE A	124
A.1	- Curva de calibração para concentração de lactose.	124
A.2	- Curva de calibração para concentração de glicose.	124
A.3	- Curva de calibração para concentração de etanol.....	124
A.4	- Curva de calibração para concentração de ácido lático.	125
A.5	- Curva de calibração para concentração de ácido acético.....	125
A.6	- Curva de calibração para concentração de ácido propiônico.....	125
A.7	- Curva de calibração para concentração de ácido butírico.	126
A.8	- Curva de calibração para concentração de <i>Enterobacter cloacae</i>	126
A.9	- Curva de calibração para concentração de <i>Rhodopseudomonas palustris</i>	126
A.10	- Curva de calibração para concentração de <i>Rhodobacter capsulatus</i>	127
A.11	- Curva de calibração para concentração de co-cultura.	127

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Participação de energia renováveis na matriz energética.....	15
Figura 3.2. Esquema da biofotólise direta	20
Figura 3.3. Possíveis rotas metabólicas da fermentação escura (sem adição de luz) de carboidratos	22
Figura 4.2 – Módulo Fermentador TE-2003/1,5-E1.....	37
Figura 4.3 - Cromatógrafo utilizado na análise dos metabólitos formados e na quantificação de açúcares.	41
Figura 4.4 - Cromatógrafo utilizado para análise do biogás formado.	41
Figura 5.1 – Produtividade e conversão, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte nitrogênio sem presença de luz e glicose.	44
Figura 5.2 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte nitrogênio sem presença de luz e glicose.	44
Figura 5.3 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte nitrogênio sem presença de luz e glicose.	45
Figura 5.4 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte nitrogênio sem presença de luz e glicose.	45
Figura 5.5 – Produtividade e conversão, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte argônio sem presença de luz e glicose.	47
Figura 5.6 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte argônio sem presença de luz e glicose.	47
Figura 5.7 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte argônio sem presença de luz e glicose.	48
Figura 5.8 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte argônio sem presença de luz e glicose.....	48
Figura 5.9 – Produtividade e conversão, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte nitrogênio com a presença de luz e glicose.....	49
Figura 5.10 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte nitrogênio com a presença de luz e glicose.	50

Figura 5.11 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte nitrogênio com a presença de luz e glicose.....	50
Figura 5.12 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte nitrogênio com a presença de luz e glicose.	51
Figura 5.13 – Produtividade e conversão, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte argônio com a presença de luz e glicose.....	52
Figura 5.14 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte argônio com a presença de luz e glicose.	52
Figura 5.15 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte argônio com a presença de luz e glicose.....	53
Figura 5.16 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte argônio com a presença de luz e glicose....	53
Figura 5.17 – Produtividade e conversão, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte nitrogênio sem a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.....	56
Figura 5.18 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte nitrogênio sem a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.	57
Figura 5.19 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte nitrogênio sem a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.	58
Figura 5.20 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte nitrogênio sem a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.	58
Figura 5.21 – Produtividade e conversão, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte argônio sem a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.	59
Figura 5.22 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte argônio sem a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.	59
Figura 5.23 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte argônio sem a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.	60

Figura 5.24 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte argônio sem a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.....	60
Figura 5.25 – Produtividade e conversão, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte nitrogênio e com a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.....	61
Figura 5.26 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte nitrogênio e com a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.....	62
Figura 5.27 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte nitrogênio e com a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.....	62
Figura 5.28 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte nitrogênio e com a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.....	63
Figura 5.29 – Produtividade e conversão, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte argônio e com a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.....	64
Figura 5.30 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte argônio e com a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.....	64
Figura 5.31 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte argônio e com a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.....	65
Figura 5.32 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, utilizando <i>E. cloacae</i> , com o gás inerte argônio e com a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.....	65
Figura 5.33 – Produtividade e conversão, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. palustris</i> , utilizando glicose como fonte de carbono em meio RCV.....	69
Figura 5.34 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. palustris</i> , utilizando glicose como fonte de carbono em meio RCV.....	69
Figura 5.35 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. palustris</i> , utilizando glicose como fonte de carbono em meio RCV.....	70

Figura 5.36 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. palustris</i> , utilizando glicose como fonte de carbono em meio RCV.....	70
Figura 5.37 – Produtividade e conversão, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. capsulatus</i> , utilizando glicose como fonte de carbono em meio RCV.....	71
Figura 5.38 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. capsulatus</i> , utilizando glicose como fonte de carbono em meio RCV.....	71
Figura 5.39 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. capsulatus</i> , utilizando glicose como fonte de carbono em meio RCV.....	72
Figura 5.40 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. capsulatus</i> , utilizando glicose como fonte de carbono em meio RCV.....	72
Figura 5.41 – Produtividade e conversão, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. palustris</i> , utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio RCV.....	73
Figura 5.42 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. palustris</i> , utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio RCV.....	74
Figura 5.43 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. palustris</i> , utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio RCV.....	74
Figura 5.44 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. palustris</i> , utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio RCV.....	75
Figura 5.45 – Produtividade e conversão, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. capsulatus</i> , utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio RCV.....	76
Figura 5.46 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. capsulatus</i> , utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio RCV.....	76

Figura 5.47 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. capsulatus</i> , utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio RCV.....	77
Figura 5.48 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. capsulatus</i> , utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio RCV.....	77
Figura 5.49 – Produtividade e conversão, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. palustris</i> , utilizando glicose como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.....	80
Figura 5.50 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. palustris</i> , utilizando glicose como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.....	81
Figura 5.51 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. palustris</i> , utilizando glicose como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.....	82
Figura 5.52 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. palustris</i> , utilizando glicose como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.....	82
Figura 5.53 – Produtividade e conversão, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. capsulatus</i> , utilizando glicose como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.....	83
Figura 5.54 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. capsulatus</i> , utilizando glicose como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.....	84
Figura 5.55 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. capsulatus</i> , utilizando glicose como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.....	84
Figura 5.56 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. capsulatus</i> , utilizando glicose como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.....	85
Figura 5.57 – Produtividade e conversão, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. palustris</i> , utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.....	86
Figura 5.58 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. palustris</i> , utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.....	86

Figura 5.59 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. palustris</i> , utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.....	87
Figura 5.60 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. palustris</i> , utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.....	87
Figura 5.61 – Produtividade e conversão, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. capsulatus</i> , utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.....	88
Figura 5.62 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. capsulatus</i> , utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.....	89
Figura 5.63 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. capsulatus</i> , utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.....	89
Figura 5.64 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. capsulatus</i> , utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.....	90
Figura 5.65 – Produtividade e conversão, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. palustris</i> , utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio RCV.....	93
Figura 5.66 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. palustris</i> , utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio RCV.....	94
Figura 5.67 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. palustris</i> , utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio RCV.....	94
Figura 5.68 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. palustris</i> , utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio RCV.....	95
Figura 5.69 – Produtividade e conversão, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. capsulatus</i> , utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio RCV.....	96

Figura 5.70 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. capsulatus</i> , utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio RCV.....	96
Figura 5.71 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. capsulatus</i> , utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio RCV.....	97
Figura 5.72 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. capsulatus</i> , utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio RCV.....	97
Figura 5.73 – Produtividade e conversão, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. palustris</i> , utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio Caldo Nutriente.	98
Figura 5.74 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. palustris</i> , utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio Caldo Nutriente.	99
Figura 5.75 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. palustris</i> , utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio Caldo Nutriente.	99
Figura 5.76 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. palustris</i> , utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio Caldo Nutriente.....	100
Figura 5.77 – Produtividade e conversão, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. capsulatus</i> , utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio Caldo Nutriente.	101
Figura 5.78 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. capsulatus</i> , utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio Caldo Nutriente.	101
Figura 5.79 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. capsulatus</i> , utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio Caldo Nutriente.	102
Figura 5.80 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, com co-cultura de <i>E. cloacae / R. capsulatus</i> , utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio Caldo Nutriente.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Oferta interna de energia 2018/2017	16
Tabela 3.3. Preço de mercado para diferentes compostos.....	31
Tabela 4.1. Composição do meio Caldo Nutriente.....	34
Tabela 4.2 - Componentes do meio RCV.....	35
Tabela 4.3 - Composições da solução de micronutrientes utilizada no meio RCV.....	35
Tabela 4.4: Características do permeado de soro de queijo da Empresa Sooro Concentrado Indústria de Produtos Lácteos Ltda	36
Tabela 4.5: Ensaio avaliando o microrganismo <i>Enterobacter cloacae</i> , utilizando a glicose como substrato.....	38
Tabela 4.6: Ensaio avaliando o microrganismo <i>Enterobacter cloacae</i> , utilizando o Permeado de Soro de queijo como substrato.....	38
Tabela 4.7: Ensaio avaliando o sistema de co-cultura, no meio de cultivo RCV.....	39
Tabela 4.8: Ensaio avaliando o sistema de co-cultura, no meio de cultivo Caldo Nutriente..	39
Tabela 4.9: Ensaio avaliando o sistema de co-cultura, empregando o substrato Permeado de Soro de queijo em pó e glicose de forma alternada.....	40
Tabela 5.1 - Consolidação dos Ensaios de 1 a 4.....	54
Tabela 5.2 - Consolidação dos Ensaios de 5 a 8.....	66
Tabela 5.3 - Consolidação dos Ensaios de 9 a 12.....	78
Tabela 5.4 - Consolidação dos Ensaios de 13 a 16.....	91
Tabela 5.5 - Consolidação dos Ensaios de 17 a 20.....	103

SIMBOLOGIA E ABREVIATURAS

Adenosina trifosfato – ATP

Coenzima – CoA

Continuous Stirred Tank Reactor - CSTR

Demanda biológica de oxigênio – DBO

Demanda química de oxigênio – DQO

Dióxido de carbono – CO₂

Ferrodoxina – Fd

Fotossistema I – PSI

Fotossistema II – PSII

Hidrogênio - H₂

Nitrogênio – N₂

Oxigênio – O₂

Potencial hidrogeniônico - pH

Púrpuras não sulfurosas – PNS

Rotações por minuto – rpm

Rhodobacter capsulatus V minimal médium – RCV

RESUMO

A produção de hidrogênio por via biológica é uma alternativa sustentável, pois demanda baixa quantidade de energia e tem a capacidade da utilização de matérias primas renováveis como os substratos. A conversão de compostos orgânicos a hidrogênio no processo de fotofermentação, tem atraído interesse na sua utilização, por apresentar altos rendimentos teóricos de conversão de substrato. A combinação de grupos diferentes de bactérias cultivadas em um único biorreator apresenta como vantagens a simples manipulação, a redução de tempo de fermentação e taxas altas de rendimento. No presente trabalho, o objetivo foi estudar a produção de hidrogênio por fotofermentação, utilizando a bactéria *Enterobacter cloacae* e as bactérias fotossintetizantes púrpuras não sulfurosas: *Rhodobacter capsulatus* e *Rhodopseudomonas palustris*. As fontes de carbono utilizadas foram glicose P.A. e o permeado de soro de queijo em pó (70% lactose), que é um subproduto agroindustrial. Os ensaios foram realizados em reator operando em batelada alimentada, verificando a influência de: meio de cultivo, fonte de açúcar, presença de luminosidade, gás inerte e formas de alimentação do substrato para a produção de hidrogênio. Verificou-se que o microrganismo *Enterobacter cloacae* apresentou resultados promissores para a produção de hidrogênio, utilizando nitrogênio ou argônio como gases inertes, na presença ou não de luminosidade, caracterizando a sua capacidade de metabolizar os substratos em diferentes condições. Avaliando a influência dos meios de cultivos no sistema de co-cultura, o meio reacional caldo nutriente alcançou uma produtividade máxima de 201,15 mmol H₂/L.dia, com a *Enterobacter cloacae* e *Rhodobacter capsulatus* (permeado de soro de queijo em pó), visto que, a sua composição oferece a quantidade de carbono e nitrogênio total, provenientes dos reagentes extrato de carne e peptona, presentes na composição do meio, impactando diretamente na produção de hidrogênio. Os ensaios com alimentação alternada da fonte de carbono ao meio reacional, promoveram a maior produtividade de hidrogênio. O valor máximo de produtividade obtido foi de 319,35 mmol H₂/L.dia no tempo de 180 horas. Os metabólitos formados durante o processo fermentativo, foram obtidos em quantidades significativas, com destaque para os ácidos butírico, lático e acético, predominantes nas rotas metabólicas de produção de hidrogênio.

Palavras-chave: Co-cultura; *Enterobacter cloacae*; Fotofermentação; Hidrogênio; *Rhodobacter capsulatus* e *Rhodopseudomonas palustris*.

ABSTRACT

Hydrogen production by biological is a sustainable alternative because it demands a low amount of energy for its production and has the capacity to use renewable raw materials as substrates. The conversion of organic compounds to hydrogen in the photofermentation process has attracted interest in their use, as it presents high theoretical substrate conversion yields. Combining different groups of bacteria grown in a single bioreactor provides advantages of simple handling, reduced fermentation time and high yield rates. In this present study, the objective was study the production of hydrogen by photofermentation using *Enterobacter cloacae* bacteria and photosynthetic purple non-sulfur bacteria: *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodopseudomonas palustris*. The carbon sources used were glucose P.A. and the whey permeate (70 % lactose), that is an agroindustrial residue. The assays were carried out in fed batch reactor, checking the influence of: culture medium, sugar source, light, inert gas and substrate feeding forms. The *Enterobacter cloacae* microorganism showed satisfactory results for hydrogen production, using nitrogen or argon as inert gases, with or without the presence of light, characterizing its ability to metabolize under different conditions. Evaluating the culture media in the co-culture system, the nutrient broth reaction medium reached a maximum productivity of 201.15 mmol H₂/L.day, with *Enterobacter cloacae* and *Rhodobacter capsulatus* (whey permeate), since its composition offers the amount of carbon and total nitrogen, derived from meat extract and peptone reagents, present in the medium composition, directly impacting the hydrogen production. In the tests with the alternation feeding of the carbon source to the reaction medium, promoted the highest hydrogen productivity, being the maximum of 319.35 mmol H₂/L.day in the 180 hours time. The metabolites formed during the fermentation process were obtained in significant quantities, especially butyric, lactic and acetic acid, predominating the metabolic pathways of hydrogen production.

Keywords: Co-culture; *Enterobacter cloacae*; Photofermentation; Hydrogen; *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodopseudomonas palustris*.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de tecnologias para obtenção de energia mais limpa e renovável é uma questão de interesse global. O hidrogênio é considerado uma alternativa mais promissora em relação aos combustíveis fósseis porque é limpo, eficiente e renovável. O hidrogênio está sendo explorado para aplicações energéticas por não contribuir com o efeito estufa, sendo que sua combustão direta e completa gera somente moléculas de água, enquanto outros combustíveis como, gasolina, metano, propano, etc., liberam carbono no meio ambiente (ELBESHISHY et al., 2017).

O hidrogênio possui alta densidade energética (141,90 kJ/g) quando comparado a outros combustíveis que possuem menor conteúdo energético por unidade de massa, tais como, metano (50,02 kJ/g), propano (45,60 kJ/g), gasolina (44,50 kJ/g), metanol (18,05 kJ/g) entre outros (MIDILLI et al., 2005).

Dentre os processos de produção de hidrogênio que foram desenvolvidos e estudados, a produção biológica tem despertado interesse, pois podem fazer uso de matérias-primas renováveis, tais como águas residuais ou materiais ricos em diferentes substratos. Uma outra grande vantagem dos processos biológicos é que, na maioria das vezes, são operados a temperatura e pressão ambiente, o que demanda menos energia que os processos tradicionais (MEHER KOTAY; DAS, 2008).

Os processos para obtenção biológica de hidrogênio podem ser conduzidos a partir de três rotas biológicas: por biofotólise (usando microalgas), fermentação escura (sem adição de luz) e fotofermentação. A produção de hidrogênio por fermentação escura (sem adição de luz) é realizada por microrganismos anaeróbios estritos ou facultativos. Enquanto que na fotofermentação são utilizadas bactérias púrpuras não sulfurosas com incidência de luz para captação de energia (MIRZA et al., 2019).

Os microrganismos de fermentação escura (sem adição de luz) e fotofermentação, possuem a capacidade de utilizar vários compostos orgânicos como matéria-prima para a produção de hidrogênio e, portanto, são opções favoráveis de serem utilizados a fim de promover a limpeza de resíduos e águas residuais ricas em compostos orgânicos (SAĞIR; YUCEL; HALLENBECK, 2018).

A produção de hidrogênio por fermentação escura (sem adição de luz), que utiliza carboidratos como substratos, apresenta uma rota mais viável e promissora para a produção biológica de hidrogênio, como sua maior eficiência de produção, estabilidade, requisitos de

controle simples, custos operacionais mais baixos e maior viabilidade para industrialização (ELBESHISHY et al., 2017).

As bactérias púrpuras não sulfurosas possuem elevados rendimentos teóricos de conversão, não produzem oxigênio no processo fermentativo, que é inibidor do processo, tem capacidade de utilizar amplo espectro luminoso e consumo de vários substratos orgânicos como, ácido lático, butírico, dentre outros (SAKURAI et al., 2013).

Uma grande variedade de materiais ricos em matéria orgânica pode ser utilizada como substrato na produção de hidrogênio. Carboidratos, como sacarose e glicose, são facilmente biodegradáveis pelas bactérias fermentativas, no entanto, fontes puras de carboidratos representam matérias-primas de alto custo para produção de hidrogênio em grande escala. Uma alternativa é a utilização de subprodutos agroindustriais, que são compostos orgânicos com alta concentração carbônica e que possuem necessidade de destinação adequada (HITIT; ZAMPOL LAZARO; HALLENBECK, 2017).

As técnicas para produção de hidrogênio por rotas biológicas apresentam limitações, que incluem os tipos de biorreatores utilizados, crescimento do microrganismo e a quantidade de hidrogênio que é gerado por esses processos, fazendo-se necessário o desenvolvimento de novas tecnologias para que se torne viável e competitiva a sua produção.

O Núcleo de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, vêm estudando a produção de hidrogênio há alguns anos, e o presente trabalho pretende dar continuidade, visando contribuir com a pesquisa, realizando o processo fermentativo em um único estagio, com a presença de co-cultura, contendo um microrganismo de fermentação escura (sem adição de luz) e uma espécie de bactéria fotossintetizante, onde essa abordagem, diminui o custo do processo produtivo e elimina etapas de pré-tratamento.

A utilização de um subproduto agroindustrial como substrato, minimiza o acúmulo deste nos processos industriais e diminui o custo dos sistemas produtivos. Diante do exposto, o presente trabalho visou aumentar a produção de hidrogênio empregando o sistema de co-cultura, utilizando a combinação de um microrganismo anaeróbio facultativo, a *Enterobacter cloacae* e uma bactéria fotossintetizante: *Rhodopseudomonas palustris* ou *Rhodobacter capsulatus*, em fotofermentação de único estágio. O Permeado de Soro de queijo em pó, possui nutrientes necessários para o desenvolvimento dos microrganismos fermentativos. A principal vantagem dessa abordagem, é que os substratos utilizados na fotofermentação (ácidos orgânicos) produzidos *in situ*, pelo microrganismo anaeróbio facultativo, são usados imediatamente pelas bactérias fotossintetizantes, a fim de não atingir níveis de inibição no meio produtivo.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi estudar a produção de hidrogênio em um único estágio por fotofermentação, utilizando o microrganismo *Enterobacter cloacae* e uma bactéria fotossintetizante: *Rhodobacter capsulatus* ou *Rhodopseudomonas palustris*. Para alcançar esse objetivo geral, as seguintes etapas (objetivos específicos) foram consideradas:

- 1- Avaliar a produção de Hidrogênio da cepa *Enterobacter cloacae* por fermentação escura (sem adição de luz) e fotofermentação (presença de luz contínua);
- 2- Verificar o efeito do tipo da fonte de carbono (glicose e a lactose proveniente do Permeado do Soro de queijo em pó) sobre a produção de hidrogênio utilizando microrganismo *Enterobacter cloacae*;
- 3- Avaliar a produção de Hidrogênio no sistema de co-cultura com os microrganismos *Enterobacter cloacae* e *Rhodobacter capsulatus* por fotofermentação;
- 4- Avaliar a produção de Hidrogênio no sistema de co-cultura com os microrganismos *Enterobacter cloacae* e *Rhodopseudomonas palustris* por fotofermentação;
- 5- Estudar a influência dos meios de cultura RCV e Caldo Nutriente para produção de Hidrogênio nos sistemas de co-cultura;
- 6- Estudar o modo de alimentação das fontes de carbono (glicose e a lactose proveniente do Permeado do Soro de queijo em pó) por adição periódica de forma isolada e alternada durante a fotofermentação no sistema de co-cultura;
- 7- Identificar a composição de metabólitos produzidos durante os processos fermentativos.

CAPÍTULO 3

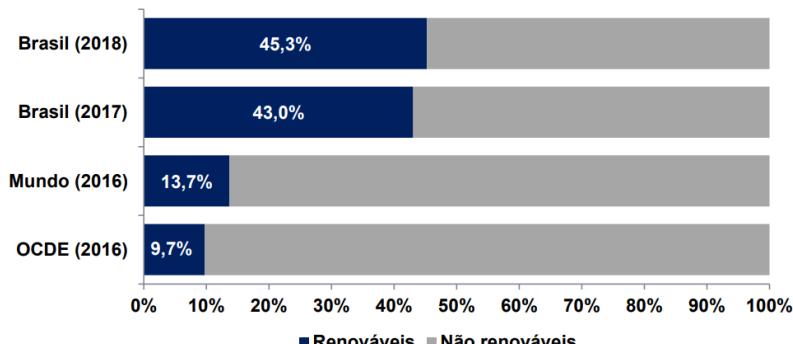
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Balanço Energético Nacional

O desenvolvimento de soluções sustentáveis de geração de energia oriunda de fontes renováveis, é uma questão de interesse global, a fim de reduzir a dependência de combustíveis fosseis, que contribuem com o efeito estufa.

Segundo dados do Balanço Energético Nacional (BEN) de 2019, ano base 2018, as energias renováveis correspondem a 45,3% da matriz nacional brasileira (Figura 3.1), estando acima da média mundial, que em 2016 era de 13,7%, bem como dos países membros da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), com apenas 9,7%. No ano de 2017, as fontes renováveis representavam 43% na demanda total, tendo então, uma diminuição na proporção da utilização de energia a partir de fontes não renováveis.

Figura 3.1. Participação de energia renováveis na matriz energética



Fonte: BEN, 2019.

Dentre as energias renováveis utilizadas no Brasil, caracterizam-se, principalmente a biomassa de cana (17,4%), hidráulica (12,6%) e lenha e carvão vegetal (8,4%). Já entre as não renováveis, a maior parcela corresponde ao petróleo e derivados (34,4%), gás natural (12,5%), carvão mineral (5,8%) e urânio (1,4%) (BEN, 2019).

Observa-se na Tabela 3.1, o decréscimo na participação das fontes não renováveis de energia no ano de 2018, consequente ao aumento da utilização de fontes renováveis,

devido principalmente a diminuição do uso dos produtos oriundos de petróleo e gás natural.

Tabela 3.1. Oferta interna de energia 2018/2017

Fonte (Mtep*)	2017	2018	Δ 18 / 17
<i>RENOVÁVEIS</i>	126,2	130,5	3,4%
Energia hidráulica	35,0	36,5	4,1%
Biomassa da cana	49,8	50,1	0,7%
Lenha e carvão vegetal	24,0	24,1	0,6%
Eólica	3,6	4,2	14,4%
Solar	0,072	0,298	316,1%
Lixívia e outras renováveis	13,8	15,4	11,8%
<i>NÃO RENOVÁVEIS</i>	167,0	157,9	-5,5%
Petróleo e derivados	106,3	99,3	-6,5%
Gás natural	37,9	35,9	-5,4%
Carvão mineral	16,8	16,6	-0,9%
Urânio	4,2	4,2	-0,5%
Outras não renováveis	1,8	1,8	-0,1%

*Milhões de tonelada equivalente de petróleo

Fonte: adaptado de BEN (2019).

Reducir a grande dependência dos combustíveis fósseis e investir em uma economia baseada em fontes de energia sustentáveis, mostra-se necessário e promoverá cada vez mais uma evolução econômica e ambiental do planeta. Considerando este aspecto, a produção de hidrogênio por via biológica é uma alternativa significativa a fim de aumentar a produção de combustíveis.

3.2 Hidrogênio como fonte de energia

Dentre as aplicações de tecnologias para produção de energia limpa, se incluem a produção de hidrogênio como uma fonte alternativa de energia sustentável. O hidrogênio é um combustível limpo, e sua queima resulta na produção de água, isso ocorre pois, a molécula de hidrogênio não é quimicamente ligada a átomos de carbono, e por isso, não contribui para as emissões de dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera (DEMIREL et al., 2010; LIN et al., 2012; SARMA et al., 2015).

A alta capacidade energética do hidrogênio, permite rendimento superior a qualquer hidrocarboneto, cerca de 142 kJ/g. Já outros combustíveis como o metano,

propano e a gasolina apresentam capacidade energética de 55,53 kJ/g, 50,36 kJ/g e 47,5 kJ/g, respectivamente, sendo em média 2,75 vezes menor do que o valor do hidrogênio. Assim, o hidrogênio é considerado uma promissora fonte de energia limpa com alta capacidade energética (ARIMI et al., 2015; HAFEZ et al., 2010; KAPDAN; KARGI, 2006; ROSSI et al., 2011; SANTOS, 2003).

O hidrogênio pode ser obtido a partir de: processos eletroquímicos, quando se utiliza água como matéria prima, a partir da eletrólise da água; processos químicos, utilizando os combustíveis fósseis como matéria prima (os métodos incluem a reforma do vapor do gás natural, a oxidação parcial de hidrocarbonetos pesados e a gaseificação do carvão); processos biológicos, como a fotofermentação e a fermentação anaeróbia (SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2014).

A produção mundial de hidrogênio é representada por cerca de 50% oriunda de gás natural, 30% é proveniente da reforma do petróleo, 18% da gaseificação do carvão, 3,9% por eletrólise de água e 0,1% de outras fontes (DINCER; ACAR, 2015). Diante desses percentuais, há um interesse pelo aumento da produção de hidrogênio a partir de materiais renováveis, como a produção biológica, que dispensa a necessidade de combustíveis fósseis.

A produção biológica de hidrogênio pode ser uma alternativa viável aos métodos apresentados, devido à possibilidade de utilização de fontes renováveis, bem como o reaproveitamento de materiais residuais, diminuindo assim a quantidade de subprodutos gerados nos processos industriais (SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2014; SYDNEY et al., 2014).

3.3 Produção biológica de hidrogênio

A produção biológica de hidrogênio, pode ocorrer por meio dos processos de: biofotólise direta e indireta da água, fotofermentação e fermentação escura (sem adição de luz), que utilizam organismos fotossintéticos ou fermentativos, operados a temperatura e pressão ambientes (ARIMI et al., 2015; DAS; VEZIROĞLU, 2001; DEMIRBAS, 2009; LEVIN; PITT; LOVE, 2004; WILLQUIST; ZEIDAN; VAN NIEL, 2010). A Tabela 3.2, resume os processos biológicos, assim como algumas vantagens e desvantagens para a produção de hidrogênio.

Tabela 3.2. Vantagens, desvantagens e principais microrganismos estudados para produção de hidrogênio por processo biológico.

Processo	Vantagens	Desvantagens	Microrganismos	Referência
Biofotólise direta	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Produção de H₂ a partir da água ▪ Não necessita de ATP. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Necessita de iluminação constante ▪ Inibição das hidrogenases pelo O₂ ▪ Biorreatores modificados para maximizar a utilização da energia solar 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ▪ <i>Platumonas subcordiformis</i> 	(KIM et al., 2010) (RAN et al., 2009)
Biofotólise indireta	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Produção de H₂ a partir da água ▪ Habilidade de fixação de N₂ e produção de H₂ pelas nitrogenases ▪ Separação espacial do O₂ e H₂ nas células diferenciadas (heterocistos) ▪ Separação temporal (dia/noite) em células não-heterocísticas 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Necessita de iluminação constante ▪ Biorreatores modificados para maximizar a utilização da energia solar ▪ Necessidade de ATP pelas nitrogenases ▪ Síntese e manutenção dos heterocistos ▪ CO₂ presente no gás heterocísticas 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Plectonema boryanum</i> ▪ <i>Anabaena siamensis</i> ▪ <i>Anabaena variabilis</i> ▪ <i>Synechocystis sp.</i> ▪ <i>Cyanothece sp.</i> ▪ <i>Nostoc sp.</i> 	(HUESEMANN et al., 2010) (KHETKORN; LINDBLAD; INCHAROENSAKDI, 2010) (BERBEROĞLU; JAY; PILON, 2008) (NAVARRO et al., 2009) (MIN; SHERMAN, 2010) (YOSHINO et al., 2007)
Fotofermentação	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Utilização de diferentes resíduos e efluentes como substrato ▪ Utilização de amplo espectro de luz pelas bactérias 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Necessita de iluminação ▪ Biorreatores modificados para maximizar a utilização da energia solar ▪ CO₂ presente no gás 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Rhodopseudomonas palustris</i> ▪ <i>Rhodobacter sp.</i> ▪ <i>Rhodobacter sphaeroides</i> ▪ <i>Rhodobacter capsulatus</i> 	(SUWANSAARD et al., 2010) (KAWAGOSHI et al., 2010) (ZHU et al., 2010) (OBEID et al., 2010)
Fermentação escura (sem adição de luz)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ampla variedade de fontes de carbono como substrato ▪ Não necessita de iluminação ▪ Produção de metabólitos intermediários de grande valor agregado ▪ Não há limitações com relação ao O₂ 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tratamento do efluente após a fermentação ▪ CO₂ presente no gás 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Clostridium sp.</i> ▪ <i>Clostridium butyricum</i> ▪ <i>Clostridium beijerinckii</i> ▪ <i>Citrobacter freundii</i> ▪ <i>Enterobacter cloacae</i> ▪ <i>Enterobacter aerogenes</i> ▪ <i>Escherichia coli</i> ▪ <i>Klebsiella pneumoniae</i> 	(KAMALASKAR et al., 2010) (TAI et al., 2010) (SKONIECZNY; YARGEAU, 2009) (BECKERS et al., 2010) (MANDAL; NATH; DAS, 2006) (JAYASINGHEARACHCHI et al., 2009) (NIU et al., 2010)

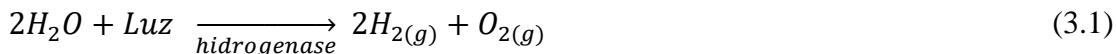
3.3.1 Biofotólise da água

A biofotólise da água é um processo que converte energia solar em energia química armazenada, útil para a célula. Este processo ocorre sob ação da luz resultando na decomposição da água produzindo hidrogênio, a qual pode ser dividida em processos direto e indireto.

3.3.3.1 Biofotólise direta

A biofotólise direta utiliza microalgas fotossintetizantes para converter energia solar em energia química. As microalgas *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella fusca* e *Scenedesmus obliquus* têm sido estudadas como produtoras de hidrogênio por esta rota, que apresenta como uma das principais vantagens a não utilização de carbono orgânico como substrato (NAGARAJAN et al., 2017).

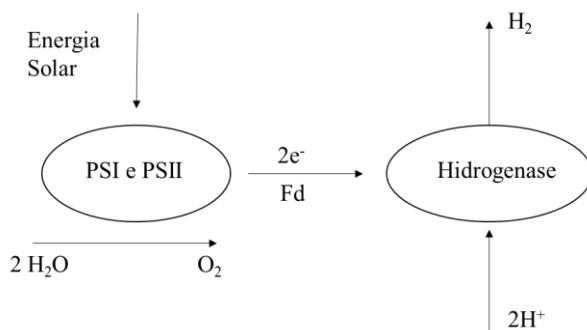
A produção de hidrogênio é possível devido a presença da enzima hidrogenase Equação (3.1), que recebe elétrons da absorção de luz, combinando-os com os prótons H⁺ e forma o hidrogênio.



O processo ocorre na presença do fotossistema II (PSII), que é responsável pela quebra da molécula da água, liberando o O₂ e prótons H⁺ para o meio (Figura 3.2). Esses elétrons são captados pelo fotossistema I (PSI), com o auxílio da enzima Ferrodoxina. Esta reação é catalisada pela enzima hidrogenase e não possui a necessidade ATP como forma de energia extra. Essa enzima combinará os prótons de H⁺ gerados na quebra da molécula de água com os elétrons doados pela ferrodoxina (DASGUPTA et al., 2010; HALLENBECK; BENEMANN, 2002).

Na biofotólise direta, a produção de hidrogênio dar-se-á em condições anaeróbias e com ação de luz, onde o sistema de respiração das algas verdes consome o oxigênio, é permitido a ativação da hidrogenase. Quando a fotossíntese é restabelecida, com a presença da luz, a produção volta a ficar comprometida (DAS; VEZIROĞLU, 2001; MCKINLAY; HARWOOD, 2010).

Figura 3.2. Esquema da biofotólise direta

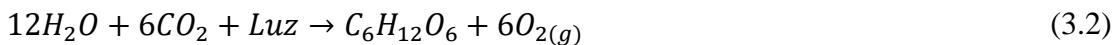


Fonte: adaptado de (HALLENBECK; GHOSH, 2009).

3.3.3.2 Biofotólise indireta

Os organismos estudados na biofotólise indireta são as cianobactérias do tipo *Nostoc*, *Anabaena*, *Calothrix* e *Oscillatoria* (MONA; KAUSHIK; KAUSHIK, 2011). A biofotólise indireta ocorre em dois estágios separados que são acoplados pela fixação de CO₂. Além da fixação de CO₂, 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).

As cianobactérias realizam a fotossíntese e geram carboidratos com energia armazenada, a qual é utilizada para gerar hidrogênio a partir da água com ação da enzima da nitrogenase, conforme as Equações (3.2) e (3.3) (DAS; VEZIROGLU, 2008; HOSSEINI et al., 2015; KIRTAY, 2011).



Nas cianobactérias há tanto hidrogenase quanto nitrogenase e tais enzimas requerem o uso de ATP como recurso energético, diferentemente da biofotólise direta que não necessita de tal recurso (DASGUPTA et al., 2010).

3.3.2 Fermentação escura (sem adição de luz)

A fermentação escura (sem adição de luz) para produção de hidrogênio é um processo biológico que não necessita de luz, podendo utilizar diversas fontes de carbono

como substrato, incluindo águas residuárias ricas em carboidratos, para produção de hidrogênio. O hidrogênio pode ser obtido a partir de culturas puras ou culturas mistas oriundas de lodos anaeróbios de sistema de tratamento de efluentes, despejos de animais e resíduos alimentícios (DING et al., 2017; NASR et al., 2017; ZINATIZADEH et al., 2017).

Dentre as bactérias utilizadas nesse tipo de processo, destacam-se as do gênero *Enterobacter*, *Escherichia*, e *Clostridium*, que são citadas na literatura como produtoras de hidrogênio (BRAZ ROMÃO et al., 2018; CABROL et al., 2017).

O processo de fermentação anaeróbia é dividido em quatro etapas principais: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, sendo que na fase de acidogênese é onde ocorre a produção de hidrogênio (AMORIM et al., 2014).

Na fase de hidrólise, a matéria orgânica que é composta de carboidratos, proteínas e lipídeos, é quebrada, formando compostos mais simples com auxílio da exo-enzima, como açúcares, aminoácidos e peptídeos, respectivamente. Uma grande variedade de materiais ricos em carboidratos, lipídeos e proteínas podem ser utilizados como substratos para produção de hidrogênio. No entanto, os carboidratos compõem a fonte preferida de carbono orgânico no processo fermentativo (GUO et al., 2010; SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2014).

Esses compostos são consumidos pelas bactérias fermentativas e na fase de acidogênese são produzidos ácidos orgânicos, tais como, propiônico, butírico, acético e láctico, que são compostos mais simples de serem metabolizados. A degradação fácil dos carboidratos, favorece ao acúmulo dos ácidos orgânicos na fase acidogênica, diminuindo o pH, podendo causar a falência do processo (BRAÚNA, 2012).

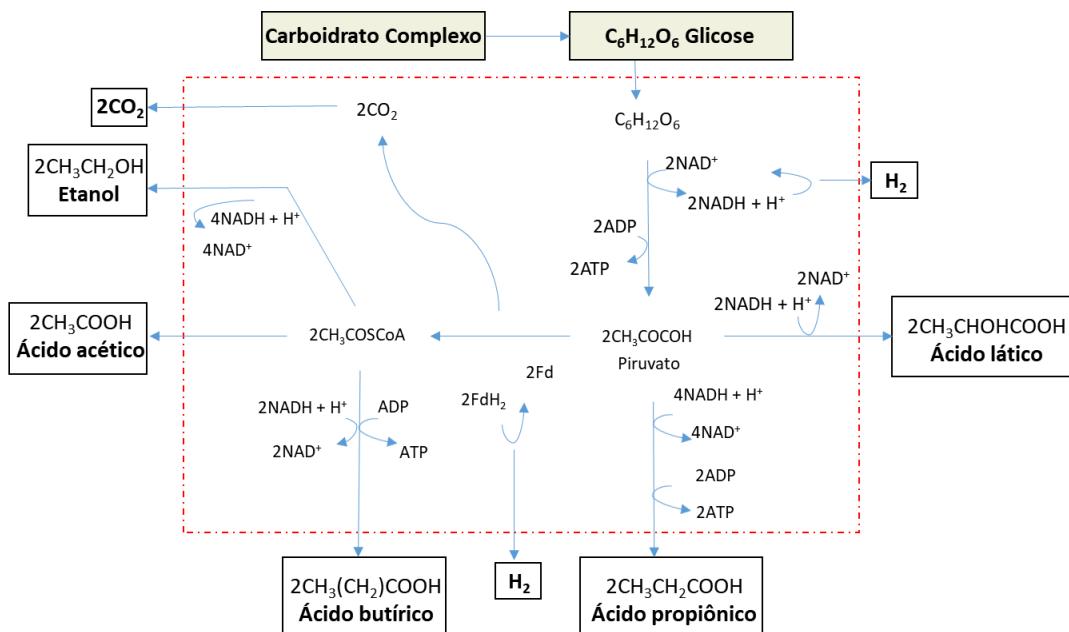
Na fase de acetogênese, as bactérias sintróficas acetogênicas são responsáveis pela oxidação dos ácidos orgânicos em substratos como acetato hidrogênio e dióxido de carbono.

A produção de hidrogênio a partir de substratos ricos em carbono segue vias metabólicas, que além de geração de energia na forma do hidrogênio, podem ainda produzir uma variedade de metabólitos com alto valor agregado, conforme mostra a Figura 3.3.

Os rendimentos de conversão de substratos na fermentação escura (sem adição de luz) são baixos, pelo fato de ocorrer reações concorrentes entre si, como o consumo de

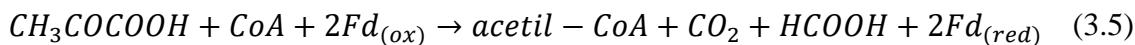
hidrogênio ou desvio para formação de outros produtos e pelos limites teóricos das vias metabólicas.

Figura 3.3. Possíveis rotas metabólicas da fermentação escura (sem adição de luz) de carboidratos



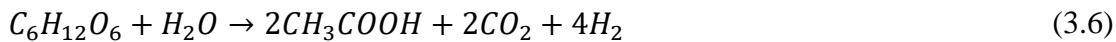
Fonte: adaptado de Ren; Wang; Huang, (1997).

A fermentação se inicia com a quebra de um carboidrato, conforme a Figura 3.3, convertendo a glicose em piruvato. O piruvato é oxidado a acetil-CoA (CoA – coenzima), o qual em seguida é convertido em acetil fosfato resultando na produção de ATP e na produção de íons acetato. A oxidação do piruvato a acetil-CoA requer a redução da ferrodoxina (Fd). Esta última, na sua forma reduzida, é oxidada pela enzima hidrogenase, produzindo Fd (oxidado) e libertando elétrons que vão formar hidrogênio molecular. A reação global é representada pelas Equações (3.4) e (3.5) (DAS; VEZIROGLU, 2008).

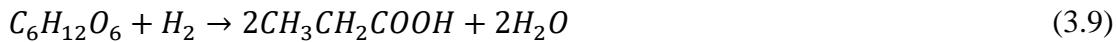
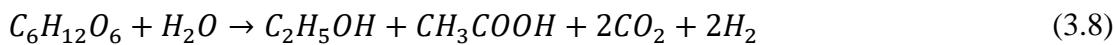
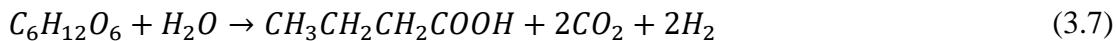


A formação do hidrogênio está ligada aos metabólitos que são produzidos durante os processos fermentativos, na forma de ácidos orgânicos e álcoois. O maior rendimento

teórico de hidrogênio alcançado é quando há formação de ácidos acético como principal metabólito, gerando 4 mol de H₂/mol de glicose consumida conforme a Equação (3.6).

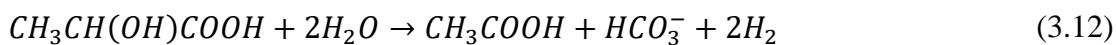
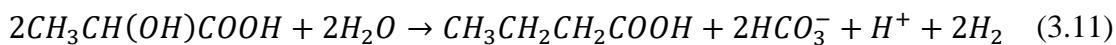
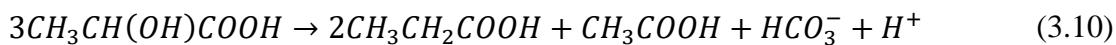


Entretanto, quando ocorre a formação de ácido butírico, o rendimento teórico obtido é de 2 mol de H₂/mol de glicose consumida Equação (3.7). Para uma produção final de etanol + ácido acético, o rendimento é de 2 mol de H₂/mol de glicose consumida Equação (3.8). Obtendo como produto final o ácido propiônico, não há rendimento de hidrogênio e o consumo da glicose juntamente o com o do hidrogênio produz o ácido propiônico Equação (3.9) (CHONG et al., 2009):



O ácido lático vem sendo relatado também como via metabólica para produção de hidrogênio. Estudos de Kim et al., (2012) e Baghchehsaraee et al., (2009), indicaram que a produção de ácido lático no processo fermentativo, influencia positivamente o metabolismo das bactérias fermentativas para a produção de hidrogênio. Em contrapartida, nos estudos de Gomes et al., (2016) e Noike et al., (2002), a produção de hidrogênio foi desfavorecida em virtude da competição pelo tipo de substrato pelas bactérias fermentativas.

Segundo Masset et al., (2012) e Saady, (2013), a formação de hidrogênio a partir do ácido lático pode ocorrer a partir da conversão de ácido lático em ácido propiônico e ácido acético, conforme as Equações (3.10) e (3.11), ou a partir da decomposição de ácido lático em ácido acético Equação (3.12).

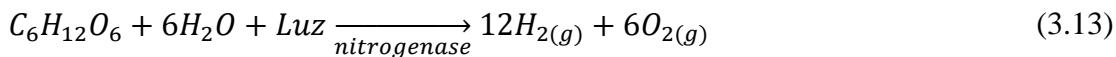


O gás hidrogênio não é o único ponto positivo do processo fermentativo, os ácidos orgânicos que são produzidos, podem ser utilizados como substratos no processo de fotofermentação pelas bactérias fotossintetizantes, a fim de aumentar o rendimento na produção de hidrogênio. Os ácidos orgânicos também podem ser concentrados para comercialização para indústrias de síntese química e de alimentação (CHENG et al., 2011).

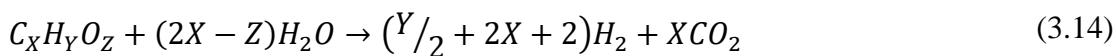
Han et al., (2015), encontraram como principais subprodutos o etanol (0,9 - 49,4%) e o ácido acético (35,6 - 42,2 %) na fermentação escura (sem adição de luz) para produção de hidrogênio a partir do hidrolisado dos resíduos de alimentos. Esses metabólitos, indicam que o meio de cultura foi favorável para a produção de hidrogênio. Além disso, o ácido propiônico foi detectado em pequenas concentrações, o que pode ser benéfico para a produção de hidrogênio.

3.3.3 Fotofermentação

Na produção de hidrogênio por fotofermentação, o hidrogênio é liberado pela ação de hydrogenases na presença de luz, como meio de eliminar o excesso de elétrons gerados durante a degradação de carboidratos. Utiliza-se bactérias fotossintetizantes púrpuras não sulfurosas (PNS), que têm capacidade de converter completamente glicose em hidrogênio e gás carbônico pela ação da enzima nitrogenase, conforme a Equação (3.13) (DAS; VEZIROGLU, 2008).

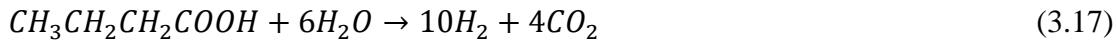
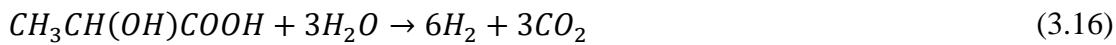


As bactérias fotossintetizantes possuem um potencial promissor para produção de hidrogênio devido à capacidade elevada de taxa de conversão de substratos e a flexibilidade de substratos orgânicos derivados de resíduos que podem ser utilizados (EROGLU; MELIS, 2011). O máximo rendimento teórico que poderia ser obtido no processo de fotofermentação se todo o substrato fosse convertido à H₂ e CO₂ é mostrado pela Equação (3.14) (LOSS, 2011):



Há uma grande variedade de substratos que podem ser utilizados para o crescimento dos microrganismos, desde carboidratos a ácidos orgânicos, conforme mostrado em trabalhos que empregaram os açúcares em meios sintéticos ou resíduos agrícolas, como melaço de beterraba e em efluentes provenientes da fermentação escura (sem adição de luz) (AFSAR et al., 2011; KESKIN; HALLENBECK, 2012; SILVA et al., 2016; TIAN et al., 2010).

Em condições anaeróbicas, os ácidos orgânicos obtidos na fermentação escura (sem adição de luz) podem ser utilizados como doares de elétrons para a produção de hidrogênio na fotofermentação. Nas equações são descritas a formação de hidrogênio a partir do ácido acético, lático, butírico e propiônico Equações (3.15), (3.16), (3.17) e (3.18), respectivamente.



A produção de hidrogênio por fotofermentação depende de parâmetros como a atividade das enzimas nitrogenase e hidrogenase, proporção de carbono e nitrogênio nos meios de produção, idade do inóculo das bactérias PNS, fonte e intensidade de luz aplicada, pH, temperatura dentre outros fatores que afetam a eficiência e rendimento na produção (BASAK; JANA; DAS, 2014)

A fonte de luz utilizada no processo pode ser luz artificial, como lâmpadas fluorescentes, lâmpadas halógenas, fibras ópticas, tubos de neon, diodos emissores de luz, etc (BASAK; JANA; DAS, 2014). Há possibilidade da utilização da luz solar em combinação com as luzes artificiais. Durante o processo fermentativo, ocorre um sombreamento das células decorrente do aumento da biomassa, dos subprodutos gerados e até mesmo da formação de um biofilme na superfície, provocando então uma diminuição da intensidade de luz no meio (KIM; CHANG; CHANG, 1997). A distância da fonte de luz e a concentração do microrganismo no processo fermentativo, são características que influenciam na transferência de energia da luz, de acordo com a Lei de Lambert Beer. Ressalta-se também que a fonte de luz não deve estar muito próxima

da cultura bacteriana, pois pode gerar uma quantidade considerável de calor (BASAK; JANA; DAS, 2014).

A temperatura é um fator que influencia as atividades dos microrganismos produtores de hidrogênio. Diversos trabalhos demonstram que o aumento da temperatura pode conduzir a um aumento da produção de hidrogênio, já as temperaturas mais elevadas podem conduzir a uma diminuição do rendimento das bactérias produtoras de hidrogênio (GINKEL; SUNG; LAY, 2001; LOGAN et al., 2002). Para as bactérias *Rhodobacter*, a faixa ideal de temperatura é de 31 a 36°C. A manutenção da temperatura constante no interior do reator também é fundamental e pode ser feito através de um banho termostático em que a água circula em volta do biorreator mantendo a temperatura desejada durante a execução do experimento, salientando que a viabilidade do sistema de controle da temperatura também é importante para reduzir os custos de todo o processo (BASAK; JANA; DAS, 2014).

O pH é considerado um dos parâmetros operacionais mais importantes e sensíveis no processo fermentativo, já que ele pode influenciar a ação da enzima presente, bem como na rota metabólica e hidrólise do substrato (DE GIOANNIS et al., 2013). Além disso, variações no pH podem provocar mudança de população microbiana, morfologia e estrutura celular (LIN et al., 2012). A produção de hidrogênio pode ser diminuída em pH < 4, onde é observado a formação de metabólitos na forma de álcoois, que podem penetrar na membrana celular e interferir nas atividades metabólicas. Já o pH > 7, tem a formação de ácido propiônico, e diminuição na produção de hidrogênio. Estudos de Espinoza-Escalante et al., (2009) verificaram que em um reator semi-contínuo o valor ótimo de pH foi de 5,5 para a produção de hidrogênio, estando dentro da faixa, favorecendo a atividade das hidrogenases durante o processo de digestão anaeróbica (FANG; LIU, 2002; LI; FANG, 2007).

3.4 Microrganismos produtores de hidrogênio

Os rendimentos de hidrogênio são influenciados pelo tipo de inóculo, que incluem as culturas puras e as culturas mistas de bactérias. As culturas puras são compostas por um único tipo de microrganismo, e o seu uso permite a determinação das condições que resultem no maior rendimento e produção de hidrogênio e as mudanças metabólicas que ocorrem durante o processo fermentativo (ELSHARNOUBY et al., 2013).

As bactérias fermentativas produzem hidrogênio a partir de compostos orgânicos, em um processo que não depende de luz. Já as bactérias púrpuras não sulfurosas, produzem hidrogênio sob iluminação, usando ácidos orgânicos, como fonte de carbono. A grande maioria dos estudos que envolvem a produção de hidrogênio, utilizam culturas puras, porém empregando o sistema de co-cultura na produção de hidrogênio, que ainda é um pouco deficiente (KOKU et al., 2002).

3.4.1 Bactérias Fermentativas

Os microrganismos mais citados como produtores de H₂ pertencem a espécie *Clostridium* e são anaeróbios estritos, enquanto que entre os microrganismos facultativos destacam-se os *Bacillus* e as *Enterobacter* (MADIGAN et al., 2016).

Enterobacter sp. é um gênero que atrai muita atenção da comunidade científica devido à elevada taxa de crescimento, facilidade de cultivo e ampla utilização de substratos (HARUN et al., 2012; SUN et al., 2015; TORRES DE SOUZA et al., 2019). *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). Além de apresentarem outras vantagens, como crescimento na presença de oxigênio, o que torna sua manipulação mais fácil em comparação aos anaeróbios estritos. O seu crescimento não é inibido em uma atmosfera composta de 100% de hidrogênio, apresentam uma alta taxa de crescimento e elevada taxa de produção de hidrogênio, o que revela um forte potencial para a produção de hidrogênio em larga escala (ZHANG; LV; XING, 2011).

Kapdan e Kargi (2006) obtiveram 1,97 mmol de H₂/g glicose utilizando uma cultura pura de *Enterobacter aerogenes* e 2,2 mol de H₂/mol glicose utilizando a estirpe *Enterobacter cloacae* ITT-BY 08. Nakashimada et al., (2002) obteve 1,97 mmol de H₂/g substrato, utilizando a bactéria *Enterobacter aerogenes*.

3.4.2 Bactérias fotossintetizantes

A foto-fermentação ocorre em modelo parecido com a fermentação escura (sem adição de luz), porém com o controle do pH mais próximo da neutralidade, além da presença de luz. As bactérias púrpuras não sulfurosas são encontradas na natureza, onde

existe uma rápida produção e decomposição de matéria orgânica. Se destacam as bactérias fotossintetizantes mais estudadas: *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sulidophilus*, *Rhodopsuedomonas sphaeroides*, *Rhodopsuedomonas palustris*, *Rhodopsuedomonas capsulatus* e *Rhodospirillum rubrum* (KAWAGOSHI et al., 2010; OBEID et al., 2010).

Sevinç et al., (2012) estudaram a produção de H₂ utilizando *R. capsulatus* em fotofermentação empregando substrato duplo composto por ácido acético e ácido láctico a diferentes temperaturas (20, 30 e 38 °C). Os resultados revelaram que a máxima taxa de produção de H₂ ($R_{máx}$) foi de 0,5 mmol H₂/L.h obtida a 30 °C e 5000 lux.

Silva et al., (2016) estudaram a substituição do açúcar pelo efluente proveniente da fermentação escura (sem adição de luz) como substrato para a fotofermentação. Foi avaliada a adição de fontes de carbono como lactose e glicose e o efeito da adição alternada desses açúcares no decorrer do processo, para manter a cultura ativa. A produtividade máxima alcançada foi de 208,40 mmol H₂/L·dia, no tempo de 52 horas.

O uso combinado de duas ou mais culturas puras, também chamado de co-cultura, apresenta a possibilidade de união de diferentes capacidades hidrolíticas, além de outros fatores importantes como a capacidade de depleção de oxigênio, formação de grânulos e quebra de substratos complexos (CAI et al., 2018; ZAGRODNIK; ŁANIECKI, 2017a).

3.4.3 Co-cultura

Quando os microrganismos são utilizados de forma isolada, o principal problema é a inibição por subprodutos, como por exemplo, oxigênio e ácidos orgânicos. Cada cepa tem suas limitações quando é utilizada para a produção de hidrogênio. A principal limitação das bactérias fermentativas é a degradação incompleta de substratos orgânicos e baixo rendimento de hidrogênio, e para as bactérias fotossintetizantes a principal limitação é a reduzida capacidade de degradar substratos orgânicos complexos (ZAGRODNIK; ŁANIECKI, 2017b).

As bactérias fermentativas utilizadas na fermentação escura (sem adição de luz) produzem hidrogênio a altas taxas a partir de vários resíduos orgânicos, mas não podem degradá-los completamente, devido a limitações termodinâmicas. No entanto os ácidos orgânicos produzidos pelas bactérias fermentativas, podem ser facilmente utilizados pelas

bactérias fotossintetizantes como substrato para produção de hidrogênio (CAI et al., 2018).

De acordo com suas características biológicas e mecanismos de produção de hidrogênio, uma mistura de uma bactéria fermentativa escuras com uma espécie de bactéria fotossintetizante, denominada co-cultura, pode aumentar acentuadamente o rendimento de hidrogênio e fazer pleno uso de resíduos orgânicos, em uma fermentação realizada em um único biorreator (CAI et al., 2018; KARGI; OZMIHCI, 2010).

Diversos trabalhos apresentam a combinação da fermentação escura (sem adição de luz) com a fotofermentação, denominada como sistema híbrido, sendo realizada por dois estágios, que acontecem em reatores separados. O efluente gerado na fermentação escura (sem adição de luz), que é um composto de ácidos orgânicos, é utilizado como substrato na etapa de fotofermentação, pois as bactérias fotossintetizantes têm a capacidade de utilizá-los como substrato (GUWY et al., 2011; ZAGRODNIK; ŁANIECKI, 2017b)

No sistema de co-cultura, os ácidos orgânicos produzidos pelas bactérias fermentativas são convertidos em *in situ* em hidrogênio por fotofermentação. Essa é uma forma de aliviar o produto final e a inibição de pH baixo. O sistema de co-cultura em um único estágio apresenta vantagens sobre o processo em dois estágios, por eliminar etapas complexas de pré-tratamento no efluente após a fermentação escura (sem adição de luz), reduzir o tempo de fermentação e aumentar a produtividade de hidrogênio. Entretanto, há um número limitado de estudos sobre esses processos em um único estágio (CAI et al., 2018; SINGH; SINGH; DAS, 2019).

3.5 Substratos utilizados para produção de hidrogênio

Os vários microrganismos produtores de hidrogênio apresentam diferentes necessidades nutricionais, preferências por tipo de substrato, temperatura e pH. São essas preferências que determinarão a via metabólica que irão utilizar, influenciando na produção de hidrogênio (WANG; WAN, 2009). Na produção biológica de hidrogênio, destacam-se como matérias primas para produção de hidrogênio: biomassa, subprodutos de resíduos agrícolas, produtos lignocelulósicos, resíduos de processamento de alimentos, lodo de esgoto e efluentes agrícolas (JIANG et al., 2020; SHOW et al., 2012; SINGH; SINGH; DAS, 2019).

Fontes puras de açúcares como glicose, sacarose e lactose, são substratos mais utilizados para produção de hidrogênio, que são facilmente biodegradáveis pelas bactérias fermentativas. Entretanto fontes puras de carboidratos encarecem o processo em larga escala, sendo assim, se mostra viável a utilização de resíduos com o mesmo potencial, para produção de hidrogênio (KAPDAN; KARGI, 2006).

A utilização de subprodutos agroindustriais, ricos em carboidratos torna-se economicamente viável, desde que eles sejam altamente nutritivos, produzidos a partir de recursos renováveis, estejam em concentração suficiente para que a fermentação seja energeticamente favorável e que, caso algum tratamento prévio for necessário, este seja de baixo custo (CHONG et al., 2013; DAVILA-VAZQUEZ et al., 2011; WANG et al., 2012).

A indústria de laticínios gera grande quantidade de efluentes de acordo com o produto obtido, como iogurte, leite e manteiga. O alto volume gerado de permeado de soro de queijo, provoca um problema em relação a sua disposição final, busca-se então novas alternativas para o tratamento desse resíduo (GIRARD et al., 2014).

O permeado de soro de queijo, é uma matéria prima de grande valor nutritivo, com alta concentração de lactose, fato que o torna atrativo como fonte de carbono para produção de hidrogênio. É obtido a partir da ultrafiltração do soro de leite, subproduto gerado da produção de queijo, é caracterizado por sua alta demanda química e biológica de oxigênio (DQO e DBO), composto de lactose (45-50 g/L), proteínas solúveis (6-8 g/L), lipídios (4-5 g/L), sais minerais (8-10% de extrato seco), incluindo NaCl, KCl e sais de cálcio, e ainda ácidos láctico, úrico e cítrico, ureia e vitaminas do grupo B. Devido à alta concentração de lactose, o permeado de soro tem sido utilizado como substrato para o crescimento de microrganismos (PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012; YOU et al., 2017).

Alguns estudos mostram a viabilidade da utilização do soro de queijo para a produção de hidrogênio, desde o soro de queijo, soro de queijo em pó e permeado de soro de queijo em pó. Estudos de Venetsaneas et al., (2009) estudaram a produção de hidrogênio em fermentação escura (sem adição de luz), utilizando o soro de queijo como substrato em um reator CSTR. A produção obtida pelos autores foi de 1,9 L de H₂/L.dia. Davila-Vazquez et al., (2008) estudou o processo fermentativo para produção de hidrogênio utilizando soro em pó. Os autores obtiveram um rendimento de 3,1 mol H₂/mol a lactose, para um pH de 6,0 e uma concentração de 15 g soro/L.

A utilização de subprodutos ou resíduos como substrato na produção de hidrogênio resulta em benefícios econômicos e ambientais. Porém, a produção de hidrogênio depende de vários fatores e a viabilidade da sua utilização deve ser avaliada através do desenvolvimento de condições operacionais que resultem em ganho energético e ambiental.

3.6 Produtos de valor agregado proveniente do soro de leite.

Nos processos fermentativos ocorre a produção de ácidos orgânicos, que tem amplo uso em indústrias farmacêuticas, alimentícias e químicas. Os ácidos orgânicos são compostos que possuem de dois a seis átomos de carbono em sua estrutura, sendo monocarboxilados de cadeia curta linear, úteis para utilização na indústria química como percursos de produtos químicos e derivados reduzidos.

Os principais métodos de produção dos ácidos orgânicos são por oxidação ou carboxilação de percursos químicos derivados do processamento do petróleo. Diante disso, a biorrefinaria para produção de ácidos por meio dos processos fermentativos, utilizando culturas puras, tem ganhado força, devido à possibilidade de utilização de matéria-prima oriunda de fonte de energia renovável, para a geração dos mesmos produtos alcançados nas refinarias convencionais, a partir da realização de processos microbiológicos. Na Tabela 3.3, encontram-se os valores comerciais de alguns destes compostos.

Tabela 3.3. Preço de mercado para diferentes compostos

Composto	Preço (USD/tonelada)
Ácido acético	400-800
Ácido butírico	2000
Ácido propiônico	1500-1700
Ácido lático	1000-2100
Etanol	800-2000
Ácido fórmico	950-1200

Fonte: (BASTIDAS-OYANEDEL et al., 2015).

O ácido láctico é um ácido orgânico amplamente utilizado na indústria alimentar e não alimentar, incluindo as indústrias cosmética e farmacêutica, e para produção de produtos químicos oxigenados e reguladores de crescimento vegetal. Nos últimos anos, tem sido empregado, como matéria prima na produção do biopolímero, ácido poli-láctico, que é uma alternativa biodegradável dos plásticos derivados de petroquímicos. O biopolímero é usado em suturas cirúrgicas, implantes ortopédicos, sistemas de liberação de medicamentos e produtos de consumo descartáveis (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2011; LIANG; MCDONALD; COATS, 2015).

O ácido butírico é produzido principalmente pela síntese química baseada no petróleo. Tendo aplicação industrial em aditivos para aumentar a fragrância de frutas e como composto aromático para a produção de perfumes, bebidas, alimentos e cosméticos, além de ser conhecido por possuir inúmeras aplicações na medicina, no campo da gastroenterologia, no tratamento de patologias hematológicas, metabólicas e neurológicas (JIANG et al., 2018; LIU; ZHU; YANG, 2006).

O ácido propiônico é um intermediário químico importante na síntese de herbicidas, é empregado na produção de plásticos a base de celulose, sabores de frutas, solventes, bases de perfume e borracha de butila para melhorar a resistência à abrasão. É usado na indústria alimentar para inibir o crescimento de fungos, leveduras e algumas bactérias (AHMADI; KHOSRAVI-DARANI; MORTAZAVIAN, 2017).

O ácido acético é o principal ingrediente do vinagre. Na indústria de alimentos é utilizado como condimento e conservante. É utilizado como precursor de vários compostos, que são usados como moléculas para produção de fármacos (aspirina, vitamina E e antibióticos betalactâmicos), agrotóxicos (inseticidas e fungicidas) e corantes (MOSCOVIZ et al., 2018).

A partir dos estudos realizados na literatura, verificou-se que a utilização da fermentação em um único estagio, com a presença de co-cultura, contendo um microrganismo de fermentação escura (sem adição de luz) e uma espécie de bactéria fotossintetizante, possam favorecer um aumento na produção de hidrogênio, visto que, essa abordagem, diminui o custo do processo produtivo e a capacidade de degradar os metabolitos produzido *in situ*.

3.7 Considerações Finais da Revisão Bibliográfica

A revisão de literatura teve como objetivo buscar conhecimento que fornecessem base teórica para melhorar o entendimento no processo de produção de hidrogênio a partir do sistema de co-cultura.

A fermentação escura (sem adição de luz), tem o maior potencial para produção de hidrogênio, onde são produzidos ácidos orgânicos e álcoois. Na fotofermentação utiliza bactérias fotossintetizantes purpuras não sulfuroosas, na presença de luz, e elas são capazes de converter completamente glicose a H₂ e CO₂, sendo um método que tem altos rendimentos de conversão teórica e capacidade usar compostos orgânicos derivados de resíduos como substratos.

A junção desses dois processos é chamada de sistema híbrido. É realizado a fermentação escura (sem adição de luz), com microrganismos anaeróbios estritos ou facultativos. Essa fermentação irá gerar um efluente que é rico em ácidos orgânicos, produzidos no processo fermentativo. Esse efluente é então utilizado na fotofermentação, com as seguintes etapas de pré-tratamento: Centrifugação, a fim de se retirar as células e possibilitar o uso do sobrenadante com adição de sais e correção de pH; e esterilização do meio, o qual será utilizado na fotofermentação (etapa em que acontecerá a conversão dos ácidos orgânicos).

A partir dos estudos realizados na literatura, verificou-se que a utilização da fermentação em um único estágio, com a presença de co-cultura, contendo um microrganismo de fermentação escura (sem adição de luz) e uma espécie de bactéria fotossintetizante, possam favorecer um aumento na produção de hidrogênio, visto que, essa abordagem, diminui o custo do processo produtivo e a capacidade de degradar os metabólitos produzido *in situ*.

A utilização de um subproduto agroindustrial para a produção de hidrogênio é interessante pelo baixo custo e pela grande disponibilidade, além de reduzir as suas quantidades nos processos industriais. Esses subprodutos possuem características individuais, que devem ser escolhidos estratégicamente para não dificultar as condições operacionais ideais.

CAPÍTULO 4

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

Neste estudo foram utilizadas três culturas puras de bactérias. O microrganismo anaeróbio facultativo utilizado foi *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* (CT) ATCC 13047, proveniente da coleção de microrganismos da Fundação Oswaldo Cruz. Duas cepas de bactérias púrpuras não sulfurosas: *Rhodopseudomonas palustris* DSM 123 e *Rhodobacter capsulatus* DSM 1710. Tais bactérias foram adquiridas de uma coleção alemã de microrganismos e cultura de células, a DSMZ (*German Collection of Microorganisms and Cell Culture*).

A *Enterobacter cloacae* foi mantida em meio sólido e refrigerado na temperatura de $4 \pm 2^\circ\text{C}$ e repicada mensalmente, em meio sólido de Caldo Nutriente (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Composição do meio Caldo Nutriente

Reagentes	Concentração (g/L)
Extrato de carne	3,0
Peptona	10,0
Fosfato de potássio dibásico	1,0
Cloreto de Sódio	5,0
Ágar	30,0
pH	$6,8 \pm 0,2$

Fonte: (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Após o repique em meio sólido, as cepas de *E. cloacae* permaneceram cerca de 24 horas em estufas a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ e, em seguida, foram transferidas para o meio líquido, sem adição de ágar, onde permaneceram por 48 horas e, posteriormente, foram utilizadas no processo fermentativo.

Os meios de cultivo foram preparados dissolvendo-se os reagentes em água deionizada, 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.

As bactérias fotossintetizantes foram cultivadas de forma separadas, em frascos Duran de 500 mL, sendo que, 300 mL de sua capacidade foram preenchidos com meio de cultura (290 mL) e inóculo (10 mL). Argônio era borbulhado ao meio por 3 minutos para garantir a anaerobiose. No período de 10 a 12 dias, as cepas foram centrifugadas e o sedimento era suspenso em um novo meio de cultura. Após a renovação do meio, os frascos foram mantidos em uma câmara de germinação a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$, com iluminação de 2200 lux.

O meio de cultura utilizado para a manutenção das bactérias fotossintetizantes foi o meio basal RCV (WEAVER; WALL; GEST, 1975), preparado pela dissolução dos itens relacionados nas Tabelas 4.2 e 4.3.

Tabela 4.2 - Componentes do meio RCV.

Reagente	Concentração (g/L)
Ácido Málico	4,02
KH ₂ PO ₄	0,60
K ₂ HPO ₄	0,90
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,12
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,075
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,02
Micronutrientes	1 mL
Tiamina	0,001
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,00

Tabela 4.3 - Composições da solução de micronutrientes utilizada no meio RCV.

Reagente	Concentração (g/L)
H ₃ BO ₃	2,80
MnSO ₄ H ₂ O	1,59
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0,75
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,24
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,075
CuCl ₂ 2H ₂ O	0,05

4.2 Substrato

Os substratos empregados nas fermentações foram glicose P.A. e a lactose presente no Permeado de Soro de queijo em pó. O Permeado de Soro de queijo em pó foi adquirido da empresa Sooro Concentrado Indústria de Produtos Lácteos Ltda. Estes, tinham a concentração final de açúcar ajustada para 10,00 g/L.

A caracterização do permeado de soro de queijo em pó foi realizado pela própria empresa o qual foi adquirido e está apresentada na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: 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 (saís minerais) (%)	Máximo 6,0	4,56
Lactose (%)	Mínimo 80	92,97

4.3 Reator

Os experimentos foram realizados em biorreatores de 1,5 L - módulo Fermentador TE-2003/1,5-E1 (Figura 4.2), com volume reacional de 700 mL, composto por 65 mL (9,3%) de inóculo e 635mL (90,7%) do meio fermentescível. No sistema de co-cultura, a relação entre as bactérias foram de 1:1. A temperatura da fermentação foi de $32^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e agitação de 130 rpm. Para os ensaios de fermentação escura não houve a presença de luz. Nos ensaios de fotofermentação, a intensidade luminosa foi de 5000 lux, mantida com lâmpada fluorescente (25 W). Após a preparação do reator, foi borbulhado gás ao meio, durante 15 minutos, para garantir um ambiente anaeróbio.

Figura 4.2 – Módulo Fermentador TE-2003/1,5-E1.



4.4 Condições dos Ensaios

O acompanhamento dos processos fermentativos foi realizado através da coleta de amostras periodicamente. Durante os ensaios, amostras do biogás foram coletadas e armazenadas em ampolas gasométricas (Construmaq LTDA, Brasil) para posterior análise. Simultaneamente, o biogás produzido foi quantificado através de um medidor de vazão volumétrica - MilliGas-Counter da Ritter Tipo MGC-1.

Para o acompanhamento do crescimento celular e da produção de metabólitos, amostras de 10 mL do meio reacional foram coletadas com utilização de seringa. Para cada amostra, mediu-se a concentração celular por absorbância e, em seguida, esta amostra foi centrifugada durante 15 min a 7730 g. A partir do sobrenadante coletado, realizou-se quantificação de ácidos orgânicos, etanol e açúcar através da cromatografia líquida de alta eficiência. As células separadas após centrifugação foram utilizadas para análise de concentração de sólidos voláteis (SV) pelo método gravimétrico. Ao longo do ensaio permitiu-se a queda do pH até o valor mínimo de 5,5 e este valor foi controlado até o final do processo por adição de solução de NaOH (0,1 M).

4.5 Ensaios de fermentação escura (sem adição de luz) e fotofermentação

Os ensaios para a produção de hidrogênio foram realizados em reator com alimentação repetida, verificando a influência do meio de cultivo, fonte de açúcar,

ausência de luz ou presença de luz constante, utilização de gás inerte, microrganismos e forma de alimentação.

Nos ensaios realizados na primeira etapa do trabalho foi avaliado a produção de hidrogênio, utilizando o microrganismo *Enterobacter cloacae*, com substrato glicose, sob influência de luminosidade e gases inertes, no meio de cultivo Caldo Nutriente. A Tabela 4.5, apresenta a sequência dos ensaios realizados.

Tabela 4.5: Ensaios avaliando o microrganismo *Enterobacter cloacae*, utilizando a glicose como substrato.

Ensaio	Cultura	Gás	Luminosidade
1	<i>E. cloacae</i>	Nitrogênio	Escuro
2	<i>E. cloacae</i>	Argônio	Escuro
3	<i>E. cloacae</i>	Nitrogênio	Claro
4	<i>E. cloacae</i>	Argônio	Claro

Na segunda etapa, foi avaliada a produção de hidrogênio, utilizando o microrganismo *Enterobacter cloacae*, com o substrato Permeado de Soro de queijo em pó, sob influência de luminosidade e gases inertes no meio de cultivo Caldo Nutriente. O Permeado de Soro de queijo em pó é um subproduto agroindustrial com alta concentração carbônica, sendo uma alternativa para diminuir o uso de fontes puras de carboidratos como substrato. A Tabela 4.6, apresenta a sequência dos ensaios realizados.

Tabela 4.6: Ensaios avaliando o microrganismo *Enterobacter cloacae*, utilizando o Permeado de Soro de queijo como substrato.

Ensaio	Cultura	Gás	Luminosidade
5	<i>E. cloacae</i>	Nitrogênio	Escuro
6	<i>E. cloacae</i>	Argônio	Escuro
7	<i>E. cloacae</i>	Nitrogênio	Claro
8	<i>E. cloacae</i>	Argônio	Claro

Na terceira etapa, foi avaliado o sistema de co-cultura para a produção de hidrogênio por fotofermentação, utilizando o microrganismo *Enterobacter cloacae* e as

bactérias púrpuras não sulfurosas: *Rhodopseudomonas palustris* ou *Rhodobacter capsulatus*, no meio de cultivo RCV, sob influência da fonte de carbono, com o gás inerte Argônio e iluminação constante. O processo fermentativo foi realizado em um único estágio, pois o microrganismo *Enterobacter cloacae* é produtor de ácidos orgânicos, e esses ácidos são utilizados como substratos para a produção de hidrogênio pelas bactérias fotossintetizantes. A Tabela 4.7, apresenta a sequência dos ensaios realizados.

Tabela 4.7: Ensaios avaliando o sistema de co-cultura, no meio de cultivo RCV.

Ensaio	Co-cultura	Substrato
9	<i>E. cloacae / R. palustris</i>	Glicose
10	<i>E. cloacae / R. capsulatus</i>	Glicose
11	<i>E. cloacae / R. palustris</i>	Permeado de Soro de queijo em pó
12	<i>E. cloacae / R. capsulatus</i>	Permeado de Soro de queijo em pó

Na quarta etapa, foi avaliado o sistema de co-cultura para a produção de hidrogênio por fotofermentação, utilizando o microrganismo *Enterobacter cloacae* e as bactérias púrpuras não sulfurosas: *Rhodopseudomonas palustris* ou *Rhodobacter capsulatus*, no meio de cultivo Caldo Nutriente, sob influência da fonte de carbono, com o gás inerte Argônio e iluminação constante. O processo fermentativo foi realizado em estágio único, de forma análoga à terceira etapa, modificado o meio de cultivo de RCV para Caldo Nutriente. A Tabela 4.8, apresenta a sequência dos ensaios realizados.

Tabela 4.8: Ensaios avaliando o sistema de co-cultura, no meio de cultivo Caldo Nutriente.

Ensaio	Co-cultura	Substrato
13	<i>E. cloacae / R. palustris</i>	Glicose
14	<i>E. cloacae / R. capsulatus</i>	Glicose
15	<i>E. cloacae / R. palustris</i>	Permeado de Soro de queijo em pó
16	<i>E. cloacae / R. capsulatus</i>	Permeado de Soro de queijo em pó

Na quinta etapa do trabalho, foi avaliada a produção de hidrogênio por fotofermentação, utilizando o sistema de co-cultura do microrganismo *Enterobacter*

cloacae e as bactérias púrpuras não sulfurosas: *Rhodopseudomonas palustris* e *Rhodobacter capsulatus*, empregando o substrato Permeado de Soro de queijo em pó e glicose de forma alternada, sob a influência dos meios de cultivo. A Tabela 4.9, apresenta a sequência dos ensaios realizados.

Tabela 4.9: Ensaios avaliando o sistema de co-cultura, empregando o substrato Permeado de Soro de queijo em pó e glicose de forma alternada.

Ensaio	Co-cultura	Meio de Cultivo
17	<i>E. cloacae / R. palustris</i>	RCV
18	<i>E. cloacae / R. capsulatus</i>	RCV
19	<i>E. cloacae / R. palustris</i>	Caldo Nutriente
20	<i>E. cloacae / R. capsulatus</i>	Caldo Nutriente

Nestes ensaios, a reposição da fonte de carbono foi feita somente após o consumo total do açúcar. Para os ensaios com a alternância de substrato seguiu a mesma metodologia, a concentração dos açúcares foi monitorada de maneira que, ao ser totalmente consumido, o segundo tipo de açúcar já foi adicionado para que não houvesse a falta de substrato.

4.6 Métodos analíticos

4.6.1 Quantificação do crescimento celular

A quantificação do crescimento celular foi feita pela análise de absorbância do meio fermentativo no espectrofotômetro modelo Shimadzu UVmini-1240 (comprimento de onda Apêndice A), em triplicata, sendo convertido em concentração de células (g/L) por meio de uma curva de calibração previamente estabelecida correlacionando a leitura de absorbância com a massa seca de células (Apêndice A).

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 durante 10 minutos a 8170 g. Ao sedimento formado, água destilada foi adicionada no mesmo volume da solução inicial, formando assim uma suspensão de bactérias, que era quantificada.

4.6.2 Quantificação de açúcares e metabólitos formados durante as fermentações

As análises das concentrações dos açúcares e dos metabólitos formados foram realizadas em triplicata por Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Figura 4.3), marca Shimadzu modelo LC-20A Prominence, coluna SUPELCOGEL C-610H. Empregou-se como fase móvel ácido fosfórico (0,1 %), com fluxo de 0,5 mL/min, temperatura do forno 32 °C e volume de injeção de 20 µL. As concentrações de açúcares e ácidos foram calculadas com auxílio de curvas padrão realizadas previamente (Apêndice A).

Figura 4.3 - Cromatógrafo utilizado na análise dos metabólitos formados e na quantificação de açúcares.



4.6.3 Quantificação de hidrogênio

O gás produzido foi coletado em seringas graduadas e sua composição determinada em triplicata através de cromatografia gasosa utilizando Cromatógrafo Gasoso modelo GC 2014, marca Shimadzu (Figura 4.4).

Figura 4.4 - Cromatógrafo utilizado para análise do biogás formado.



O Cromatógrafo é equipado com um detector de condutividade térmica e uma coluna capilar Carboxen 1010 (comprimento 30 m, diâmetro interno de 0,53 mm). O Argônio foi utilizado como gás de arraste. As temperaturas do injetor, da coluna e do detector durante as análises foram 230°C, 30°C e 230°C, respectivamente. Os valores obtidos de hidrogênio foram quantificados com o auxílio da curva de calibração. O tempo de análise foi de 17 minutos, sendo que o pico do hidrogênio foi formado em 1,25 minutos.

4.7 Conversão

O rendimento em mol de hidrogênio por mol de substrato consumido foi calculado segundo a Equação (4.1).

$$\text{Conversão} = \frac{\text{mol } H_2}{\text{mol de substrato consumido}} \quad (4.1)$$

4.8 Produtividade

O cálculo da produtividade, em relação ao hidrogênio produzido foi feito utilizando-se a Equação (4.2).

$$\text{Produtividade} = \frac{\text{mmol } H_2}{\text{volume reacional} \cdot \text{tempo de fermentação}} \quad (4.2)$$

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram utilizados como substratos os açúcares glicose P.A. e a lactose, oriunda do Permeado do Soro de queijo em pó, açucares presentes na maioria dos efluentes de laticínios, a fim de comparar os resultados obtidos. A glicose é um substrato de preferência dos microrganismos fermentativos por carboidratos, o que permite um maior entendimento sobre o processo envolvido na produção de hidrogênio. A utilização do Permeado do Soro de queijo em pó permitiu usar um substrato com a mesma composição em todos os ensaios e possibilitou, do ponto de vista da minimização de subprodutos agroindustriais nos processos industriais, a produção de um combustível baseado em fontes renováveis. Estes açúcares também são consumidos de forma preferencial pela a maioria dos microrganismos estudados.

A seguir são apresentados os resultados dos processos fermentativos (Itens 5.1 a 5.5), conduzido em regime de batelada repetida, avaliando a fonte de carbono, gás inerte, condições de luminosidade, meio de cultivo e a forma de alimentação do substrato.

5.1 Fermentações avaliando o microrganismo *Enterobacter cloacae*, com o substrato glicose.

Na primeira etapa do trabalho, foi estudado o comportamento da *Enterobacter cloacae*, para a produção de hidrogênio, utilizando glicose como fonte de carbono, com o meio de cultivo Caldo Nutriente, com modificações de luminosidade e gás inerte, para garantir a anaerobiose do meio. A finalidade dessa etapa foi analisar o comportamento do microrganismo, para utilizá-lo na fotofermentação com as bactérias fotossintetizantes.

5.1.1 Ensaio 1, com o gás inerte nitrogênio sem presença de luz.

As Figuras 5.1 a 5.4, apresentam os resultados do Ensaio 1. A Figura 5.1 correlaciona produtividade e conversão, a Figura 5.2 pH e concentração celular e as Figuras 5.3 e 5.4 a formação dos metabólitos, durante o processo fermentativo, utilizando nitrogênio como gás inerte e sem a presença de luz.

Nota-se, na Figura 5.1, que a produtividade de hidrogênio aumentou até o tempo de 60 horas, obtendo a máxima produtividade de 207,45 mmol H₂/L.dia com uma conversão de 1,95 mol de H₂/mol de hexose consumido.

Figura 5.1 – Produtividade e conversão, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte nitrogênio sem presença de luz e glicose.

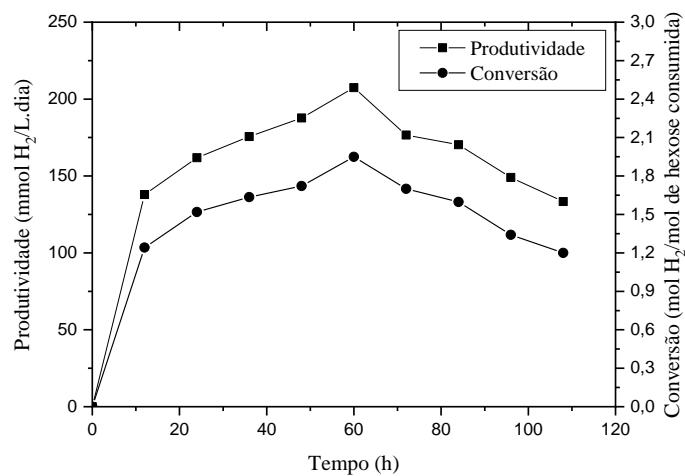
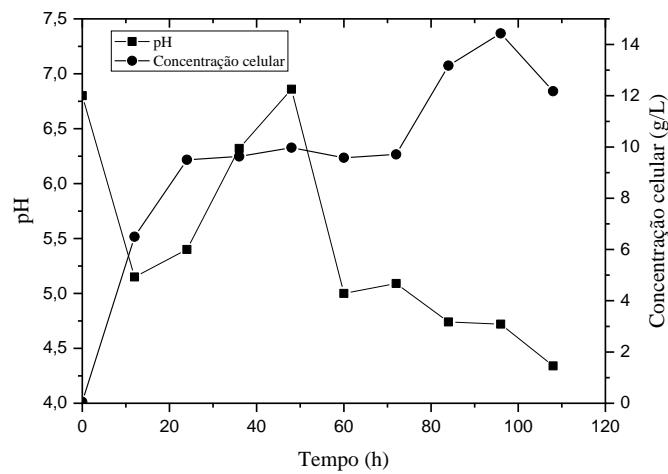


Figura 5.2 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte nitrogênio sem presença de luz e glicose.



A Figura 5.2 apresentou o crescimento celular e pH. A concentração celular aumentou de 0,05 g/L para 9,50 g/L em 24 horas do processo fermentativo. Até o tempo de 72 horas, observa-se uma nova fase de crescimento, chegando no final do processo fermentativo com 12,18 g/L. O pH inicial em todos os processos fermentativos é de 6,8 e ao longo do processo o pH foi ajustado para manter este parâmetro em 5,5 ponto a ponto. Verificou-se que no ponto seguinte ao ajuste de pH, ele já teria sofrido alterações, sendo os responsáveis pela sua variação, os ácidos orgânicos que são produzidos durante o processo fermentativo. O baixo pH entre

4,25 – 5, no intervalor de tempo de 60 a 120 h, justifica a baixa produção de hidrogênio, uma vez que o ótimo para atividade da hydrogenase é de 5,5 (LI; FANG, 2007).

Figura 5.3 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte nitrogênio sem presença de luz e glicose.

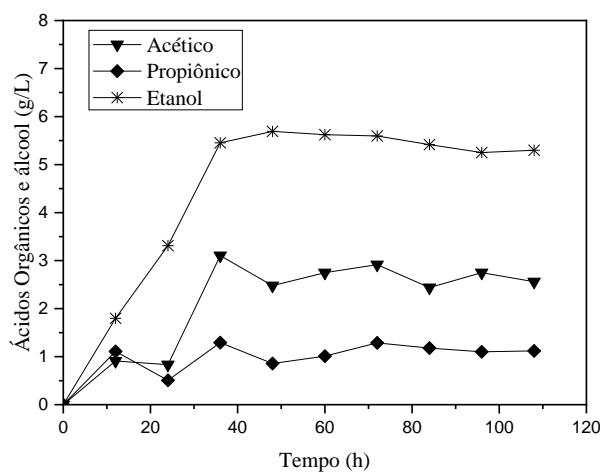
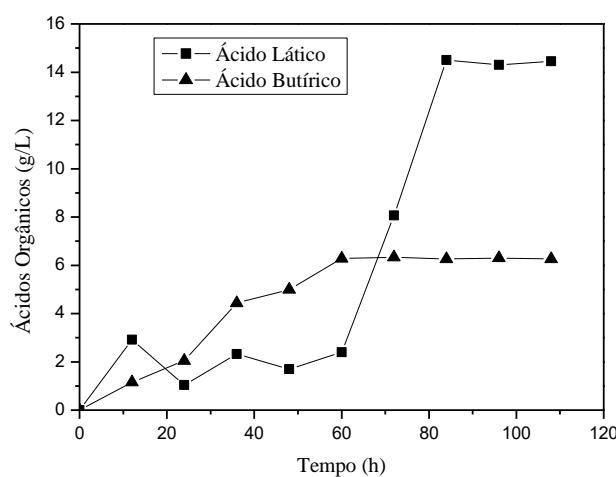


Figura 5.4 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte nitrogênio sem presença de luz e glicose.



Nas Figuras 5.3 e 5.4, observa-se a formação dos metabólitos. Há formação do ácido acético até o tempo de 36 horas, atingindo uma concentração de 3,10 g/L. Após esse tempo, ela se manteve até o final do processo fermentativo. O ácido propiônico foi produzido a partir do início da fermentação, mantendo sua concentração em 1,12 g/L. O ácido láctico foi produzido

em pequenas quantidades até o tempo de 60 horas, alcançando uma concentração de 2,40 g/L. Após esse tempo, o ácido láctico tem uma rápida produção até 85 h de processo, atingindo uma concentração de 14,45 g/L. O ácido butírico foi produzido de forma crescente durante a fermentação, até o tempo de 60 h e, em seguida se manteve constante, chegando a uma concentração de 6,26 g/L. Observa-se a síntese do etanol até o tempo de 30 horas, e manteve constante sua produção até o final do processo fermentativo, obtendo uma concentração final de 5,30 g/L.

A partir do tempo de 60 horas, verificou-se que com a correção do pH para 5,5, os pontos subsequentes, houve ainda um decaimento do pH, mesmo com a produção constante dos ácidos, há uma possibilidade de produção de outros ácidos orgânicos, em que não foi possível a sua detecção na coluna utilizada na cromatografia líquida de alta eficiência.

A produção de hidrogênio pode ser estimada através da produção dos metabólitos (ácidos acético, butírico, propiônico) conforme apresentados nas Equações (3.7), (3.8) e (3.9), tal fato se confirma ao analisar a produtividade entre o tempo de 12 a 60 horas de processo fermentativo, e após esse tempo de 60 h a concentração celular aumenta e a produção de hidrogênio diminui, mostrando que a síntese não é associada.

5.1.2 Ensaio 2, com o gás inerte argônio sem presença de luz.

As Figuras 5.5 a 5.8, apresentam os resultados do Ensaio 2. A Figura 5.5 correlaciona produtividade e conversão, a Figura 5.6 pH e concentração celular e as Figuras 5.7 e 5.8 a formação dos metabólitos, durante o processo fermentativo, utilizando argônio como gás inerte e sem a presença de luz.

Nota-se na Figura 5.5 que, a produtividade máxima obtida foi de 184,67 mmol H₂/L.dia com uma conversão de 1,66 mol de H₂/mol de hexose consumido no tempo de 12 horas. Houve um pequeno decréscimo na produtividade até o tempo de 72 horas, com produtividade de 163,46 mmol H₂/L.dia. No tempo de 84 horas obteve-se o segundo ponto de produtividade máxima de 178,17 mmol H₂/L.dia. O uso do gás argônio, permitiu alcançar a produtividade máxima no início do processo fermentativo. Em comparação ao Ensaio 1 utilizando o gás nitrogênio, obteve uma produtividade 12,3 % maior que o Ensaio 2, porém essa produtividade foi alcançada em um tempo superior (60 h).

Na Figura 5.6, observa-se o crescimento celular até o tempo de 24 horas atingindo uma concentração de 4,49 g/L, mantendo essa concentração até o tempo de 84 horas. No final do processo fermentativo a concentração celular foi de 6,64 g/L, perfil semelhante ao encontrado

no Ensaio 1. O pH se manteve por volta de 6,0 até o tempo de 60 horas. Após esse período, houve um decréscimo no valor do pH, chegando no final do processo fermentativo em 4,2, conforme observa-se o aumento das concentrações de ácidos da Figura 5.7 e 5.8.

Figura 5.5 – Produtividade e conversão, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte argônio sem presença de luz e glicose.

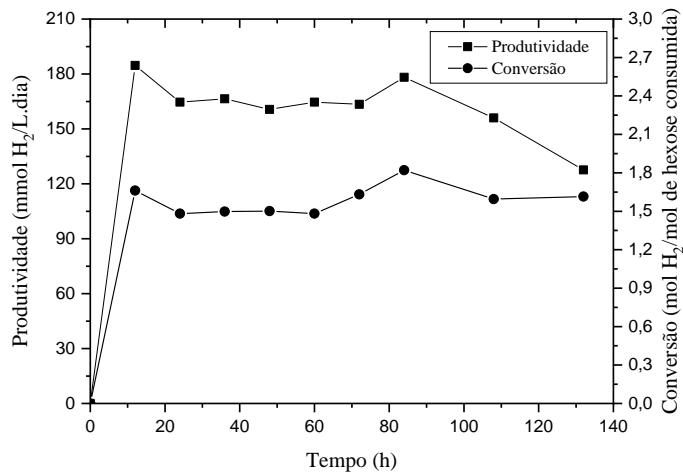
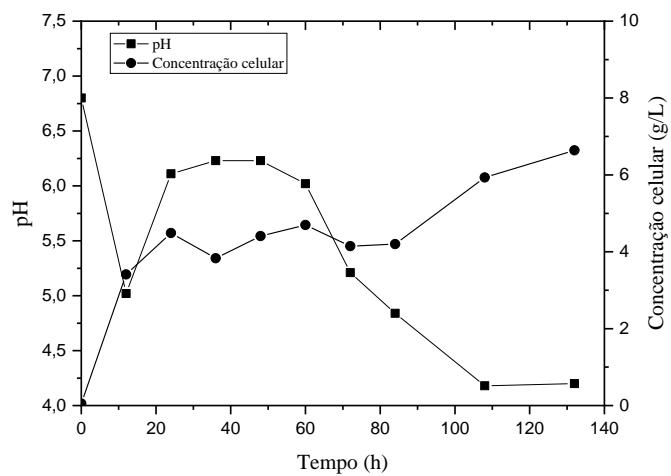


Figura 5.6 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte argônio sem presença de luz e glicose.



Observa-se a formação dos metabólitos na Figura 5.7. O ácido acético foi produzido até o tempo de 24 horas, com concentração de 2,70 g/L. Até o tempo de 48 horas verifica-se o que ácido acético foi consumido, chegando a uma concentração de 0,03 g/L. Após esse tempo, ele volta a ser produzido, alcançando uma concentração final de 6,73 g/L. Caso semelhante ao

ácido acético acontece com o ácido propiônico. No tempo de 24 horas atinge uma concentração de 2,08 g/L, há o consumo do ácido propiônico até o tempo de 72 horas, e volta a ser produzido. Em comparação ao Ensaio 1, observa-se que após o tempo de 72 horas, há um aumento na concentração dos ácidos e a produção de H₂ é diminuída, que está relacionada ao avanço da toxicidade do meio por conta da produção dos metabólitos e ao pH baixo, que está fora da atividade enzimática ótima.

Figura 5.7 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte argônio sem presença de luz e glicose.

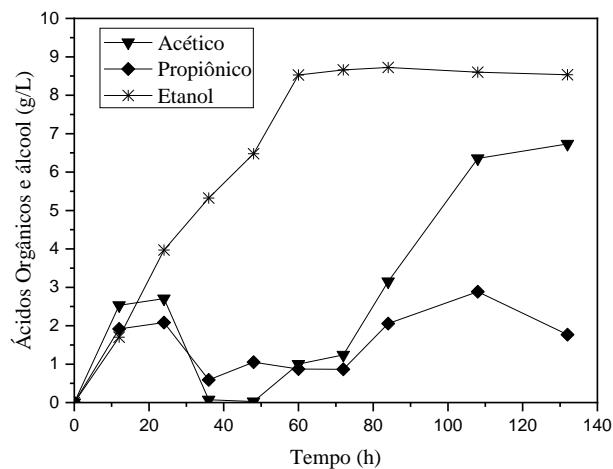
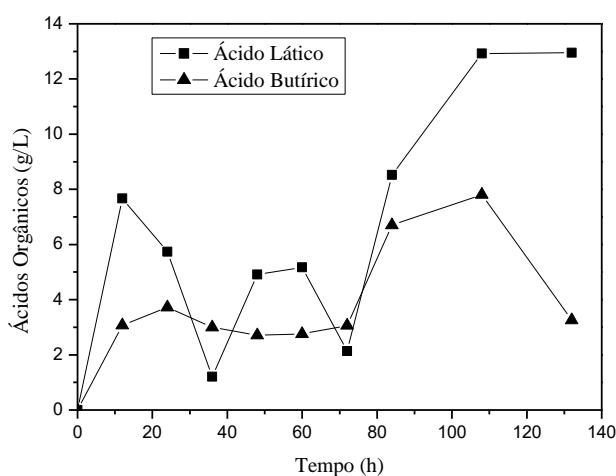


Figura 5.8 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte argônio sem presença de luz e glicose.



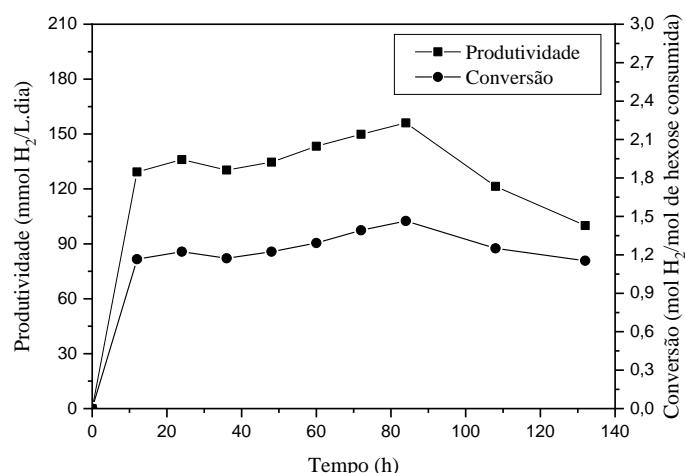
Na Figura 5.8, verifica-se que o ácido lático atinge a concentração de 7,67 g/L no tempo de 12 horas e, após atingir essa concentração, 85% dele é consumido. Após esse período, ele volta a ser produzido, alcançando uma concentração de 12,95 g/L. Ocorreu a produção estável do ácido butírico, até o tempo de 72 horas. O etanol foi sintetizado continuamente durante o processo fermentativo, obtendo ao final, uma concentração de 8,53 g/L.

5.1.3 Ensaio 3, com o gás inerte nitrogênio com a presença de luz.

As Figuras 5.9 a 5.12, apresentam os resultados do Ensaio 3. A Figura 5.9 correlaciona produtividade e conversão, a Figura 5.10 pH e concentração celular e as Figuras 5.11 e 5.12 a formação dos metabólitos, durante o processo fermentativo, utilizando nitrogênio como gás inerte e com a presença de luz.

Nota-se na Figura 5.9, que no tempo de 24 horas, obteve-se uma produtividade de 136,02 mmol H₂/L.dia, e passadas mais 60 horas, obteve-se a produtividade máxima de 156,09 mmol H₂/L.dia com uma conversão de 1,46 mol de H₂/mol de hexose consumido no tempo de 84 horas. Após esse tempo, a produtividade diminuiu. Verifica-se que o uso do gás nitrogênio para garantir a anaerobiose do meio, eleva o tempo da produtividade máxima, o mesmo ocorrido no Ensaio 1.

Figura 5.9 – Produtividade e conversão, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte nitrogênio com a presença de luz e glicose.



Na Figura 5.10, observou-se um rápido crescimento celular até o tempo de 24 horas atingindo uma concentração de 4,22 g/L e, somente após o tempo de 72 horas, houve um crescimento significativo de células, chegando no final do processo fermentativo com 7,16 g/L.

Até o tempo de 72 horas, o pH se manteve na faixa de 5,5 – 6,0, chegando a 4,5 no fim da fermentação, o que é confirmado pela produção dos ácidos orgânicos nas Figuras 5.11 e 5.12.

Figura 5.10 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte nitrogênio com a presença de luz e glicose.

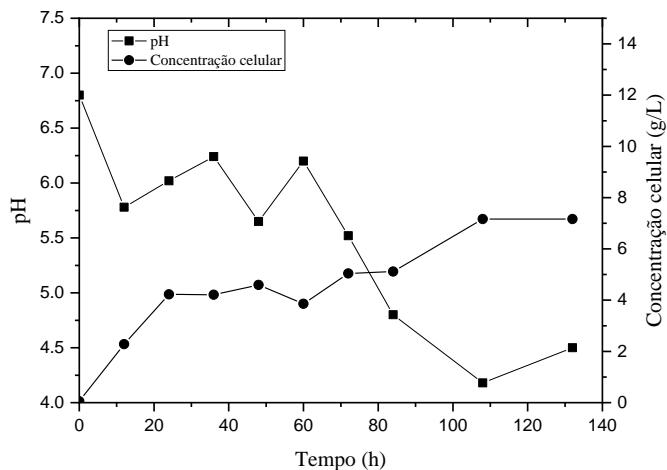
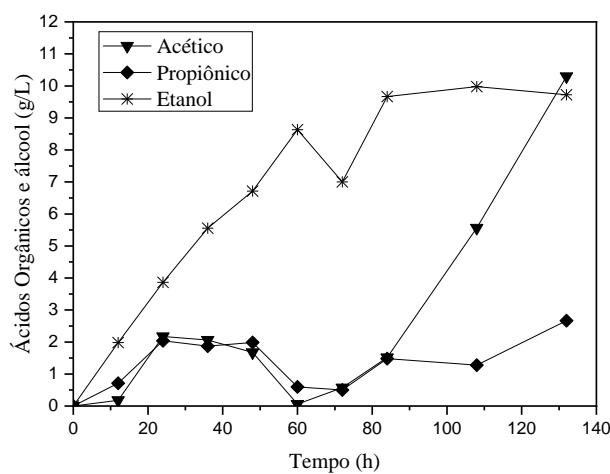


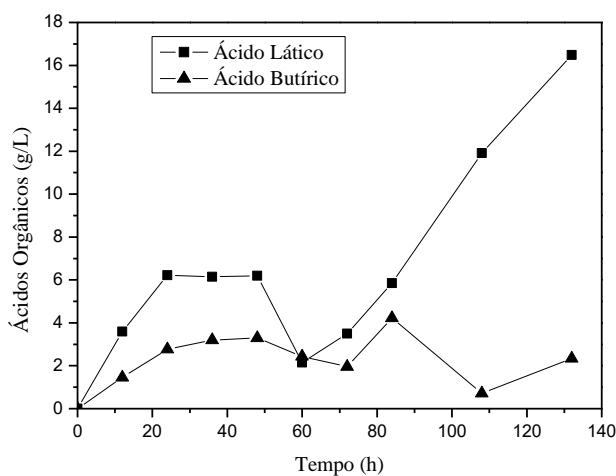
Figura 5.11 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte nitrogênio com a presença de luz e glicose.



Observa-se a formação dos metabólitos nas Figuras 5.11 e 5.12. O ácido acético foi produzido até o tempo de 48 horas, observa-se o consumo dele até o tempo de 60 horas. Após esse tempo, ele volta a ser produzido em quantidades significativas, alcançando uma concentração final de 10,29 g/L. O mesmo foi observado para o ácido propiônico, inicialmente

ocorreu a produção, ele foi consumido e voltou a ser produzido, chegando a uma concentração de 2,67 g/L. O ácido láctico atingiu a concentração de 6,22 g/L no tempo de 24 horas, manteve essa concentração por mais 24 horas, 65% dele foi consumido, e voltou a ser produzido, alcançando uma concentração de 16,48 g/L.

Figura 5.12 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte nitrogênio com a presença de luz e glicose.



A produção do ácido butírico ocorreu de forma constante no tempo de 20 a 70 horas, com ligeira oscilação entre produção e consumo de 70 a 130 horas, chegando na concentração de 2,33 g/L. O etanol foi sintetizado e continuamente durante o processo fermentativo até o tempo de 84 horas, obtendo no final, uma concentração de 9,72 g/L.

5.1.4 Ensaio 4, com o gás inerte argônio com a presença de luz.

As Figuras 5.13 a 5.16, apresentam os resultados do Ensaio 4. A Figura 5.13 correlaciona produtividade e conversão, a Figura 5.14 pH e concentração celular e as Figuras 5.15 e 5.16 a formação dos metabólitos, durante o processo fermentativo, utilizando argônio como gás inerte e com a presença de luz.

O comportamento da produtividade de hidrogênio do Ensaio 4 foi similar ao do Ensaio 3 utilizando o gás nitrogênio. Na Figura 5.13, observa-se que nas primeiras 24 horas, foi alcançado uma produtividade de 150,43 mmol H₂/L.dia, chegando a uma produtividade máxima de 174,57 mmol H₂/L.dia com uma conversão de 1,64 mol de H₂/mol de hexose

consumido no tempo de 60 horas. Os valores de produtividades encontrados nos Ensaios de 1 a 4, são próximo, o que indica, que a *E. cloacae* é capaz de metabolizar em condições distintas.

Figura 5.13 – Produtividade e conversão, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte argônio com a presença de luz e glicose.

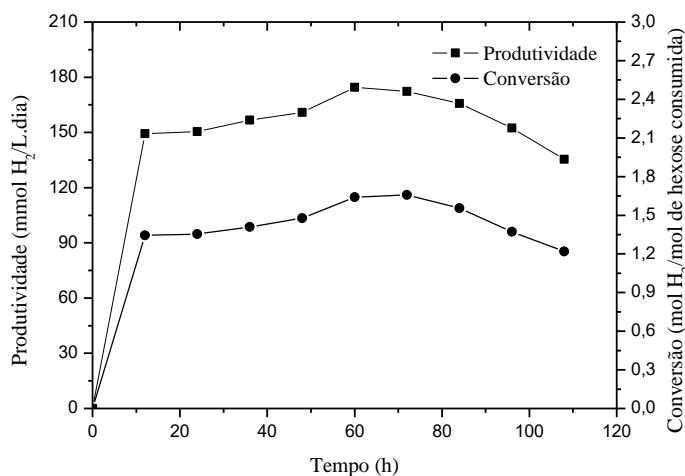
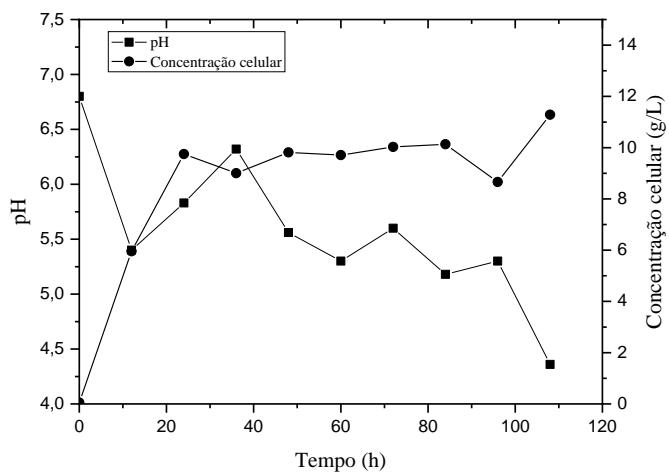


Figura 5.14 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte argônio com a presença de luz e glicose.



Na Figura 5.14 observa-se o rápido crescimento celular até o tempo de 24 horas, chegando em uma concentração de 9,75 g/L e se manteve com pequenas variações de concentração celular até o final do processo fermentativo. O pH se manteve na faixa de 5,3 – 5,8 durante quase todo o processo fermentativo.

Nas Figuras 5.15 e 5.16, observa-se a formação dos metabólitos. A formação do ácido acético e propiônico foi pequena, mas se manteve durante toda a fermentação, chegando a uma concentração final de 0,35 e 1,56 g/L, respectivamente. O ácido láctico foi produzido em pequenas quantidades até o tempo de 36 horas, alcançando uma concentração de 1,17 g/L. Após esse tempo, o ácido láctico volta a ser produzido em quantidades significativas até o fim da fermentação, atingindo uma concentração de 12,32 g/L.

Figura 5.15 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte argônio com a presença de luz e glicose.

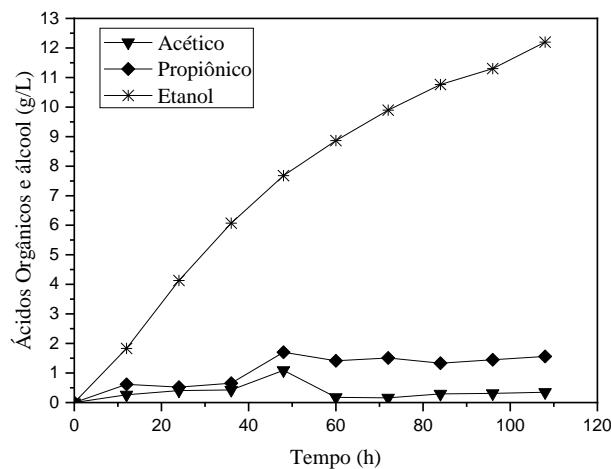
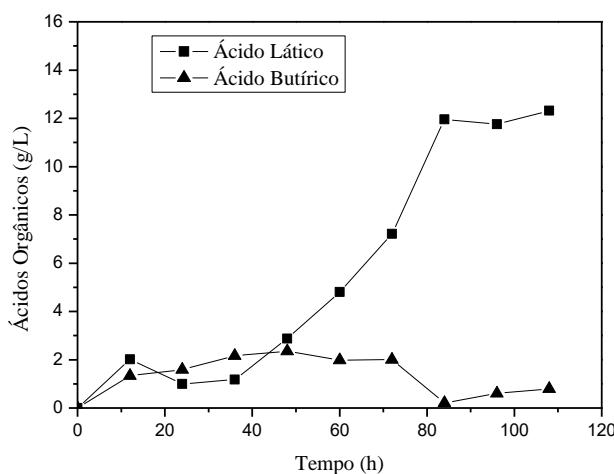


Figura 5.16 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte argônio com a presença de luz e glicose.



O ácido butírico foi produzido de forma constante durante a fermentação até o tempo de 72 horas, sendo observado o seu consumo, até o final do processo fermentativo, chegando a uma concentração de 0,8 g/L. O etanol foi sintetizado durante toda a fermentação, sem evidenciar o seu consumo. Este fato pode estar relacionado ao decaimento da produção de hidrogênio após 80 horas de processo fermentativo.

5.1.5 Consolidado dos Ensaios de 1 a 4

Na Tabela 5.1 observa-se um consolidado dos resultados obtidos nos Ensaios de 1 a 4, apresentados nos itens 5.1.1 a 5.1.4.

Analizando a influência da presença ou não de luz e o tipo de gás inerte na produção de hidrogênio utilizando a glicose como fonte de substrato, o comportamento da produtividade foi semelhante em todos os ensaios. A produtividade máxima do Ensaio 1 foi 12,3 % superior ao do Ensaio 2 em que ambos não tinham a presença de luz, tendo mudança apenas no tipo do gás inerte utilizado. A produtividade máxima para o Ensaio 4, foi superior em 11,8 %, ambos ensaios com a presença de luz, sendo que no Ensaio 3 foi utilizado o nitrogênio como gás inerte.

Tabela 5.1 - Consolidação dos Ensaios de 1 a 4.

	Ensaio 1 ^a	Ensaio 2 ^b	Ensaio 3 ^c	Ensaio 4 ^d
Produtividade máxima (mmol H ₂ /L.dia)	207,45	184,67	156,09	174,57
Tempo da produtividade máxima (h)	60	12	84	60
Conversão (mol de H ₂ /mol de hexose)	1,95	1,66	1,46	1,64
Ácido lático (g/L)	14,45	12,95	16,48	12,32
Ácido acético (g/L)	2,56	6,73	10,29	0,35
Ácido propiônico (g/L)	1,12	1,77	2,67	1,56
Ácido butírico (g/L)	6,26	3,26	2,33	0,80
Etanol (g/L)	5,30	8,53	9,72	12,20

^a – *E. cloacae*, glicose, nitrogênio, escuro.

^b – *E. cloacae*, glicose, argônio, escuro.

^c – *E. cloacae*, glicose, nitrogênio, claro.

^d – *E. cloacae*, glicose, argônio, claro.

A diferença dos resultados de produtividade utilizando diferentes gases e presença ou não de luz, caracteriza que o microrganismo *Enterobacter cloacae* consegue metabolizar em ambas condições, que era esperada, pois o microrganismo é quimiotrófico. Isso sugere que a luz não é um fator limitante de crescimento para produção de hidrogênio. Nos Ensaios de

1 a 4, foi observado que a formação de ácido láctico comprometeu a produção de hidrogênio. Para o ácido acético, as suas concentrações foram baixas em todos os ensaios, exceto no Ensaio 3.

A produção biológica de hidrogênio é um processo muito complexo, sendo no presente trabalho, influenciado pela forma de alimentação dos substratos e pelo tipo de inóculo utilizado. A disponibilidade do substrato no meio reacional, pode aumentar a capacidade da bactéria produzir hidrogênio durante todo o processo fermentativo, concentrações de substratos em níveis altos, afeta na produção do H₂. A forma de alimentação repetida do substrato favorece o não o acumulo de substrato no meio, fazendo com que as bactérias consumam todo o substrato para que ele seja novamente reposto. Torres de Souza et al. (2019) estudaram produção de hidrogênio utilizando a *E. cloacae* e verificaram a produção de ácidos: butírico, láctico e acético, nas primeiras horas de fermentação, o mesmo observado neste trabalho.

Nath, Kumar e Das (2005) estudaram a produção de hidrogênio utilizando a *Enterobacter cloacae*, empregando glicose como fonte de substrato, argônio como gás inerte e sem a presença de luz. A conversão obtida pelos autores foi de 1,86 mol de H₂/mol de glicose consumida. Mohanraj et al. (2014) apresentaram em suas pesquisas a produção de hidrogênio na condição de temperatura ambiente, utilizando *Enterobacter cloacae*, com 10,0 g/L de glicose, e o gás inerte nitrogênio. O rendimento obtido na condição de fermentação escura (sem adição de luz) foi de 1,44 mol de H₂/mol de glicose. Os valores de conversão encontrados no presente trabalho, foram na ordem de 1,46 a 1,95 mol de H₂/mol de hexose.

A produção de hidrogênio pode ser estimada através da produção de ácido acético e ácido butírico formados durante o processo fermentativo. A formação destes metabólitos contribuiu para maior produção de hidrogênio ao meio fermentativo. Essa atribuição está baseada em estudos da literatura que mostra que o aumento da produção de hidrogênio é acompanhado pela produção dos ácidos acético e butírico, conforme as Equações (3.7) e (3.8), usando glicose como substrato (WANG e WAN, 2009; HAFEZ et al., 2010).

Em seus estudos, Mohanraj et al. (2014), verificaram que as concentrações dos principais metabólitos do processo fermentativo para produção de hidrogênio estavam na ordem acético > butírico > etanol > propiônico, enquanto que neste estudo, sob as mesmas condições foi láctico > butírico > etanol > acético > propiônico.

O efluente gerado pela fermentação escura (sem adição de luz) do microrganismo *Enterobacter cloacae*, é rico em ácidos orgânicos (láctico, acético, butírico e propiônico), sendo utilizado como substrato para fotofermentação utilizando o próprio microrganismo *Enterobacter cloacae*. Verificou-se que não houve produção de hidrogênio, para este ensaio,

indicando que o microrganismo *Enterobacter cloacae* não tem a capacidade de consumir os metabólitos produzidos por ele na fotofermentação para produção de hidrogênio.

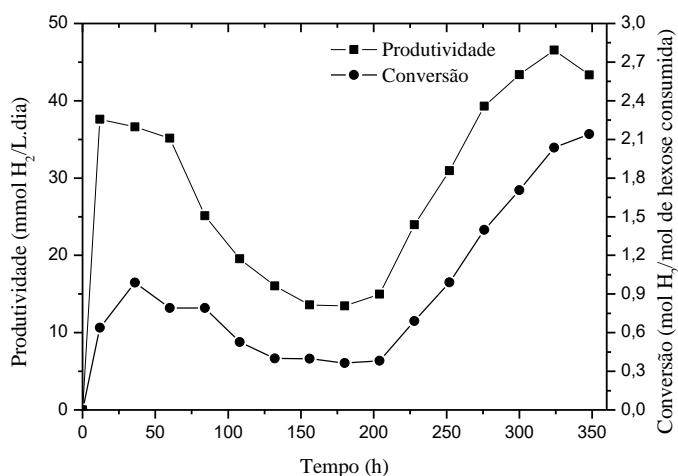
5.2 Fermentações avaliando o microrganismo *Enterobacter cloacae*, com o substrato lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.

Na segunda etapa do trabalho, foi estudado o comportamento da *Enterobacter cloacae*, para a produção de hidrogênio, utilizando lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono, com o meio de cultivo Caldo Nutriente, com modificações de luminosidade e gás inerte, para garantir a anaerobiose do meio.

5.2.1 Ensaio 5, com o gás inerte nitrogênio sem a presença de luz.

As Figuras 5.17 a 5.20, apresentam os resultados do Ensaio 5. A Figura 5.17 correlaciona produtividade e conversão, a Figura 5.18 pH e concentração celular e as Figuras 5.19 e 5.20 a formação dos metabólitos, durante o processo fermentativo, utilizando nitrogênio como gás inerte e sem a presença de luz.

Figura 5.17 – Produtividade e conversão, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte nitrogênio sem a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.

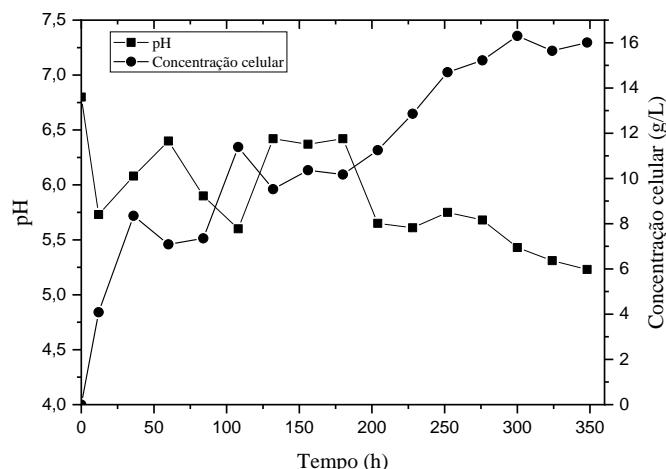


Nota-se na Figura 5.17, que a produtividade de hidrogênio teve dois picos máximos. O primeiro pico de máxima produtividade foi no tempo de 12 horas, com produtividade de 37,61 mmol H₂/L.dia e conversão de 0,64 mol de H₂/mol de hexose consumido.

O segundo pico de produtividade foi no tempo de 324 horas, com produtividade de 46,56 mmol H₂/L.dia e conversão de 2,03 mol de H₂/mol de hexose consumido. Em comparação ao Ensaio 1, com mudança apenas no tipo de substrato, verifica-se um comportamento diferente de produtividade e conversão quando foi utilizado a glicose, com valores 4 vezes menores.

Observa-se na Figura 5.18 que o pH manteve na faixa de 5,5 – 6,0 por todo o processo fermentativo. Para a concentração celular, nas primeiras 36 horas de fermentação, tem um crescimento rápido, e o seu crescimento é contínuo até o tempo de 300 horas, chegando a uma concentração final de 16,01 g/L.

Figura 5.18 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte nitrogênio sem a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.



Nas Figuras 5.19 e 5.20 observa-se a formação dos metabólitos. Há formação de ácido acético até o tempo de 180 horas, atingindo uma concentração de 4,91 g/L. Após esse tempo, ele é consumido até o final do processo fermentativo, chegando a uma concentração de 1,74 g/L. O ácido propiônico foi produzido em pequenas quantidades durante todo o processo fermentativo, atingindo uma concentração final de 0,69 g/L. O ácido lático foi produzido em pequenas quantidades até o tempo de 156 horas, alcançando uma concentração de 0,12 g/L. Após esse tempo, o ácido lático é produzido em quantidade maiores até o fim da fermentação, atingindo uma concentração de 3,30 g/L.

O ácido butírico foi produzido de forma crescente durante a fermentação após o tempo de 132 horas, chegando a uma concentração final de 12,84 g/L. Observa-se a síntese do etanol a partir do tempo de 36 horas, sendo contínua sua produção até o tempo de 228 horas, com uma

concentração de 5,5 g/L. No final do processo fermentativo, atinge-se uma concentração de etanol final de 3,86 g/L.

Figura 5.19 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte nitrogênio sem a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.

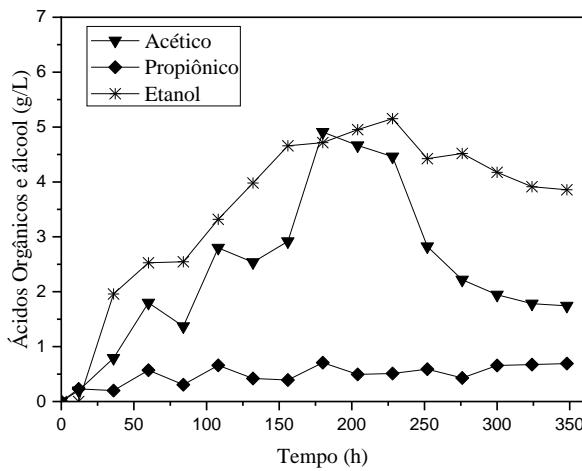
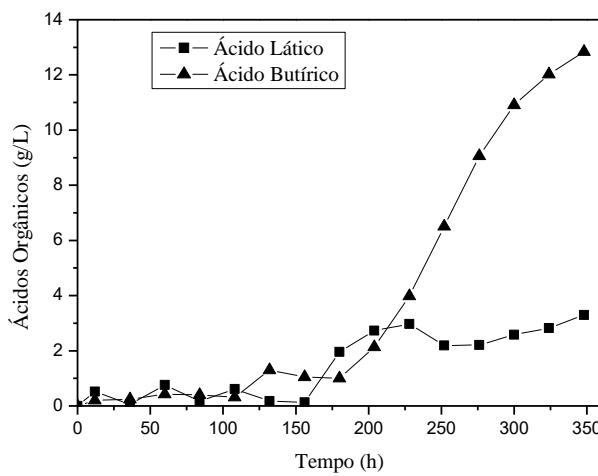


Figura 5.20 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte nitrogênio sem a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.



5.2.2 Ensaio 6, com o gás inerte argônio sem a presença de luz.

As Figuras 5.21 a 5.24, apresentam os resultados do Ensaio 6. A Figura 5.21 correlaciona produtividade e conversão, a Figura 5.22 pH e concentração celular e as Figuras

5.23 e 5.24 a formação dos metabólitos, durante o processo fermentativo, utilizando argônio como gás inerte e sem a presença de luz.

Nota-se na Figura 5.21 que, a produtividade máxima obtida foi de 176,05 mmol H₂/L.dia com uma conversão de 2,28 mol de H₂/mol de hexose consumido no tempo de 12 horas. Ao longo do processo fermentativo, a produtividade de hidrogênio, foi diminuindo de forma lenta.

Figura 5.21 – Produtividade e conversão, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte argônio sem a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.

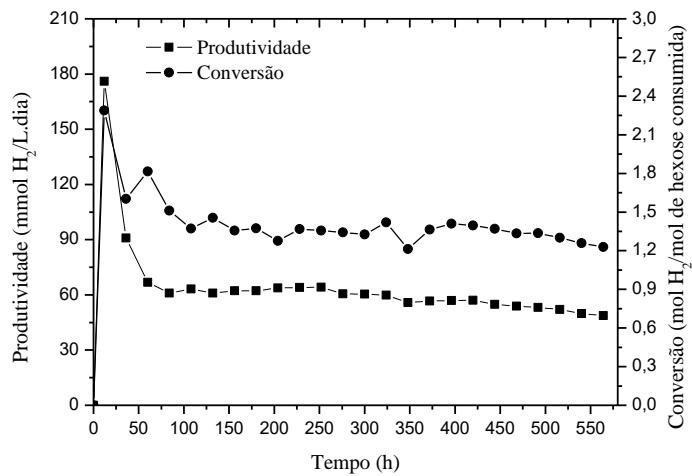
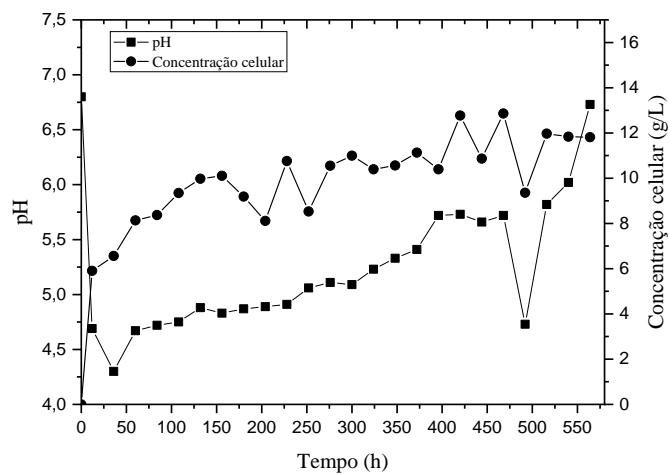


Figura 5.22 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte argônio sem a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.



Na Figura 5.22 observa-se que, o crescimento celular até o tempo de 12 horas atinge uma concentração de 5,90 g/L e, o seu crescimento é contínuo até o final do processo

fermentativo, obtendo uma concentração de 11,81 g/L. O pH nas 36 horas de fermentação é de 4,3, indicando produção de ácidos orgânicos e é controlado na faixa de 5 – 5,5.

Observa-se a formação dos metabólitos nas Figuras 5.23 e 5.24. No tempo de 228 horas, o ácido acético atinge uma concentração de 4,69 g/L e é consumido nas próximas 48 horas. Após esse tempo, ele volta a ser produzido, alcançando uma concentração final de 5,10 g/L. O ácido propiônico tem uma produção significativa até o tempo de 324 horas, com concentração de 15,18 g/L, e após esse tempo ele começa a ser consumido até o final da fermentação, atingindo uma concentração final de 9,14 g/L.

Figura 5.23 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte argônio sem a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.

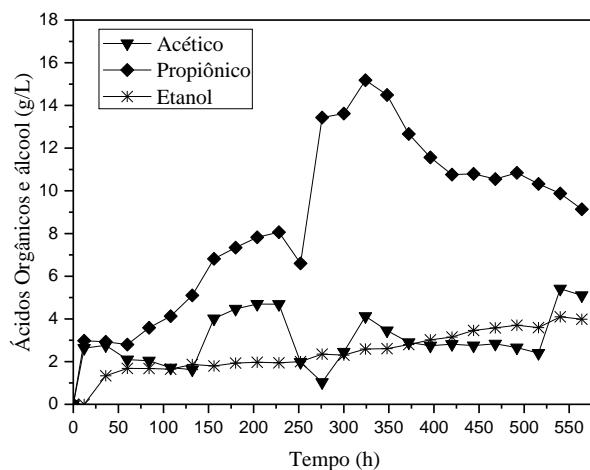
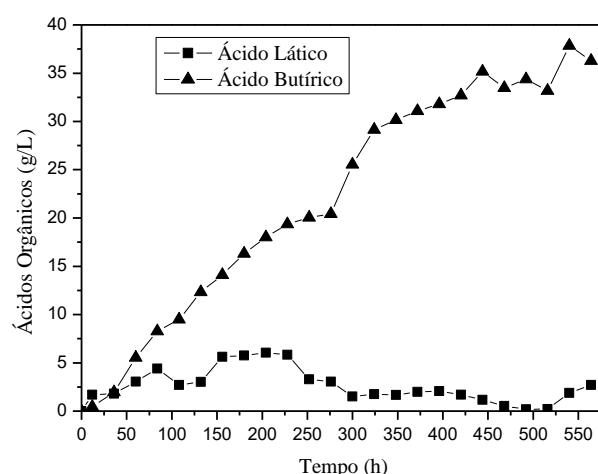


Figura 5.24 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte argônio sem a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.



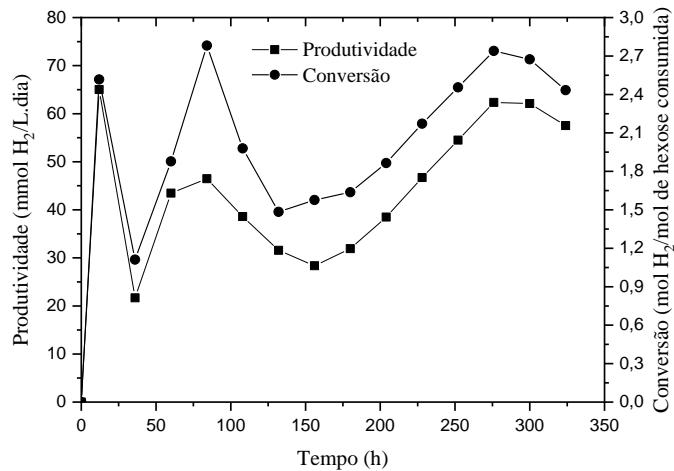
Observa-se para o ácido láctico a sua produção e consumo durante a fermentação. Sua concentração máxima foi de 6,05 g/L e no final do processo fermentativo foi de 2,69 g/L. O ácido butírico foi produzido em quantidades significativas durante toda a fermentação, atingindo uma concentração final de 36,28 g/L. O etanol foi sintetizado continuamente durante o processo fermentativo, obtendo no final, uma concentração de 3,99 g/L.

5.2.3 Ensaio 7, com o gás inerte nitrogênio com a presença de luz.

As Figuras 5.25 a 5.28 apresentam os resultados do Ensaio 7. A Figura 5.25 correlaciona produtividade e conversão, a Figura 5.26 pH e concentração celular e as Figuras 5.27 e 5.28 a formação dos metabólitos, durante o processo fermentativo, utilizando nitrogênio como gás inerte e com a presença de luz.

Nota-se na Figura 5.24, que a produtividade máxima alcançada foi de 65,01 mmol H₂/L.dia, com uma conversão de 2,51 mol de H₂/mol de hexose consumido no tempo de 12 horas. Observa-se que produtividade após decréscimo até cerca de 156 horas, voltou a crescer ao longo do processo fermentativo.

Figura 5.25 – Produtividade e conversão, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte nitrogênio e com a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.



Na Figura 5.26, observa-se um rápido crescimento celular até o tempo de 12 horas atingindo uma concentração de 7,10 g/L e após esse tempo, o seu crescimento é constante até o final do processo fermentativo, atingindo uma concentração de 17,58 g/L. Nas 12 primeiras

horas o pH teve uma queda até atingir 4,78. Passado esse tempo, o seu valor durante o processo fermentativo foi mantido entre 5 e 6,5.

Figura 5.26 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte nitrogênio e com a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.

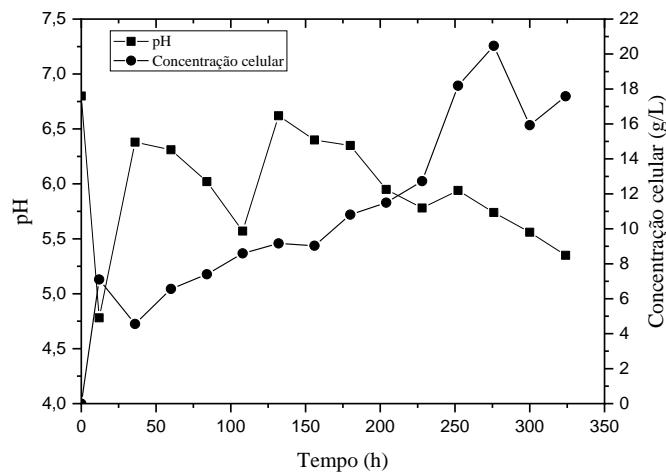
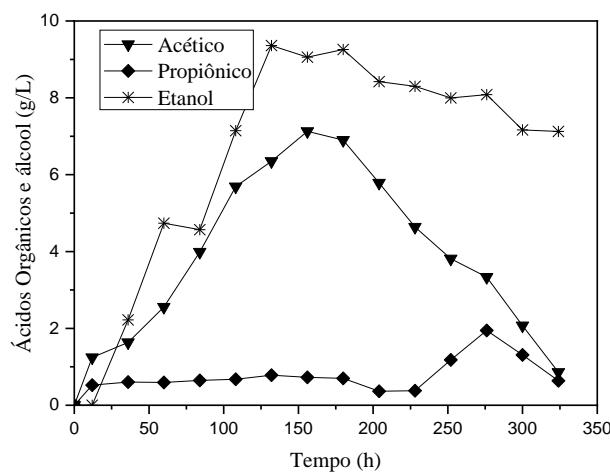


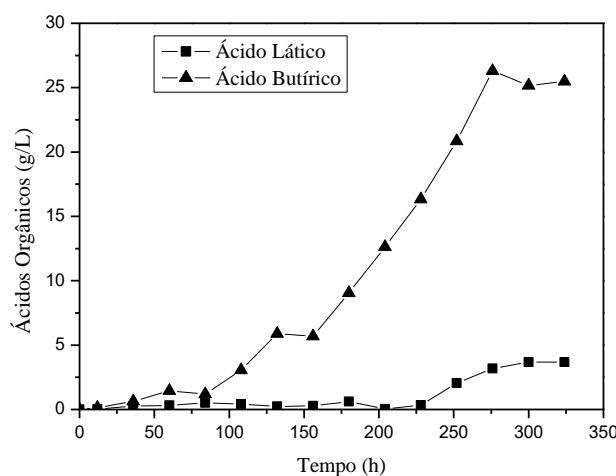
Figura 5.27 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte nitrogênio e com a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.



Ressalta-se a formação dos metabólitos nas Figuras 5.27 e 5.28. O ácido acético foi produzido até o tempo de 156 horas, com uma concentração de 7,13 g/L. Passado esse tempo, observa-se o consumo dele até o final do processo fermentativo, restando apenas 0,86 g/L. O

ácido propiônico foi produzido em pequenas quantidades, chegando ao máximo de 1,94 g/L no tempo de 276 horas. O ácido láctico foi produzido em pequenas quantidades até o tempo de 228 horas, após esse tempo, ele atinge a concentração de 3,68 g/L no final do processo fermentativo.

Figura 5.28 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte nitrogênio e com a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.



Ocorre a produção contínua e significativa do ácido butírico, durante todo o processo fermentativo, chegando na concentração de 25,49 g/L. O etanol foi sintetizado significativamente até tempo de 180 horas, com uma concentração de 9,25 g/L, e passado esse tempo, cerca de 23 % é consumido até o final do processo fermentativo.

5.2.4 Ensaio 8, com o gás inerte argônio com a presença de luz.

As Figuras 5.29 a 5.32, apresentam os resultados do Ensaio 8. A Figura 5.29 correlaciona produtividade e conversão, a Figura 5.30 pH e concentração celular e as Figuras 5.31 e 5.32 a formação dos metabólitos, durante o processo fermentativo, utilizando argônio como gás inerte e com a presença de luz.

O comportamento da produtividade de hidrogênio do Ensaio 8 foi similar ao do Ensaio 6. Na Figura 5.29 observa-se que, no tempo de 12 horas é alcançado a produtividade de 197,63 mmol H₂/L.dia, com uma conversão de 2,70 mol de H₂/mol de hexose consumido.

Passado esse tempo, observa-se que a produtividade cai e tem um leve aumento no tempo 252 horas.

Figura 5.29 – Produtividade e conversão, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte argônio e com a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.

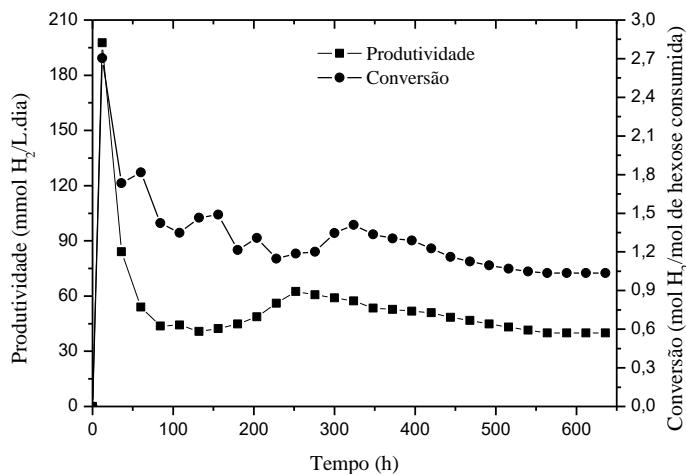
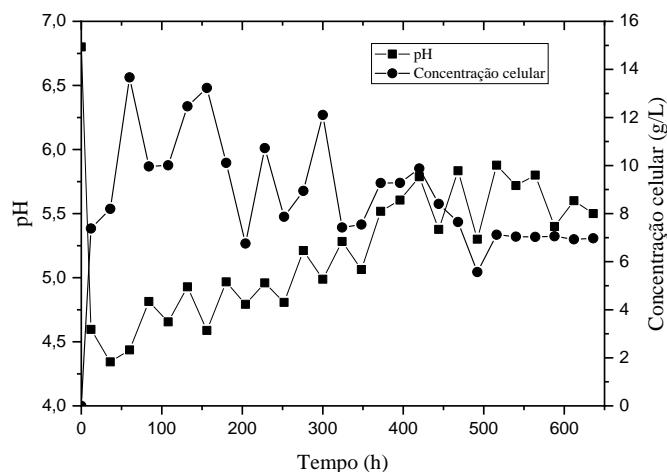


Figura 5.30 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte argônio e com a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.



Na Figura 5.30 nota-se o rápido crescimento celular até o tempo de 60 horas, chegando em uma concentração de 13,67 g/L e se manteve com variações de concentração celular, até o final do processo fermentativo, com concentração final de 6,97 g/L. O pH chega a 4,34 no

tempo de 36 horas, e manteve-se na faixa de 5,0 – 5,8 após o tempo de 300 horas, até o final do processo fermentativo.

Nas Figuras 5.31 e 5.32, observa-se a formação dos metabólitos. Observa-se para o ácido acético, 3 momentos de sua produção (60, 156 e 540 horas) e 2 momentos de consumo (132 e 516 horas). No final do processo fermentativo, a concentração de ácido acético foi de 3,65 g/L.

Figura 5.31 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte argônio e com a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.

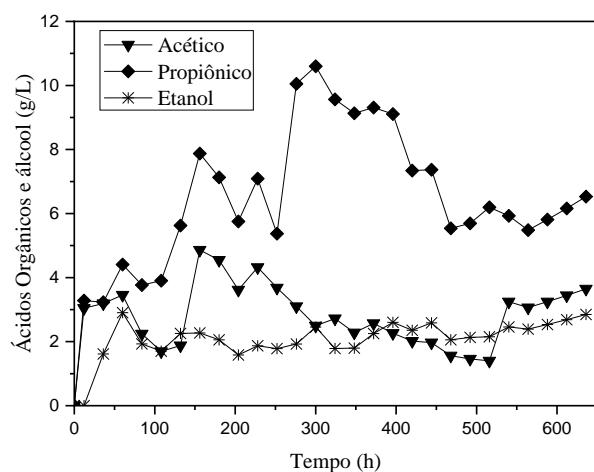
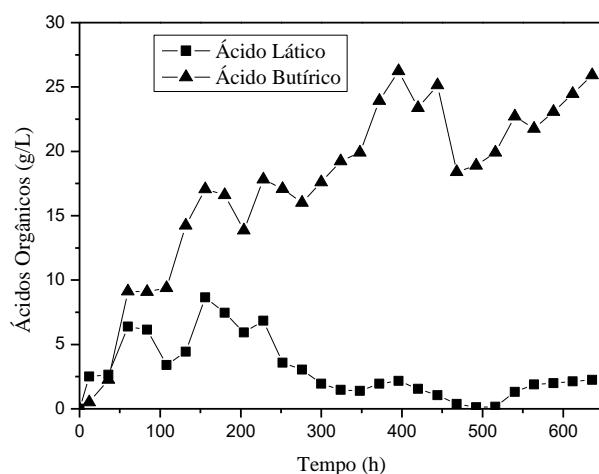


Figura 5.32 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, utilizando *E. cloacae*, com o gás inerte argônio e com a presença de luz e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó.



O ácido propiônico foi produzido em quantidades significativas, atingindo uma concentração de 10,60 g/L, no tempo de 300 horas. Após esse tempo, o ácido propiônico é consumido, chegando em concentração final de 6,53 g/L. O ácido lático é produzido até o tempo de 156 horas, com uma concentração de 8,66 g/L. Ele foi consumido e no final do processo fermentativo volta a ser produzido, atingindo 2,24 g/L de concentração. O ácido butírico foi produzido de forma contínua durante a fermentação, chegando a uma concentração de 25,93 g/L. O etanol foi sintetizado durante toda a fermentação, sem evidenciar o seu consumo expressivo, atingindo uma concentração final de 2,85 g/L.

5.2.5 Consolidado dos Ensaios de 5 a 8

Na Tabela 5.2 observa-se um consolidado dos resultados obtidos nos Ensaios de 5 a 8, apresentados nos itens 5.2.1 a 5.2.4.

Tabela 5.2 - Consolidação dos Ensaios de 5 a 8.

	Ensaio 5 ^a	Ensaio 6 ^b	Ensaio 7 ^c	Ensaio 8 ^d
Produtividade máxima (mmol H ₂ /L.dia)	46,55	176,05	65,01	197,63
Tempo da produtividade máxima (h)	324	12	12	12
Conversão (mol de H ₂ /mol de hexose)	2,04	2,29	2,52	2,70
Ácido lático (g/L)	3,30	2,69	3,68	2,24
Ácido acético (g/L)	1,74	5,10	0,86	3,64
Ácido propiônico (g/L)	0,69	9,14	0,63	6,53
Ácido butírico (g/L)	12,84	36,28	25,49	25,93
Etanol (g/L)	3,86	3,99	3,68	2,85

^a – *E. cloacae*, permeado, nitrogênio, escuro.

^b – *E. cloacae*, permeado, argônio, escuro.

^c – *E. cloacae*, permeado, nitrogênio, claro.

^d – *E. cloacae*, permeado, argônio, claro.

Analizando a influência da presença ou não de luz e o tipo de gás inerte na produção de hidrogênio utilizando lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono, com o meio de cultivo Caldo Nutriente, pode ser observado que os melhores resultados de produtividade foram para os Ensaios 6 e 8, utilizando o gás inerte argônio. A utilização do argônio como gás inerte, não favoreceu a produção de ácido acético, favorecendo uma crescente produção do ácido butírico. Nos Ensaios 6 e 8, a produtividade máxima foi encontrada no tempo de 12 horas e ocorreu uma queda, ficando constante até o final do processo fermentativo.

Para os Ensaios 5 e 7, o uso do gás inerte nitrogênio favoreceu a produção do ácido acético até por volta do tempo de 160 horas. Passado esse tempo, o ácido acético começou a ser consumido e o ácido butírico produzido em quantidades significativas, beneficiando a produção de hidrogênio. Em comparação aos ensaios da Etapa 1, verificou-se valores maiores de produtividade, menores tempos de fermentação, maiores produções de lático e etanol, utilizando a fonte de carbono glicose. Com o uso da lactose proveniente do permeado de soro de queijo em pó, observou-se maior produção de ácido butírico, porém, a produção de hidrogênio não é sustentada.

A diferença dos resultados de produtividade com a influência da presença ou não de luz, não é tão grande, o que caracteriza que o microrganismo *Enterobacter cloacae* consegue metabolizar em diferentes situações, apresentando diferença ao utilizar gases inertes diferentes.

Foi observado que as fermentações utilizando lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono, atingiram concentrações celulares maiores, quando comparados às fermentações em que utilizou-se a glicose como fonte de carbono. Observa-se uma maior produção do ácido butírico nos ensaios utilizando lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono, favorecendo a produção de hidrogênio conforme as Equações (3.7) e (3.18), enquanto nos ensaios utilizando a glicose como fonte de carbono, o ácido mais produzido foi o ácido lático.

A fonte de carbono ajuda a fornecer energia para o metabolismo celular e a formação de produtos. A glicose pura é um substrato de alto custo, portanto, a utilização de um subproduto agroindustrial ou de matéria-prima renovável, é uma alternativa viável e econômica para produção de hidrogênio. Comparando com os resultados dos Ensaios de 1 a 4, onde foi utilizado glicose como fonte de carbono, e os Ensaios de 5 a 8, utilizando lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó, verifica-se que o uso desse subproduto, permite alcançar valores significativos na produção de hidrogênio.

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 (sem adição de luz) e utilizando glicose) e de 1,80 mols de H₂/mol de hexose (utilizando lactose). Comparando com o resultado alcançado no presente trabalho, a conversão foi 27 % superior ao encontrado na literatura.

Khanna et al., (2012), utilizou o gás inerte argônio em fermentação escura (sem adição de luz) para a *E. cloacae*. O rendimento obtido foi de 1,90 mol H₂/mol de hexose. Comparando

com este trabalho em que o gás argônio foi utilizado, verifica-se que o presente trabalho foi superior em 20 % sem a presença de luz, e de 42 % com a presença de luz.

5.3 Fermentações avaliando o sistema de co-cultura em fotofermentação com o meio basal RCV.

Na terceira etapa do trabalho, foi estudado o sistema de co-cultura para a produção de hidrogênio por fotofermentação, utilizando o microrganismo *Enterobacter cloacae* e as bactérias púrpuras não sulfurosas, *Rhodopseudomonas palustris* ou *Rhodobacter capsulatus*, no meio de cultivo RCV, sobre as influências da fonte de carbono, com o gás inerte Argônio e sob iluminação constante. O processo fermentativo foi realizado em um único estágio, pois o microrganismo *Enterobacter cloacae* é produtor de ácidos orgânicos, e esses ácidos são utilizados como substratos para a produção de hidrogênio pelas bactérias fotossintetizantes.

5.3.1 Ensaio 9, com o sistema co-cultura *Enterobacter cloacae* / *Rhodopseudomonas palustris*, utilizando glicose como fonte de carbono.

As Figuras 5.33 a 5.36, apresentam os resultados do Ensaio 9. A Figura 5.33 correlaciona produtividade e conversão, a Figura 5.34 pH e concentração celular e as Figuras 5.35 e 5.36 a formação dos metabólitos, durante a fotofermentação, com o sistema co-cultura *Enterobacter cloacae* / *Rhodopseudomonas palustris*, utilizando glicose como fonte de carbono.

Observa-se pelos resultados apresentados na Figura 5.33 que a máxima produtividade obtida foi de 90,47 mmol H₂/L.dia com uma conversão de 1,55 mol de H₂/mol de hexose consumido no tempo de 12 horas.

Na Figura 5.34, observa-se o que pH foi mantido entre 5 e 5,5. O comportamento do pH está diretamente ligado na produção dos ácidos orgânicos no meio fermentativo. Nota-se que a concentração celular atinge 7,60 g/L e vai sofrendo oscilações durante a fotofermentação, chegando a uma concentração celular final de 4,24 g/L.

Nas Figuras 5.35 e 5.36, observa-se a formação dos metabólitos. Nota-se que o ácido acético e propiônico são produzidos em pequenas quantidades durante todo o processo, chegando no final com concentração de 1,38 e 1,89 g/L, respectivamente.

Figura 5.33 – Produtividade e conversão, com co-cultura de *E. cloacae* / *R. palustris*, utilizando glicose como fonte de carbono em meio RCV.

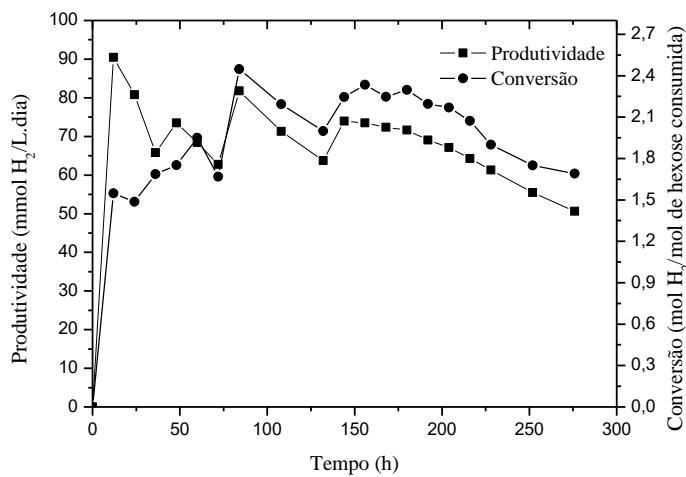
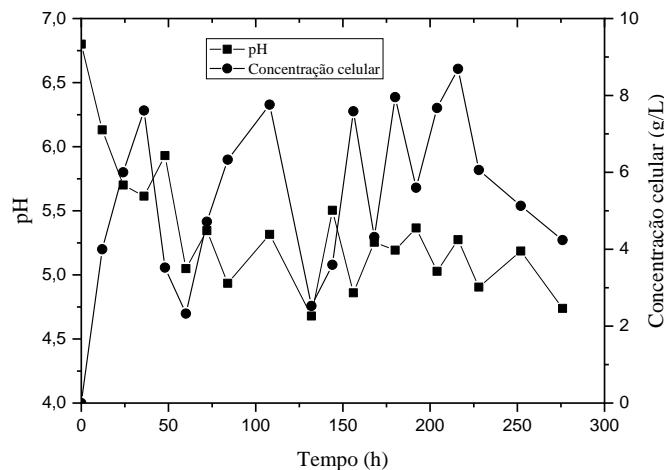


Figura 5.34 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, com co-cultura de *E. cloacae* / *R. palustris*, utilizando glicose como fonte de carbono em meio RCV.



O ácido lático foi produzido até o tempo de 72 horas, com uma concentração de 3,95 g/L. Ele foi consumido e volta a ser produzido até o tempo de 228 horas depois então, volta a ser consumido, atingindo uma concentração no final do processo fermentativo de 5,09 g/L. O ácido butírico atingiu uma produção máxima de 5,82 g/L no tempo de 228 horas e 2,56 g/L, no final do processo fermentativo. O etanol foi sintetizado até o tempo de 36 horas, com concentração de 1,70 g/L, manteve a sua concentração até o tempo de 192 horas, e voltou a ser produzido até o final da fotofermentação com concentração de 3,87 g/L.

Figura 5.35 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, com co-cultura de *E. cloacae / R. palustris*, utilizando glicose como fonte de carbono em meio RCV.

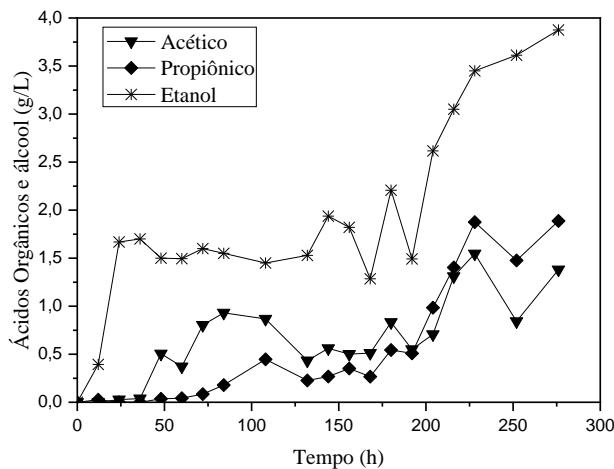
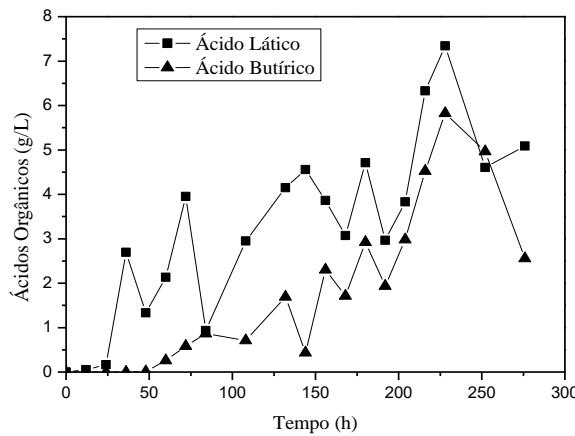


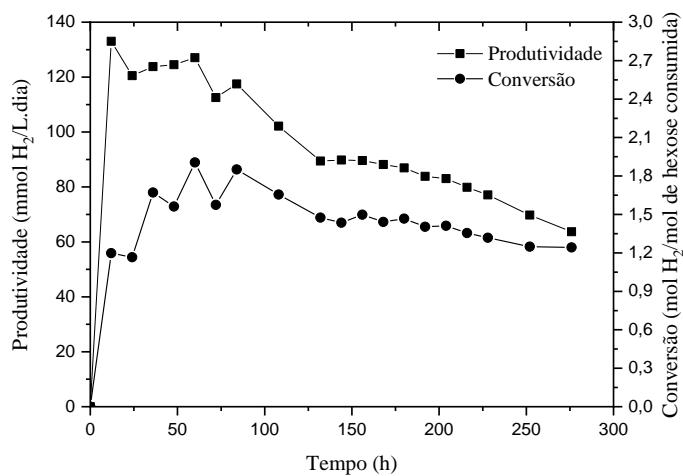
Figura 5.36 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, com co-cultura de *E. cloacae / R. palustris*, utilizando glicose como fonte de carbono em meio RCV.



5.3.2 Ensaio 10, com o sistema co-cultura *Enterobacter cloacae / Rhodobacter capsulatus*, utilizando glicose como fonte de carbono.

As Figuras 5.37 a 5.40, apresentam os resultados do Ensaio 10. A Figura 5.37 correlaciona produtividade e conversão, a Figura 5.38 pH e concentração celular e as Figuras 5.39 e 5.40 a formação dos metabólitos, durante a fotofermentação, com o sistema co-cultura *Enterobacter cloacae / Rhodobacter capsulatus*, utilizando glicose como fonte de carbono.

Figura 5.37 – Produtividade e conversão, com co-cultura de *E. cloacae / R. capsulatus*, utilizando glicose como fonte de carbono em meio RCV.



Nota-se na Figura 5.37, a produtividade máxima obtida foi de 133,04 mmol H₂/L.dia com uma conversão de 1,19 mol de H₂/mol de hexose consumido no tempo de 12 horas. Ao longo do processo fermentativo, a produtividade de hidrogênio, foi diminuindo de forma lenta e constante.

Na Figura 5.38 observa-se que, o crescimento celular até o tempo de 36 horas atinge uma concentração de 6,45 g/L, ocorre uma diminuição da concentração celular e no tempo de 216 horas, atinge a sua concentração celular máxima de 9,79 g/L. Nesse ensaio, observa-se que o pH, teve pequenas variações, ficando em torno de 4,90 – 5,30.

Figura 5.38 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, com co-cultura de *E. cloacae / R. capsulatus*, utilizando glicose como fonte de carbono em meio RCV.

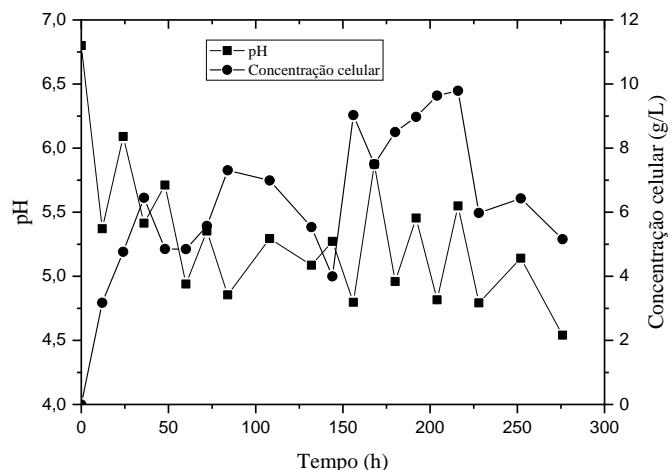
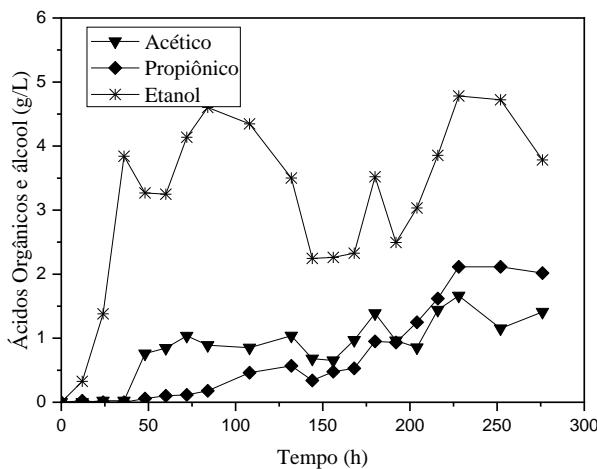
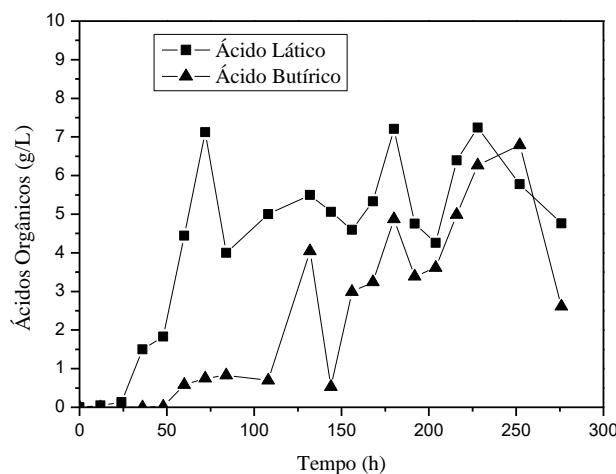


Figura 5.39 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, com co-cultura de *E. cloacae / R. capsulatus*, utilizando glicose como fonte de carbono em meio RCV.



Observa-se a formação dos metabólitos nas Figuras 5.39 e 5.40. Para o ácido acético, a sua produção é em pequenas quantidades, chegando no final do processo fermentativo, com uma concentração de 1,41 g/L. O ácido propiônico tem o comportamento parecido com o ácido acético, atingindo uma concentração final de 2,02 g/L.

Figura 5.40 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, com co-cultura de *E. cloacae / R. capsulatus*, utilizando glicose como fonte de carbono em meio RCV.



O ácido láctico atinge uma concentração de 7,12 g/L, no tempo de 72 horas. Após, são observadas fases de consumo e produção até o final do processo fermentativo quando a observada concentração de 4,76 g/L. O ácido butírico foi produzido em quantidades pequenas

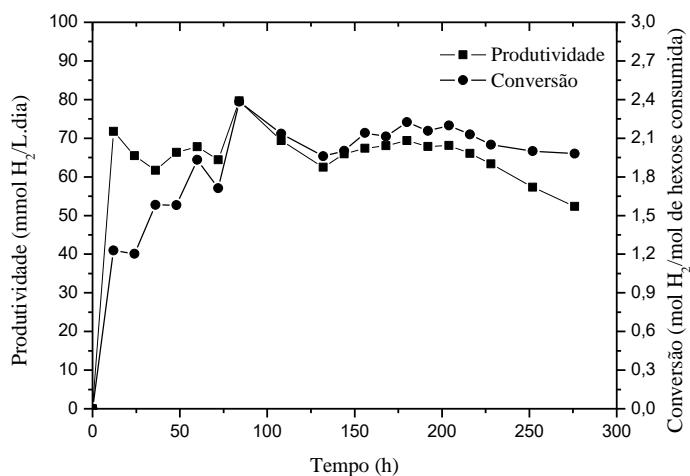
até o tempo de 108 horas, após esse tempo, a sua produção máxima é de 6,78 g/L no tempo de 252 horas. O etanol foi sintetizado continuamente até o tempo de 84 horas, com concentração de 4,60 g/L. No final do processo fermentativo, a sua concentração é de 3,78 g/L.

5.3.3 Ensaio 11, com o sistema co-cultura *Enterobacter cloacae / Rhodopseudomonas palustris*, utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono.

As Figuras 5.41 a 5.44, apresentam os resultados do Ensaio 11. A Figura 5.41 correlaciona produtividade e conversão, a Figura 5.42 pH e concentração celular e as Figuras 5.43 e 5.44 a formação dos metabólitos, durante a fotofermentação, com o sistema co-cultura *Enterobacter cloacae / Rhodopseudomonas palustris*, utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono.

Nota-se na Figura 5.41 que, no tempo de 12 horas, a produtividade foi de 71,80 mmol H₂/L.dia com uma conversão de 1,23 mol de H₂/mol de hexose consumido. Em seguida, no tempo de 84 horas obteve-se a produtividade máxima de 79,68 mmol H₂/L.dia com uma conversão de 2,38 mol de H₂/mol de hexose consumido.

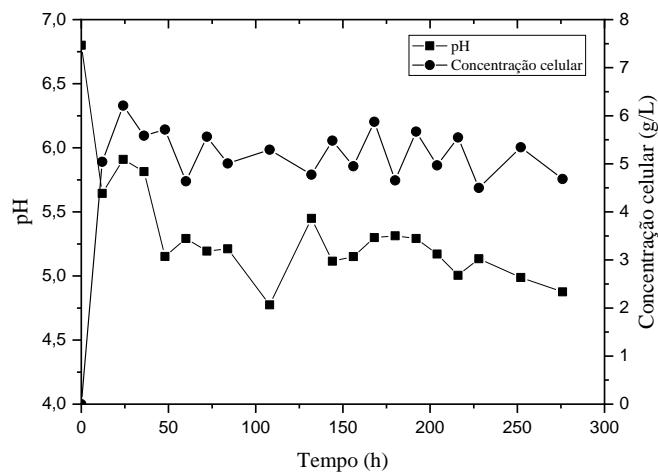
Figura 5.41 – Produtividade e conversão, com co-cultura de *E. cloacae / R. palustris*, utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio RCV.



Na Figura 5.42, observa-se um rápido crescimento celular até o tempo de 24 horas atingindo uma concentração de 6,21 g/L. A concentração celular se manteve com pequenas

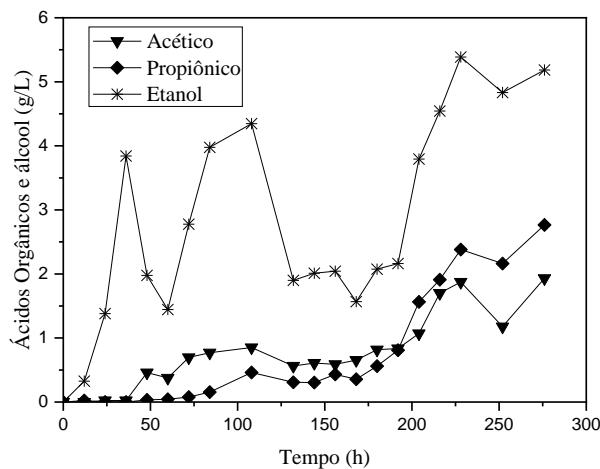
oscilações até o final do processo fermentativo, com concentração de 4,68 g/L. O pH diminuiu até o valor de 5,15 no tempo de 48 horas, e se manteve com pequenas variações, até o fim da fotofermentação.

Figura 5.42 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, com co-cultura de *E. cloacae / R. palustris*, utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio RCV.



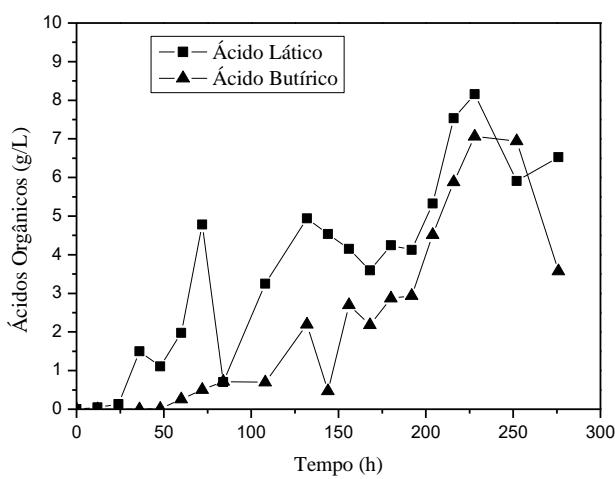
Observa-se a formação dos metabólitos nas Figuras 5.43 e 5.44. O ácido acético e o ácido propiônico foram produzidos em pequenas quantidades até o tempo de 192 horas, atingindo concentração no final do processo fermentativo de 1,93 e 2,76 g/L, respectivamente.

Figura 5.43 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, com co-cultura de *E. cloacae / R. palustris*, utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio RCV.



O ácido láctico atinge a concentração de 4,78 g/L no tempo de 60 horas, no tempo de 84 horas 85 % dele é consumido, volta a ser produzido, atingindo sua concentração máxima de 8,15 g/L no tempo de 228 horas. Ocorre a produção estável do ácido butírico, durante todo o processo fermentativo, chegando na concentração de 3,57 g/L.

Figura 5.44 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, com co-cultura de *E. cloacae / R. palustris*, utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio RCV.



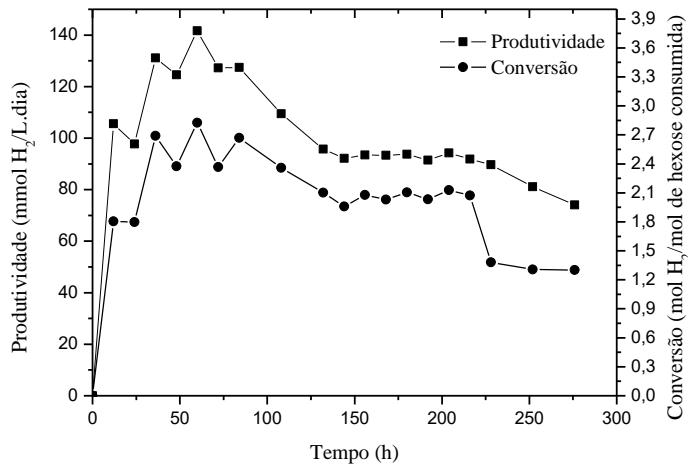
O etanol foi sintetizado até o tempo de 36 horas, sendo consumido até o tempo de 60 horas. Após, volta a ser produzido até o tempo de 156 horas, com concentração de 2,04 g/L. Atinge sua concentração máxima de 5,39 g/L no tempo de 228 horas.

5.3.4 Ensaio 12, com o sistema co-cultura *Enterobacter cloacae / Rhodobacter capsulatus*, utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono.

As Figuras 5.45 a 5.48, apresentam os resultados do Ensaio 12. A Figura 5.45 correlaciona produtividade e conversão, a Figura 5.46 pH e concentração celular e as Figuras 5.47 e 5.48 a formação dos metabólitos, durante a fotofermentação, com o sistema co-cultura *Enterobacter cloacae / Rhodobacter capsulatus*, utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono.

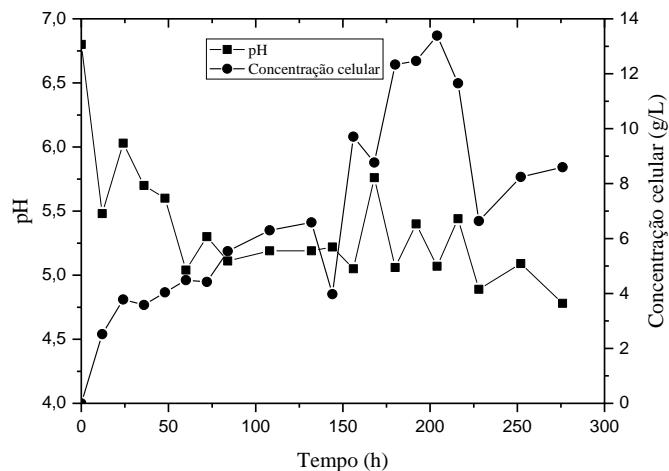
Na Figura 5.45, a produtividade máxima alcançada foi de 141,67 mmol H₂/L.dia, com uma conversão de 2,82 mol de H₂/mol de hexose consumido no tempo de 60 horas. Observa-se que produtividade vai decaindo ao longo do processo fermentativo.

Figura 5.45 – Produtividade e conversão, com co-cultura de *E. cloacae* / *R. capsulatus*, utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio RCV.



Na Figura 5.46, observa-se um rápido crescimento celular até o tempo de 24 horas atingindo uma concentração de 3,78 g/L, e após, o crescimento celular tem uma fase com pouca variação e depois aumenta e no final decresce atingindo uma concentração de 8,59 g/L. No tempo entre 144 e 228 horas, atingiu a concentração celular máxima de 13,38 g/L. Para o pH, no tempo de 60 horas, ele é de 5,04 e se manteve até o final do processo fermentativo.

Figura 5.46 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, com co-cultura de *E. cloacae* / *R. capsulatus*, utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio RCV.



Observa-se a formação dos metabólitos nas Figuras 5.47 e 5.48. O ácido acético e o ácido propiônico são produzidos de forma contínua, atingindo sua concentração máxima de 2,56 e 3,84 g/L, respectivamente. O ácido láctico foi produzido desde o início do processo fermentativo, chegando a uma concentração final de 7,93 g/L. Até o tempo de 144 horas, o ácido butírico foi produzido em pequenas quantidades, após esse tempo, sua produção é intensificada, alcançando sua concentração máxima de 9,40 g/L.

Figura 5.47 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, com co-cultura de *E. cloacae* / *R. capsulatus*, utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio RCV.

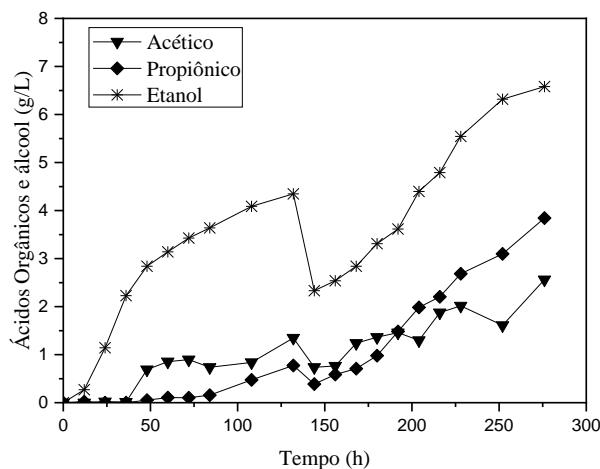
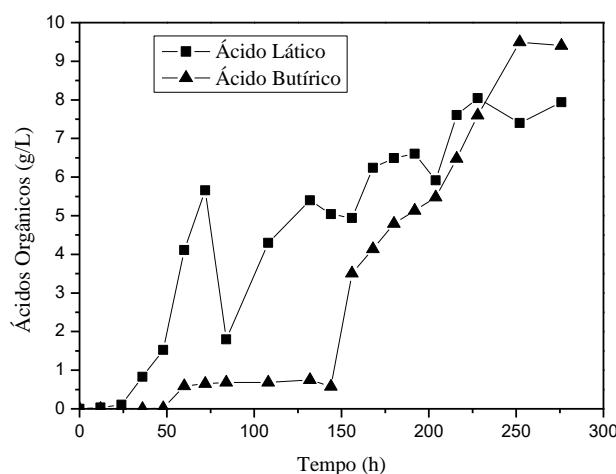


Figura 5.48 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, com co-cultura de *E. cloacae* / *R. capsulatus*, utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio RCV.



O etanol foi sintetizado significativamente até o tempo de 132 horas, com uma concentração de 4,345 g/L, e observado fase de consumo e retomada na sua produção até o final do processo fermentativo.

5.3.5 Consolidado dos Ensaios de 9 a 12

Na Tabela 5.3 observa-se um consolidado dos resultados obtidos nos Ensaios de 9 a 12, apresentados nos itens 5.3.1 a 5.3.4.

Tabela 5.3 - Consolidação dos Ensaios de 9 a 12.

	Ensaio 9 ^a	Ensaio 10 ^b	Ensaio 11 ^c	Ensaio 12 ^d
Produtividade máxima (mmol H ₂ /L.dia)	90,47	133,04	79,68	141,67
Tempo da produtividade máxima (h)	12	12	84	60
Conversão (mol de H ₂ /mol de hexose)	1,54	1,19	2,38	2,82
Ácido lático (g/L)	5,09	4,76	6,52	7,93
Ácido acético (g/L)	1,38	1,41	1,93	2,56
Ácido propiônico (g/L)	1,89	2,02	2,76	3,84
Ácido butírico (g/L)	2,56	2,61	3,58	9,40
Etanol (g/L)	3,87	3,78	5,18	6,58

^a – *E. cloacae* / *R. palustris*, glicose, meio RCV.

^b – *E. cloacae* / *R. capsulatus*, glicose, meio RCV.

^c – *E. cloacae* / *R. palustris*, permeado, meio RCV.

^d – *E. cloacae* / *R. capsulatus*, permeado, meio RCV.

Na terceira etapa do trabalho, foi estudado o sistema de co-cultura para a produção de hidrogênio por fotofermentação, utilizando o microrganismo *Enterobacter cloacae* e as bactérias púrpuras não sulfurosas, *Rhodopseudomonas palustris* e *Rhodobacter capsulatus*, no meio de cultivo RCV. Observa-se comportamento semelhante para ambos os ensaios em que foi modificado a fonte de carbono. Os melhores resultados de produtividade de hidrogênio, foram para os Ensaios 10 e 12, sendo que no Ensaio 10 foi utilizada glicose e no Ensaio 12 foi utilizada a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono. O menor tempo em que se obteve a produtividade máxima foi no Ensaio 10, onde foi utilizado microrganismo *Enterobacter cloacae* e as bactérias púrpuras não sulfurosas *Rhodobacter capsulatus*. Foi observado que as fermentações utilizando lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono, atingiram concentrações celulares maiores, quando comparadas às fermentações em que utilizou-se a glicose como fonte de carbono.

Verifica-se que o meio RCV contém 90,57 mg/L de carbono total e 47,28 mg/L de nitrogênio total, tais parâmetros pode influenciar diretamente na produção de hidrogênio.

Verifica-se o que os principais ácidos produzidos são o lático e o butírico. Estudos relatam que as proporções de ácido butírico presente no meio reacional é importante para prever a via metabólica adequada para maior produção de hidrogênio. Evidencia-se nos ensaios realizados neste trabalho, que a rota metabólica seguida para produção de hidrogênio é a do ácido butírico.

Rabelo et al. (2018) estudaram o efeito interativo da concentração e do pH do substrato, para diferentes tipos de bactérias (*Clostridium*, *Bacillus* e *Enterobacter*), através da aplicação do planejamento composto central, otimizando as respostas de hidrogênio e ácidos orgânicos. Os principais ácidos produzidos foram butírico, succínico, isovalérico, propiônico e acético. Os autores afirmam que as variações nas concentrações de ácidos orgânicos indicaram uma mudança de trajetória quando a concentração do substrato e o pH foram alterados, e a produção de ácido butírico foi afetada pela modificação dessas duas variáveis, com um nível de significância de 5% por ANOVA. O melhor valor de pH para a produção de ácido butírico foi 6 e com uma concentração de 9,2 g/L de bagaço de cana como substrato. Em contraste com o presente trabalho, durante todo o processo o pH foi ajustado para manter esse parâmetro acima de 5,5 ponto a ponto e a concentração de substrato utilizada foi de 10,0 g/L.

Morsy (2015) estudou a produção de hidrogênio por fotofermentação, utilizando a bactéria de fermentação escura (sem adição de luz) *Clostridium acetobutylicum* e as bactérias fotossintetizantes *R. capsulatus* e *R. sphaeroides*. Ele obteve melhores resultados para produção de hidrogênio em co-cultura do que ao usar cada uma das bactérias isoladas na fermentação escura (sem adição de luz) e fotofermentação, utilizando o gás inerte nitrogênio com a presença de iluminação. Esse resultado foi devido às eficiências variadas de cada uma das bactérias estudadas na conversão de vários ácidos orgânicos produzidos pela fermentação escura (sem adição de luz).

Ding et al. (2009) investigaram diferentes parâmetros (tampão fosfato, pH, proporção de bactérias e intensidade luminosa) para produção de hidrogênio, utilizando a co-cultura de *Clostridium Butyricum* e *Rhodopseudomonas faecalis* imobilizadas RLD-53. A proporção de bactérias de fermentação escura (sem adição de luz) e fotossintetizantes foi de 1:10. A produtividade máxima de hidrogênio foi de 33,85 mL H₂/L.h. Em comparação com o presente estudo, no qual foram utilizadas as bactérias *E. cloacae* e PNS, a proporção de bactérias utilizada foi de 1:1, fazendo a conversão da produtividade do Ensaio 12, em que foi o maior

valor encontrado, a produtividade máxima equivale a 148,86 mL H₂/L.h, levando-as a ter um desempenho maior de produção de hidrogênio.

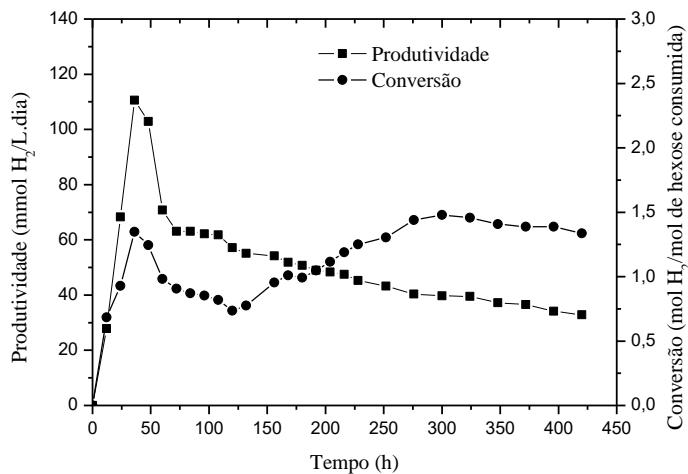
5.4 Fermentações avaliando o sistema de co-cultura em fotofermentação com o meio de cultura Caldo Nutriente.

Na quarta etapa do trabalho, foi estudado o sistema de co-cultura para a produção de hidrogênio por fotofermentação, utilizando o microrganismo *Enterobacter cloacae* e as bactérias púrpuras não sulfurosas: *Rhodopseudomonas palustris* e *Rhodobacter capsulatus*, no meio de cultivo Caldo Nutriente, sobre as influências da fonte de carbono, com o gás inerte Argônio e sob iluminação constante.

5.4.1 Ensaio 13, com o sistema co-cultura *Enterobacter cloacae* / *Rhodopseudomonas palustris*, utilizando glicose como fonte de carbono.

As Figuras 5.49 a 5.52, apresentam os resultados do Ensaio 13. A Figura 5.49 correlaciona produtividade e conversão, a Figura 5.50 pH e concentração celular e as Figuras 5.51 e 5.52 a formação dos metabólitos, durante a fotofermentação, com o sistema co-cultura *Enterobacter cloacae* / *Rhodopseudomonas palustris*, utilizando glicose como fonte de carbono.

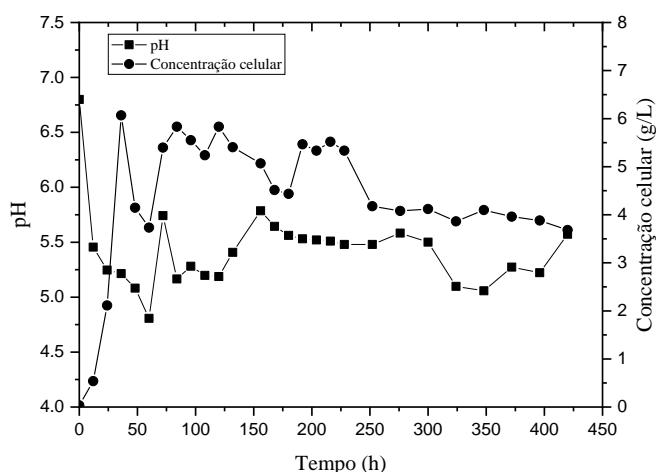
Figura 5.49 – Produtividade e conversão, com co-cultura de *E. cloacae* / *R. palustris*, utilizando glicose como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.



Nota-se na Figura 5.49 que, a produtividade máxima foi de 110,55 mmol H₂/L.dia e conversão de 1,34 mol de H₂/mol de hexose consumido no tempo de 36 horas.

Observa-se na Figura 5.50 que o pH manteve-se na faixa de 5,5 – 6,0 por todo o processo fermentativo. Para a concentração celular, nas primeiras 36 horas de fermentação, tem um crescimento rápido, atingindo uma concentração de 6,07 g/L. A concentração celular se manteve com pequenas variações até o tempo de 216 horas. Após esse tempo, ocorre um decaimento da concentração de células.

Figura 5.50 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, com co-cultura de *E. cloacae* / *R. palustris*, utilizando glicose como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.



Nas Figuras 5.51 e 5.52, observa-se a formação dos metabólitos. Há formação do ácido acético até o tempo de 60 horas, atingindo uma concentração de 1,07 g/L. Após esse tempo, ele é consumido até o tempo de 180 horas, com concentração de 0,39 g/L, e volta a ser produzido até o final do processo fermentativo, chegando a uma concentração de 1,93 g/L.

O ácido propiônico foi detectado em pequenas quantidades até o tempo de 72 horas. A partir desse tempo, ocorre a formação do ácido propiônico até o final do processo fermentativo, atingindo uma concentração de 5,73 g/L. O ácido lático foi produzido em grandes quantidades até o tempo de 120 horas, alcançando uma concentração de 17,27 g/L. Após esse tempo, cerca de 65 % do ácido lático é consumido até o tempo de 276 horas e volta a ser produzido até o fim da fermentação, atingindo uma concentração de 15,14 g/L. O ácido butírico foi produzido de forma crescente, porém em pequenas quantidades até o tempo de 168 horas. Passado esse tempo, dobra de valor e continua a ser produzido, atingindo uma concentração final de

19,80 g/L. Observa-se que síntese do etanol iniciou apenas a partir do tempo de 108 horas e tem produção contínua até o final do processo fermentativo, com concentração de 5,12 g/L.

Figura 5.51 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, com co-cultura de *E. cloacae / R. palustris*, utilizando glicose como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.

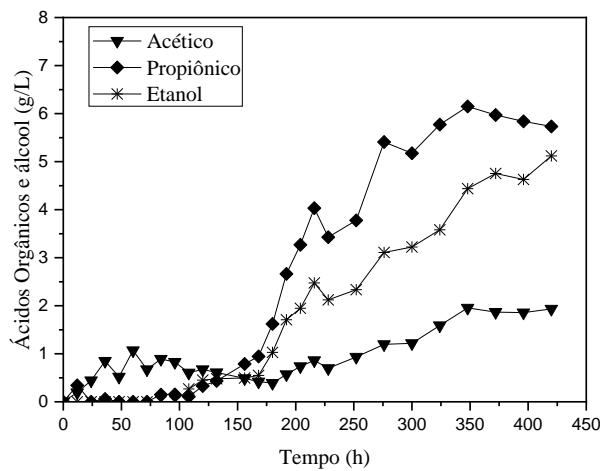
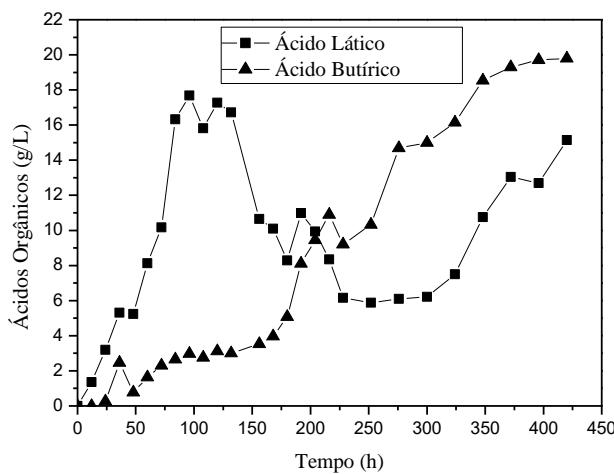


Figura 5.52 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, com co-cultura de *E. cloacae / R. palustris*, utilizando glicose como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.

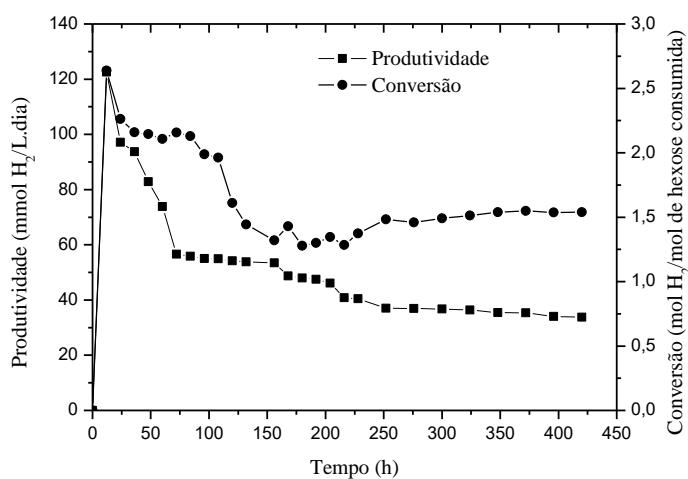


5.4.2 Ensaio 14, com o sistema co-cultura *Enterobacter cloacae / Rhodobacter capsulatus*, utilizando glicose como fonte de carbono.

As Figuras 5.53 a 5.56, apresentam os resultados do Ensaio 14. A Figura 5.53 correlaciona produtividade e conversão, a Figura 5.54 pH e concentração celular e as Figuras 5.55 e 5.56 a formação dos metabólitos, durante a fotofermentação, com o sistema co-cultura *Enterobacter cloacae / Rhodobacter capsulatus*, utilizando glicose como fonte de carbono.

Nota-se na Figura 5.53 que, a produtividade máxima obtida foi de 122,58 mmol H₂/L.dia com uma conversão de 2,64 mol de H₂/mol de hexose consumido no tempo de 12 horas. No tempo de 60 horas, os valores da produtividade caíram em 50 %, e foi diminuindo de forma lenta e constante. Após o tempo de 250 horas, a produtividade e conversão se manteve aproximadamente constante.

Figura 5.53 – Produtividade e conversão, com co-cultura de *E. cloacae / R. capsulatus*, utilizando glicose como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.



Na Figura 5.54, observa-se que o crescimento celular até o tempo de 24 horas atinge uma concentração de 3,33 g/L, e se manteve até o tempo de 204 horas. Após esse tempo, verifica-se que ocorre um aumento da concentração de células. O pH sofre algumas variações ao longo do processo fermentativo. Observa-se que até o tempo de 60 horas, o seu valor é de 4,4 e é feito a correção com NaOH, para ficar na faixa entre 5,0 – 5,5.

Observa-se a formação dos metabólitos nas Figuras 5.55 e 5.56. O ácido butírico foi produzido em quantidades pequenas até o tempo de 180 horas, com concentração de 3,43 g/L. Após esse tempo, a sua quantidade é expressiva, alcançando 23,32 g/L.

Figura 5.54 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, com co-cultura de *E. cloacae* / *R. capsulatus*, utilizando glicose como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.

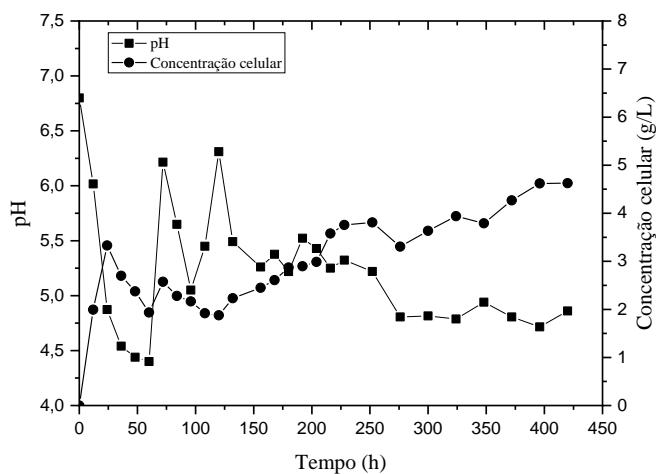
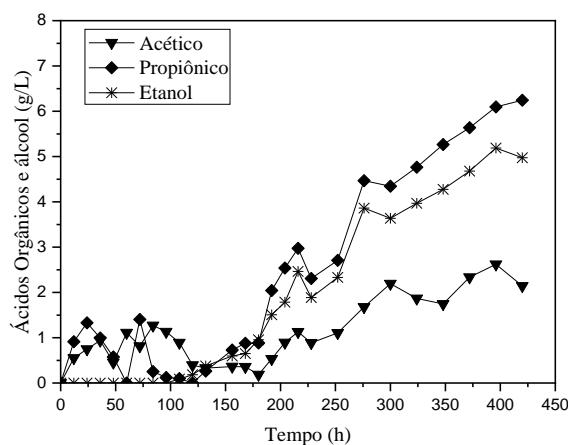
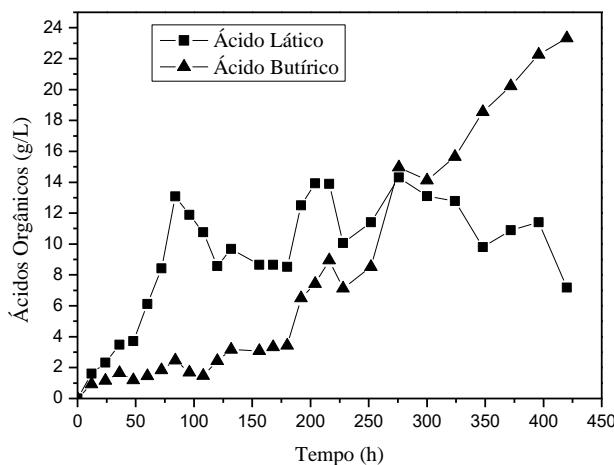


Figura 5.55 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, com co-cultura de *E. cloacae* / *R. capsulatus*, utilizando glicose como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.



Para o ácido acético verifica-se a sua produção e consumo até o tempo de 192 horas, atingindo concentrações mínimas e máximas de 0,18 e 1,13 g/L, respectivamente. Após esse tempo, a sua produção atinge concentração final de 2,14 g/L no tempo de 420 horas. Até o tempo de 180 horas, o ácido propiônico tem o mesmo comportamento que o ácido acético, é produzido e posteriormente consumido. A partir do tempo de 192 horas até o final do processo fermentativo a sua produção é mais expressiva, alcançando uma concentração final de 6,25 g/L.

Figura 5.56 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, com co-cultura de *E. cloacae / R. capsulatus*, utilizando glicose como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.



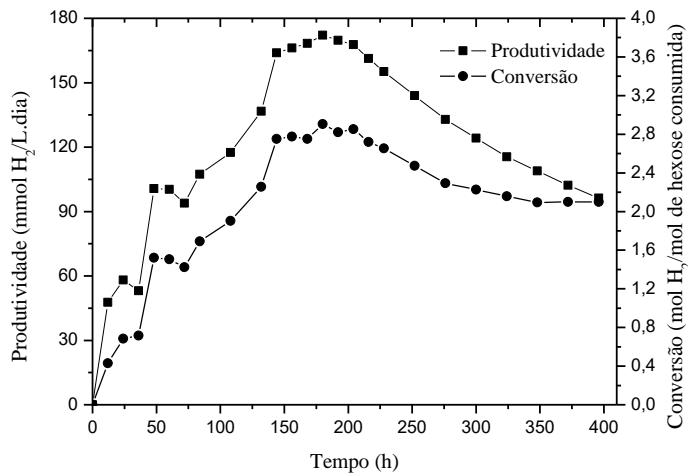
Observa-se que, para o ácido láctico atinge concentração de 13,09 g/L no tempo de 84 horas e é consumido até o tempo de 180 horas. A sua produção é retomada, seguido de consumo até o final do processo fermentativo com concentração de 7,17 g/L. O etanol foi sintetizado a partir do tempo de 108 horas e é contínuo até o final do processo fermentativo, obtendo uma concentração final de 4,97 g/L.

5.4.3 Ensaio 15, com o sistema co-cultura *Enterobacter cloacae / Rhodopseudomonas palustris*, utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono.

As Figuras 5.57 a 5.60, apresentam os resultados do Ensaio 15. A Figura 5.57 correlaciona produtividade e conversão, a Figura 5.58 pH e concentração celular e as Figuras 5.59 e 5.60 a formação dos metabólitos, durante a fotofermentação, com o sistema co-cultura *Enterobacter cloacae / Rhodopseudomonas palustris*, utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono.

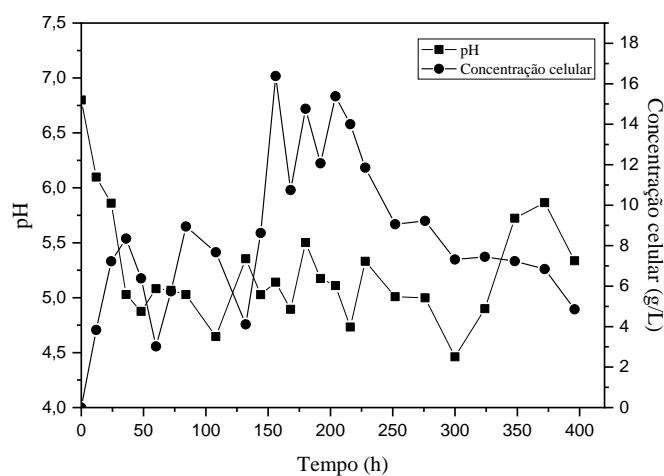
Nota-se na Figura 5.57 que, no tempo de 48 horas, a produtividade de hidrogênio foi de 100,64 mmol H₂/L.dia. Após esse tempo, observa-se que a produtividade máxima alcançada foi de 172,08 mmol H₂/L.dia, com uma conversão de 2,90 mol de H₂/mol de hexose consumido no tempo de 180 horas.

Figura 5.57 – Produtividade e conversão, com co-cultura de *E. cloacae* / *R. palustris*, utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.



Na Figura 5.58, observa-se um rápido crescimento celular até o tempo de 36 horas atingindo uma concentração de 8,35 g/L, e no tempo de 180 horas, atinge a concentração celular máxima de 14,76 g/L, coincidindo com o ponto da produtividade máxima. O pH se manteve na faixa ideal produção de hidrogênio que é entre 5,0 – 5,5.

Figura 5.58 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, com co-cultura de *E. cloacae* / *R. palustris*, utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.



Observa-se a formação dos metabólitos nas Figuras 5.59 e 5.60. O ácido acético tem um ponto de maior produção no tempo de 36 horas, com concentração de 5,25 g/L. Após, até o tempo de 192 horas, ocorre seu consumo e produção. Ao final do processo fermentativo, a

concentração do ácido acético é de 1,64g/L. O ácido propiônico atinge a concentração de 1,93 g/L no tempo de 36 horas e é consumido até o tempo de 84 horas, com concentração de 0,55 g/L. Após, a concentração eleva-se e atinge 5,63 no final do processo.

Figura 5.59 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, com co-cultura de *E. cloacae / R. palustris*, utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.

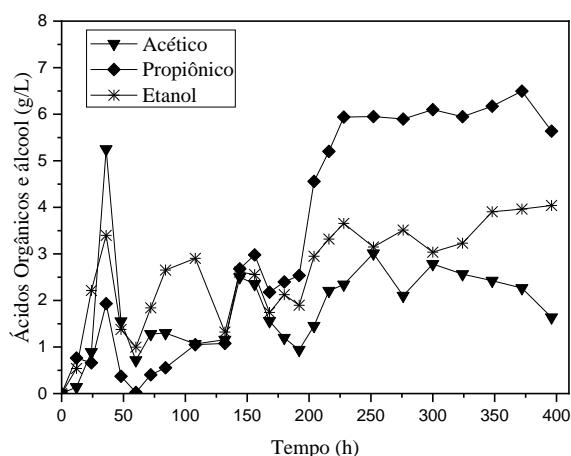
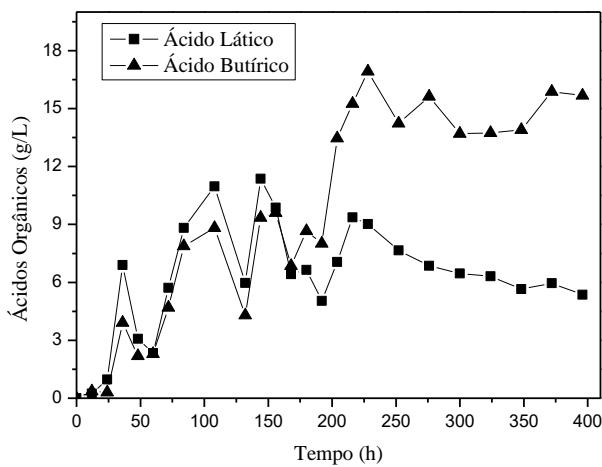


Figura 5.60 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, com co-cultura de *E. cloacae / R. palustris*, utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.



O ácido lático atinge sua concentração máxima de 11,36 g/L no tempo de 144 horas e é consumido em pequenas quantidades até o final do processo fermentativo. Ocorre a produção contínua e significativa do ácido butírico, durante todo o processo fermentativo, chegando na

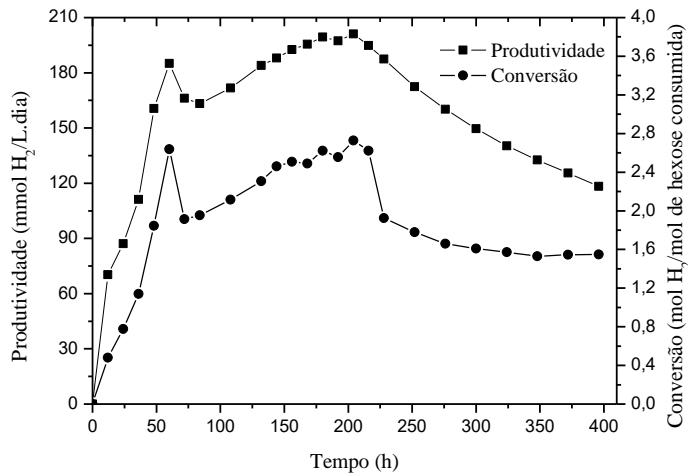
concentração de 15,68 g/L. O etanol foi sintetizado a partir do tempo de 12 horas, apresentando uma produção contínua, com uma concentração final de 4,04 g/L.

5.4.4 Ensaio 16, com o sistema co-cultura *Enterobacter cloacae / Rhodobacter capsulatus*, utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono.

As Figuras 5.61 a 5.64 apresentam os resultados do Ensaio 16. A Figura 5.61 correlaciona produtividade e conversão, a Figura 5.62 pH e concentração celular e as Figuras 5.63 e 5.64 a formação dos metabólitos, durante a fotofermentação, com o sistema co-cultura *Enterobacter cloacae / Rhodobacter capsulatus*, utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono.

Observa-se, pelos resultados apresentados na Figura 5.61, comportamento crescente até sua máxima produtividade de hidrogênio de 201,15 mmol H₂/L.dia com uma conversão de 2,73 mol de H₂/mol de hexose consumido no tempo de 204 horas.

Figura 5.61 – Produtividade e conversão, com co-cultura de *E. cloacae / R. capsulatus*, utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.



Na Figura 5.62, observa-se o que pH foi mantido entre 5,0 e 5,5. Nota-se que a concentração celular atinge 7,09 g/L no tempo de 36 horas e se manteve até o tempo de 132 horas. Após, ela atinge sua concentração celular máxima de 16,64 g/L no tempo de 192 horas e decai até o final do processo fermentativo.

Nas Figuras 5.63 e 5.64, observa-se a formação dos metabólitos. Observa-se que, o ácido acético atinge 3,18 g/L no tempo de 36 horas e é parcialmente consumido até o tempo de 108 horas. A sua produção e consumo é estável durante o processo fermentativo.

Figura 5.62 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, com co-cultura de *E. cloacae* / *R. capsulatus*, utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.

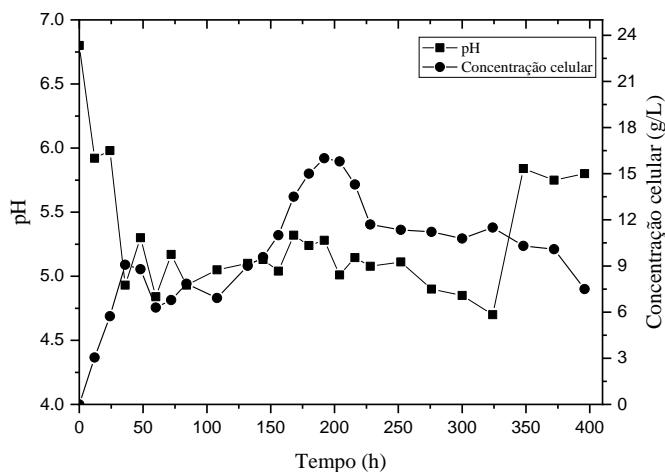
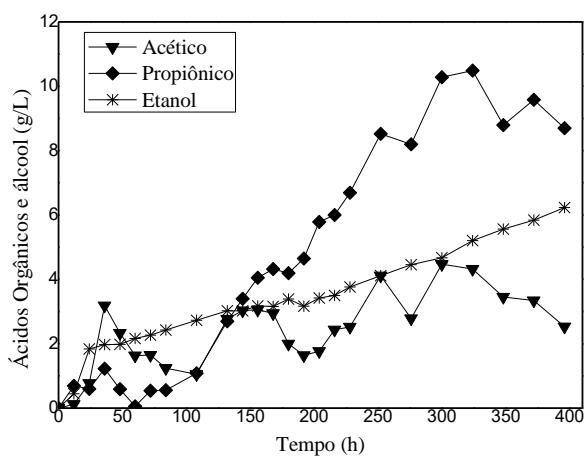


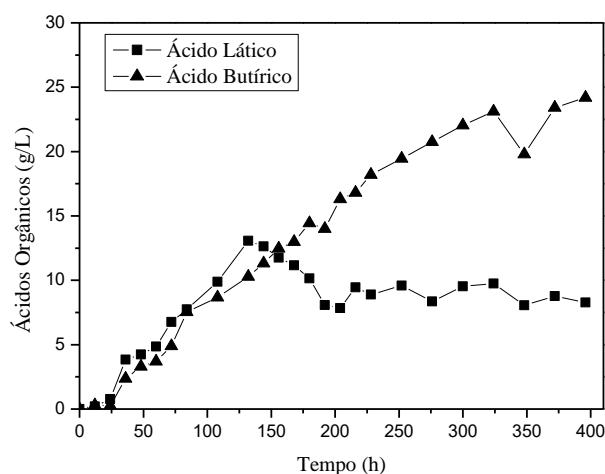
Figura 5.63 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, com co-cultura de *E. cloacae* / *R. capsulatus*, utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.



Verifica-se para o ácido propiônico, que a sua produção se dá em maiores quantidades a partir do tempo de 108 horas até o final do processo, alcançando uma concentração de 8,70 g/L. O ácido lático foi produzido e atinge sua concentração máxima de 13,08 g/L no tempo

de 132 horas, após, ele é consumido em pequenas quantidades. Para o ácido butírico, ele foi produzido durante todo processo fermentativo, atingindo uma concentração final de 24,19 g/L.

Figura 5.64 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, com co-cultura de *E. cloacae* / *R. capsulatus*, utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono em meio Caldo Nutriente.



O etanol foi sintetizado continuamente por todo o processo fermentativo, atingindo sua concentração máxima de 6,23 g/L no final.

5.4.5 Consolidado dos Ensaios de 13 a 16

Na Tabela 5.4 observa-se um consolidado dos resultados obtidos nos Ensaios de 13 a 16, apresentados nos itens 5.4.1 a 5.4.4.

Na quarta etapa do trabalho, foi estudado o sistema de co-cultura para a produção de hidrogênio por fotofermentação, utilizando o microrganismo *Enterobacter cloacae* e as bactérias púrpuras não sulfurosas, *Rhodopseudomonas palustris* e *Rhodobacter capsulatus*, no meio de cultivo Caldo Nutriente. Observa-se que os melhores resultados de produtividade de hidrogênio, foram para os Ensaios 15 e 16, ambos utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono, indicando que as bactérias convertem melhor o carbono presente da lactose em hidrogênio.

Observa-se que para os Ensaios 13 e 14, em que a fonte de carbono utilizada foi a glicose, as produtividades máximas ocorreram no tempo de 36 e 12 horas, respectivamente. Enquanto que, para os Ensaios 15 e 16, onde foi utilizada a lactose proveniente do Permeado

de Soro de queijo em pó como fonte de carbono, a produtividade máxima demorou a ser alcançada, sendo obtida no tempo de 180 e 204 horas, respectivamente.

Tabela 5.4 - Consolidação dos Ensaios de 13 a 16.

	Ensaio 13 ^a	Ensaio 14 ^b	Ensaio 15 ^c	Ensaio 16 ^d
Produtividade máxima (mmol H ₂ /L.dia)	110,55	122,59	172,08	201,15
Tempo da produtividade máxima (h)	36	12	180	204
Conversão (mol de H ₂ /mol de hexose)	1,35	2,64	2,90	2,73
Ácido lático (g/L)	15,14	7,17	5,36	8,28
Ácido acético (g/L)	1,93	2,14	1,64	2,53
Ácido propiônico (g/L)	5,73	6,24	5,63	8,70
Ácido butírico (g/L)	19,80	23,32	15,68	24,19
Etanol (g/L)	5,12	4,97	4,04	6,23

^a – *E. cloacae / R. palustris*, glicose, meio CN.

^b – *E. cloacae / R. capsulatus*, glicose, meio CN.

^c – *E. cloacae / R. palustris*, permeado, meio CN.

^d – *E. cloacae / R. capsulatus*, permeado, meio CN.

Em comparação aos Ensaios de 9 a 12, onde foram utilizados o meio RCV como meio reacional, e nos Ensaios de 13 a 16, utilizando como meio reacional o Caldo Nutriente, trata-se de dois meios com composições diferentes, e essa composição pode ter influenciado na produção de hidrogênio. Verifica-se que o meio Caldo Nutriente contém 3055 mg/L de carbono total e 1393 mg/L de nitrogênio total. Nota-se que a quantidade de carbono e nitrogênio total presente no meio Caldo Nutriente é consideravelmente superior ao meio RCV, impactando diretamente na produção de hidrogênio, que são provenientes dos reagentes extrato de carne e peptona, presentes na composição do meio. Vale ressaltar, que o uso da co-cultura com a *R. capsulatus*, promove melhores resultados de produtividade de hidrogênio em ambas etapas 3 e 4, conforme visto nos Ensaios 10, 11, 14 e 16, respectivamente.

Estudo como o de Khanna et al. (2011), mostraram a viabilidade promissora do uso do Permeado de Soro de queijo em pó para produção de hidrogênio com suplementação de extrato de levedura. O uso do soro de queijo sem suplementação, resultou em baixa produção de hidrogênio. Fazendo a suplementação com extrato de levedura (0.3% w/v), alcançaram valores de 1,6 vezes maiores em comparação sem a suplementação.

Verifica-se que a utilização da lactose, proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono, manteve alta a produtividade de hidrogênio por mais tempo, comparando com os resultados obtidos com a glicose. Foi observado que na utilização da

cultura pura de *E. cloacae*, a resposta de produtividade apresentou resultados maiores, utilizando a glicose como substrato, enquanto que, na utilização da co-cultura, os melhores resultados foram utilizando a lactose proveniente do permeado de soro de queijo em pó. Pode ser observado nos perfis de produtividade utilizando a glicose, ocorre um pico de hidrogênio no início da fermentação e logo decai, já com o Permeado de Soro de queijo em pó, o pico de hidrogênio ocorre após um certo tempo do início do processo de fermentação e permanece constante por um período de quase 100 horas, até que ocorra uma deterioração.

Em trabalhos encontrados na literatura, destacam o uso do Permeado de Soro de queijo em pó a fim de manter a cultura ativa por mais tempo, prolongando o tempo do processo fermentativo e alcançando produtividades elevadas por mais tempo. Machado et al. (2018) e Moreira et al. (2017), também avaliaram o processo em lotes para produção de H₂ empregando o Permeado de Soro de queijo em pó como substrato, com bactérias PNS e cultura mista, respectivamente. Os autores conseguiram estender o processo fermentativo por mais de 450 horas.

Burrows et al. (2009) relataram que a utilização da fonte de nitrogênio no meio de crescimento leva a um aumento de 1,7 vezes na produção de hidrogênio. Em seus estudos, utilizaram o microrganismo *Synechocystis* sp. PCC 6803, sob iluminação, com gás inerte nitrogênio.

5.5 Fermentações avaliando o sistema de co-cultura em fotofermentação, com os substratos glicose e a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó, com adição alternada.

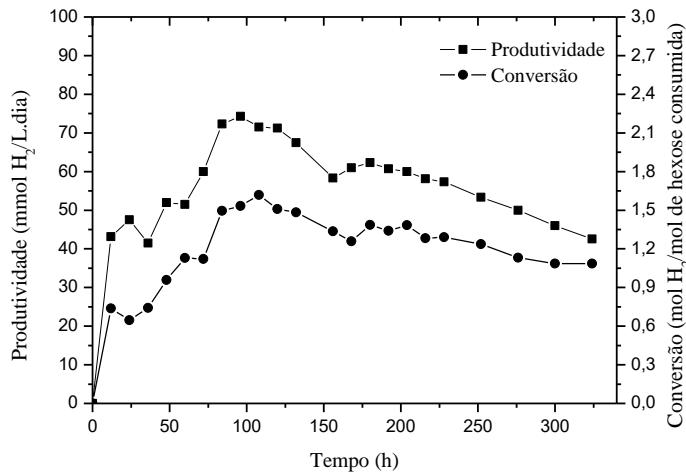
Na quinta etapa do trabalho, foi estudado o sistema de co-cultura para a produção de hidrogênio por fotofermentação, utilizando o microrganismo *Enterobacter cloacae* e as bactérias púrpuras não sulfurosas: *Rhodopseudomonas palustris* e *Rhodobacter capsulatus*, no meio de cultivo RCV ou Caldo Nutriente, sobre as influências da alimentação alternada da fonte de carbono, glicose e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó, com o gás inerte Argônio e sob iluminação constante.

5.5.1 Ensaio 17, com o sistema co-cultura *Enterobacter cloacae / Rhodopseudomonas palustris*, utilizando o meio RCV, alternando a fonte de carbono.

As Figuras 5.65 a 5.68, apresentam os resultados do Ensaio 17. A Figura 5.65 correlaciona produtividade e conversão, a Figura 5.66 pH e concentração celular e as Figuras 5.67 e 5.68 a formação dos metabólitos, durante a fotofermentação, com o sistema co-cultura *Enterobacter cloacae / Rhodopseudomonas palustris*, utilizando o meio de cultivo RCV, com alimentação alternada de glicose e a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono.

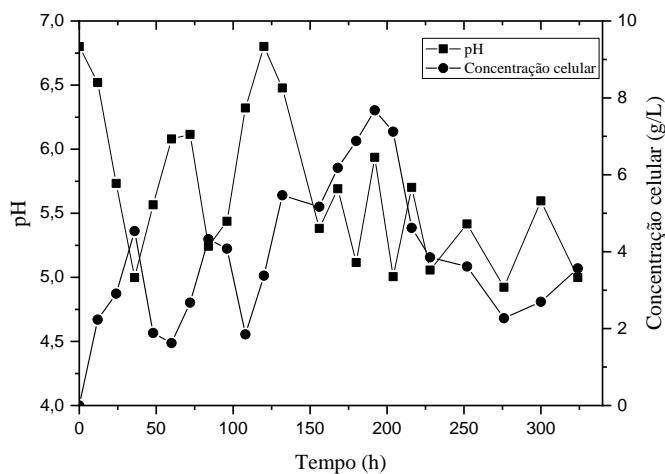
Nota-se na Figura 5.65, que a produtividade de hidrogênio foi crescente até o tempo de 96 horas, obtendo a máxima produtividade de 74,30 mmol H₂/L.dia com uma conversão de 1,53 mol de H₂/mol de hexose consumido.

Figura 5.65 – Produtividade e conversão, com co-cultura de *E. cloacae / R. palustris*, utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio RCV.



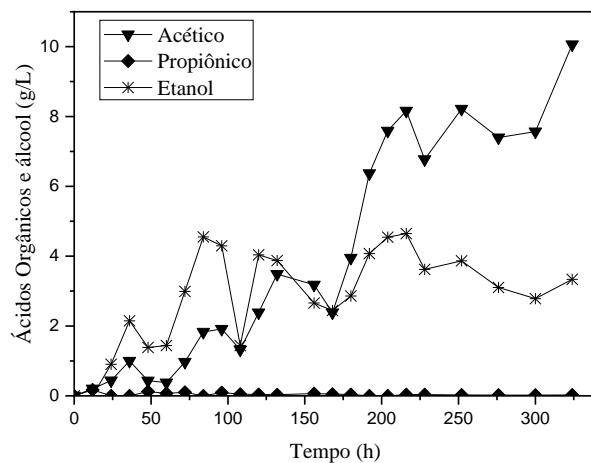
A Figura 5.66 apresenta o crescimento celular e pH. Há um crescimento celular até o tempo de 36 horas, atingindo 4,53 g/L. A concentração celular sofre variações até o tempo de 192 horas, onde atinge a sua concentração celular máxima de 7,68 g/L. Após, observa-se um decaimento até o final do processo fermentativo. O pH demorou a cair, indicando a produção de ácidos orgânicos no tempo de 36 horas. Após, o pH era corrigido para ficar próximo de 5,5.

Figura 5.66 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, com co-cultura de *E. cloacae* / *R. palustris*, utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio RCV.



Nas Figuras 5.67 e 5.68, observa-se a formação dos metabólitos. Há formação do ácido acético em todo o processo fermentativo, atingindo sua concentração máxima de 10,06 g/L no final do processo.

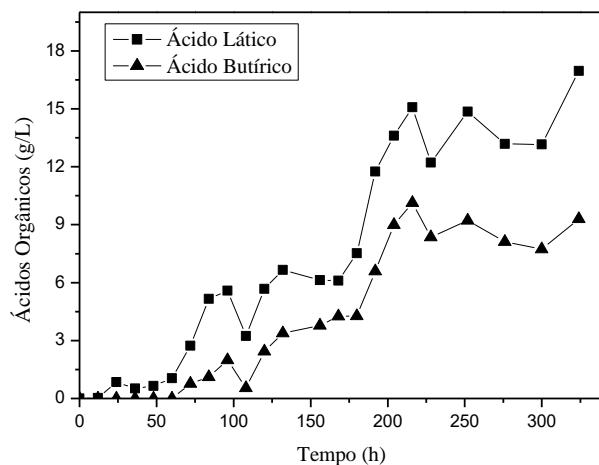
Figura 5.67 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, com co-cultura de *E. cloacae* / *R. palustris*, utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio RCV.



O ácido propiônico teve pouca participação nesse ensaio, a sua concentração se manteve bem baixa durante todo o processo fermentativo, chegando ao final do processo com concentração de 0,03 g/L. Conforme a Figura 5.68, até o tempo de 60 horas, a quantidade de

ácido láctico produzido foi de 1,04 g/L, após sua produção foi significativa, atingindo uma concentração máxima de 13,60 g/L no tempo de 204 horas. A produção do ácido butírico foi iniciada apenas no tempo de 72 horas. Após esse tempo, a sua produção atingiu uma concentração de 9,29 g/L no final do processo fermentativo.

Figura 5.68 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, com co-cultura de *E. cloacae / R. palustris*, utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio RCV.



5.5.2 Ensaio 18, com o sistema co-cultura *Enterobacter cloacae / Rhodobacter capsulatus*, utilizando o meio RCV, alternando a fonte de carbono.

As Figuras 5.69 a 5.72, apresentam os resultados do Ensaio 18. A Figura 5.69 correlaciona produtividade e conversão, a Figura 5.70 pH e concentração celular e as Figuras 5.71 e 5.72 a formação dos metabólitos, durante a fotofermentação, com o sistema co-cultura *Enterobacter cloacae / Rhodobacter capsulatus*, utilizando o meio de cultivo RCV, com alimentação alternada de glicose e a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono.

Nota-se na Figura 5.69, a produtividade máxima foi de 112,36 mmol H₂/L.dia com uma conversão de 2,10 mol de H₂/mol de hexose consumido no tempo de 72 horas. Após esse tempo, observa-se um decaimento na produtividade e conversão.

Na Figura 5.70, observa-se o crescimento celular até o tempo de 108 horas atingindo uma concentração de 4,05 g/L, após esse tempo, a concentração celular dobrou de valor,

alcançando 11,02 g/L. Verifica-se que até o final do processo fermentativo, ocorre diminuição da concentração celular. O pH se manteve entre 5,0 e 6,0, sendo este um pH ótimo para produção de hidrogênio.

Figura 5.69 – Produtividade e conversão, com co-cultura de *E. cloacae / R. capsulatus*, utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio RCV.

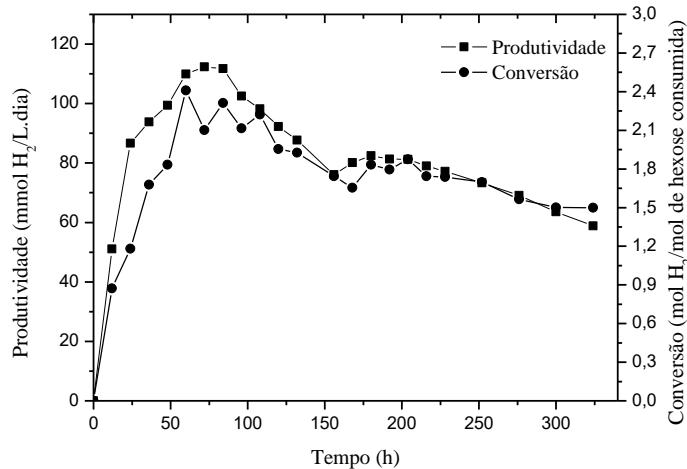
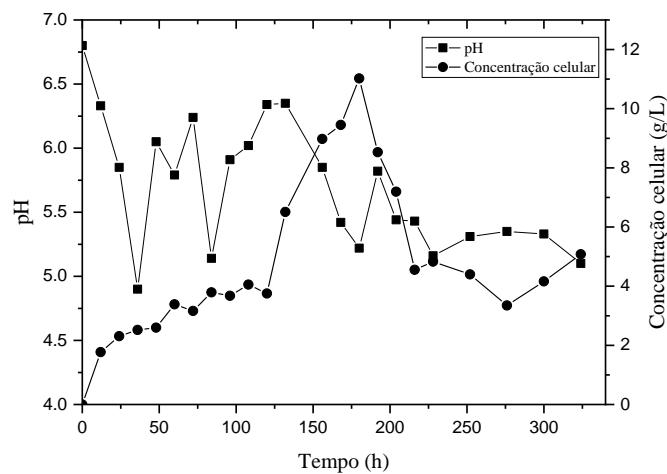


Figura 5.70 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, com co-cultura de *E. cloacae / R. capsulatus*, utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio RCV.



Observa-se a formação dos metabólitos nas Figuras 5.71 e 5.72. O ácido propiônico manteve o mesmo comportamento que o Ensaio 17, chegando no final do processo fermentativo

com concentração de 0,4 g/L. O ácido acético é produzido continuamente durante todo o processo fermentativo, alcançando uma concentração final e 14,33 g/L.

Figura 5.71 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, com co-cultura de *E. cloacae / R. capsulatus*, utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio RCV.

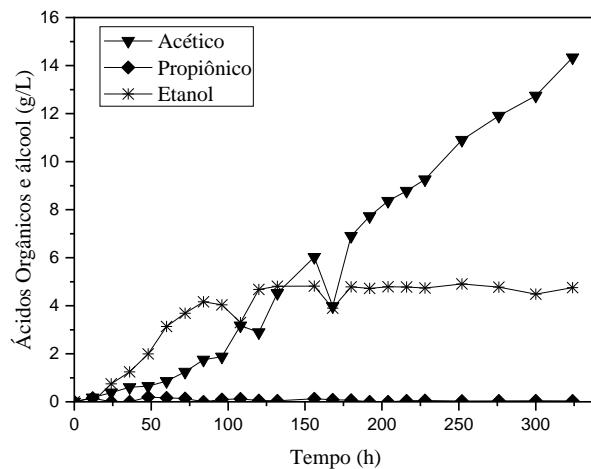
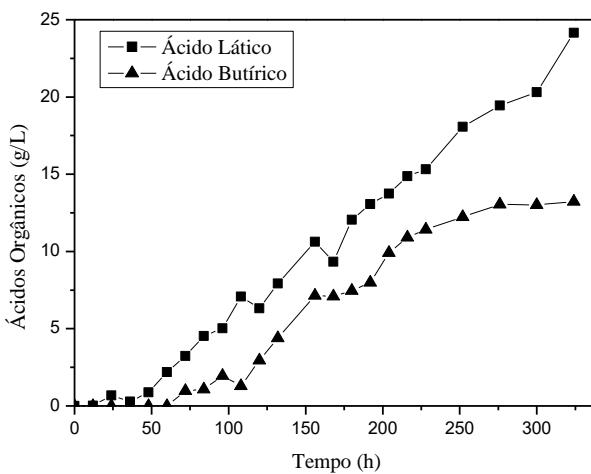


Figura 5.72 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, com co-cultura de *E. cloacae / R. capsulatus*, utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio RCV.



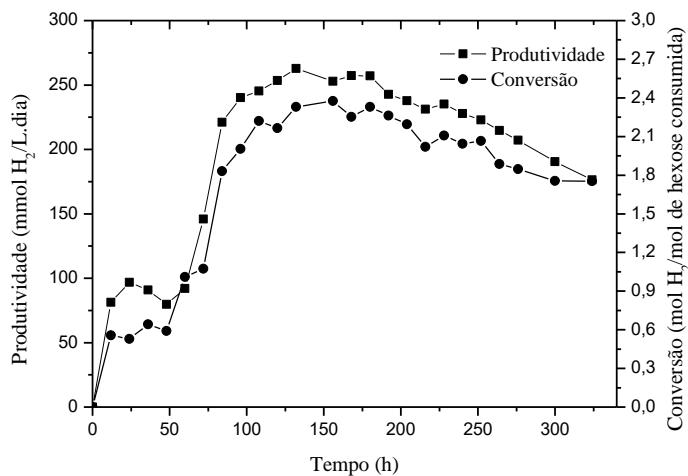
O ácido láctico e o ácido butírico teve produção continua durante todo o processo, obtendo no final a concentração de 24,15 e 13,23 g/L, respectivamente.

5.5.3 Ensaio 19, com o sistema co-cultura *Enterobacter cloacae / Rhodopseudomonas palustris*, utilizando o meio Caldo Nutriente, alternando a fonte de carbono.

As Figuras 5.73 a 5.76, apresentam os resultados do Ensaio 19. A Figura 5.73 correlaciona produtividade e conversão, a Figura 5.74 pH e concentração celular e as Figuras 5.75 e 5.76 a formação dos metabólitos, durante a fotofermentação, com o sistema co-cultura *Enterobacter cloacae / Rhodopseudomonas palustris*, utilizando o meio de cultivo Caldo Nutriente, com alimentação alternada de glicose e a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono.

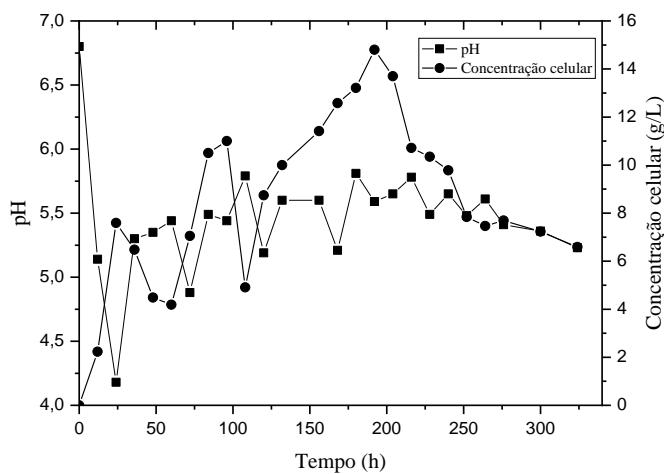
Observa-se pelos resultados apresentados na Figura 5.73 que a máxima produtividade obtida foi de 262,77 mmol H₂/L.dia com uma conversão de 2,32 mol de H₂/mol de hexose consumido no tempo de 132 horas. O tempo da produtividade máxima, foi longo, porém foram alcançados altos valores de produtividade durante todo o processo fermentativo.

Figura 5.73 – Produtividade e conversão, com co-cultura de *E. cloacae / R. palustris*, utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio Caldo Nutriente.



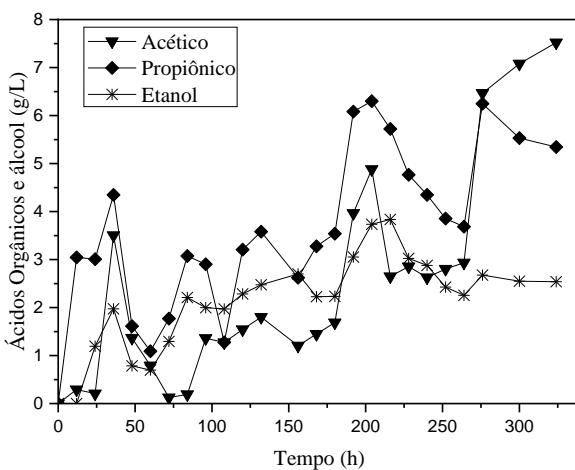
Na Figura 5.74, observa-se o que pH foi mantido entre 5,4 e 5,8 durante todo o processo fermentativo. O comportamento do pH está diretamente ligado na produção dos ácidos orgânicos no meio fermentativo. Nota-se que a concentração celular atinge 7,59 g/L no tempo de 24 horas, e vai sofrendo pequenas oscilações até o tempo 72 horas. Após, ela atinge sua concentração celular máxima de 14,80 g/L no tempo de 192 horas.

Figura 5.74 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, com co-cultura de *E. cloacae / R. palustris*, utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio Caldo Nutriente.



Nas Figuras 5.75 e 5.76, observa-se a formação dos metabólitos. Observa-se que o ácido acético atinge uma concentração de 3,50 g/L no tempo de 36 horas, é consumido e se manteve em 1,44 g/L até o tempo de 168 horas. O ácido acético tem a sua produção retomada, alcançando sua concentração máxima de 7,52 g/L no tempo de 324 horas.

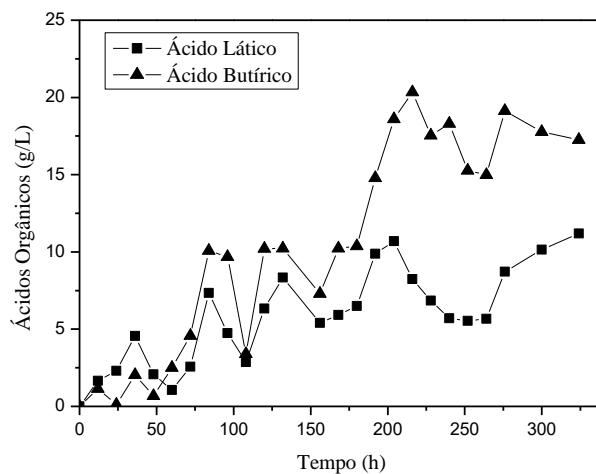
Figura 5.75 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, com co-cultura de *E. cloacae / R. palustris*, utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio Caldo Nutriente.



Para o ácido propiônico, ele foi produzido em quantidades significativas a partir do início do processo fermentativo. Verifica-se que ele é consumido e produzido. A sua

concentração máxima alcançada foi de 6,330 g/L no tempo de 204 horas. O ácido láctico foi produzido em pequenas quantidades até o tempo de 60 horas, em seguida ele começa a ser produzido em quantidades significativas, atingindo concentração final de 11,18 g/L.

Figura 5.76 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, com co-cultura de *E. cloacae / R. palustris*, utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio Caldo Nutriente.



O ácido butírico começa a ser produzido significativamente a partir do tempo de 60 horas. A concentração máxima alcançada foi de 20,34 g/L no tempo de 216 horas. O etanol foi sintetizado a partir do tempo de 24 horas, e sua concentração se manteve com pequenas oscilações até o final do processo fermentativo, com concentração de 2,54 g/L.

5.5.4 Ensaio 20, com o sistema co-cultura *Enterobacter cloacae / Rhodobacter capsulatus*, utilizando o meio Caldo Nutriente, alternando a fonte de carbono.

As Figuras 5.77 a 5.80, apresentam os resultados do Ensaio 20. A Figura 5.77 correlaciona produtividade e conversão, a Figura 5.78 pH e concentração celular e as Figuras 5.79 e 5.80 a formação dos metabólitos, durante a fotofermentação, com o sistema co-cultura *Enterobacter cloacae / Rhodobacter capsulatus*, utilizando o meio de cultivo Caldo Nutriente, com alimentação alternada de glicose e a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono.

Nota-se na Figura 5.77, que o valores de produtividade de hidrogênio foram altos. No tempo de 84 horas a produtividade foi de 310,83 mmol H₂/L.dia, e passados mais 96 horas,

obteve-se a produtividade máxima de 319,35 mmol H₂/L.dia com uma conversão de 2,26 mol de H₂/mol de hexose consumido no tempo de 180 horas. Após esse tempo, a produtividade diminui.

Figura 5.77 – Produtividade e conversão, com co-cultura de *E. cloacae / R. capsulatus*, utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio Caldo Nutriente.

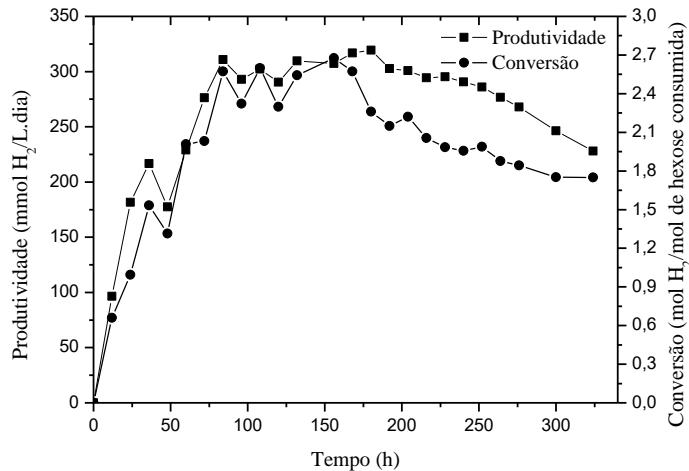
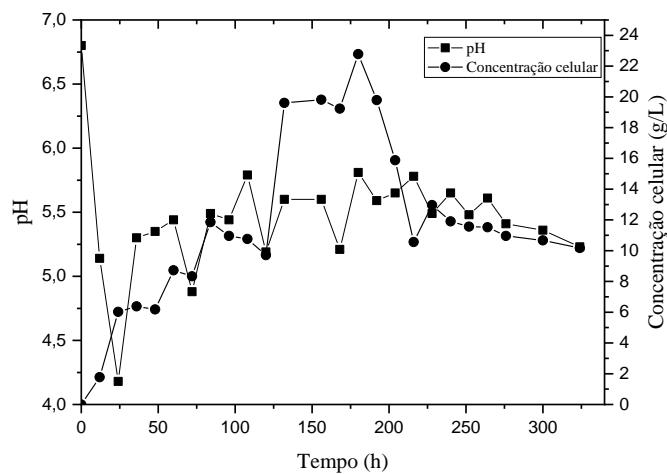


Figura 5.78 – Comportamento do pH e da concentração celular, em função do tempo de fermentação, com co-cultura de *E. cloacae / R. capsulatus*, utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio Caldo Nutriente.



Na Figura 5.78, observa-se um crescimento celular constante até o tempo de 180 horas atingindo sua concentração máxima de 22,79 g/L, coincidindo com o ponto onde foi observado

a produtividade máxima. Após esse tempo, observa-se um decaimento da concentração celular. O pH se manteve bem controlado nesse ensaio.

Observa-se a formação dos metabólitos nas Figuras 5.79 e 5.80. Para o ácido propiônico, inicialmente ocorre a produção até o tempo de 12 horas, e se manteve até o tempo de 108 horas, e volta a ser produzido, chegando a uma concentração de 8,25 g/L no final do processo.

Figura 5.79 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido acético, ácido propiônico e etanol, com co-cultura de *E. cloacae / R. capsulatus*, utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio Caldo Nutriente.

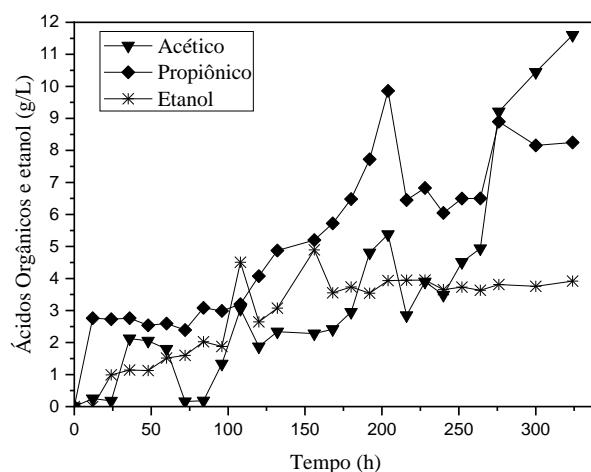
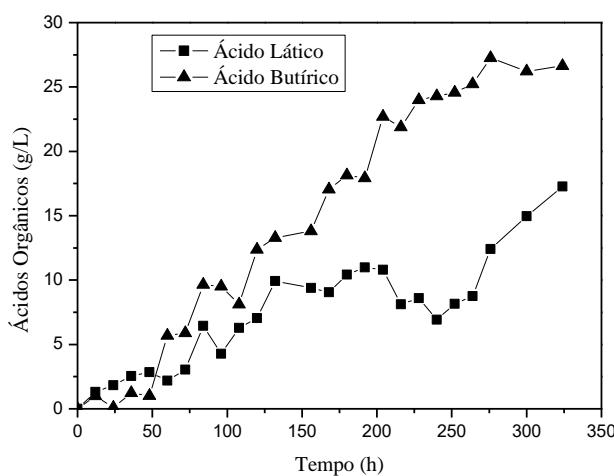


Figura 5.80 – Variação da concentração dos metabólitos formados: ácido láctico e ácido butírico, com co-cultura de *E. cloacae / R. capsulatus*, utilizando lactose e glicose, com adição alternada, como substrato em meio Caldo Nutriente.



O ácido acético é produzido até o tempo de 36 horas, observa-se o consumo dele até o tempo de 84 horas. Após esse tempo, ele volta a ser produzido em quantidades significativas, alcançando uma concentração de 3,05 g/L no tempo de 108 horas e continua a ser produzido até o final do processo fermentativo. O ácido lático foi produzido durante todo o ensaio, atingindo a concentração de 17,26 g/L. O ácido butírico foi produzido durante todo o processo fermentativo, chegando na concentração de 26,63 g/L. O etanol foi sintetizado continuamente durante o processo fermentativo, obtendo ao final, uma concentração de 3,92 g/L.

5.5.5 Consolidado dos Ensaios de 17 a 20

Na Tabela 5.5 observa-se um consolidado dos resultados obtidos nos Ensaios de 17 a 20, apresentados nos itens 5.5.1 a 5.55.

Tabela 5.5 - Consolidação dos Ensaios de 17 a 20.

	Ensaio 17 ^a	Ensaio 18 ^b	Ensaio 19 ^c	Ensaio 20 ^d
Produtividade máxima (mmol H ₂ /L.dia)	74,31	112,36	262,77	319,35
Tempo da produtividade máxima (h)	96	72	132	180
Conversão (mol de H ₂ /mol de hexose)	1,53	2,10	2,33	2,26
Ácido lático (g/L)	16,96	24,16	11,18	17,26
Ácido acético (g/L)	10,06	14,33	7,52	11,60
Ácido propiônico (g/L)	0,03	0,04	5,34	8,25
Ácido butírico (g/L)	9,29	13,23	17,26	26,63
Etanol (g/L)	3,34	4,75	2,54	3,92

^a – *E. cloacae / R. palustris*, glicose / permeado, meio RCV.

^b – *E. cloacae / R. capsulatus*, glicose / permeado, meio RCV.

^c – *E. cloacae / R. palustris*, glicose / permeado, meio CN.

^d – *E. cloacae / R. capsulatus*, glicose / permeado, meio CN.

Na quinta etapa do trabalho, foi estudado o sistema de co-cultura para a produção de hidrogênio por fotofermentação, utilizando o microrganismo *Enterobacter cloacae* e as bactérias púrpuras não sulfurosas, *Rhodopseudomonas palustris* e *Rhodobacter capsulatus*, no meio de cultivo RCV e Caldo Nutriente, sobre as influências da alimentação alternada da fonte de carbono glicose e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó. Observa-se que os melhores resultados de produtividade de hidrogênio, foram para os Ensaios 19 e 20, onde foi utilizado como meio reacional, o Caldo Nutriente. A concentração dos açúcares foi monitorada

de maneira que, ao ser totalmente consumido, o segundo tipo de açúcar já foi adicionado para que não houvesse a falta de substrato. Novamente observa-se o destaque para a co-cultura com *R. capsulatus*, alcançando os melhores resultados de produtividade neste trabalho.

Verifica-se que o comportamento da produtividade se manteve alto por maior tempo, dos que o observado nos demais ensaios, diante disto a co-cultura se manteve ativa por mais tempo, favorecendo o crescimento celular, a produção de ácidos orgânicos controlada e a produção de hidrogênio. A alternância do substrato foi importante para a manutenção da produção de hidrogênio por um maior período de tempo de processo. Os resultados obtidos indicam que, este procedimento, alterou o metabolismo da bactéria.

Moreira et al. (2017) estudaram a fermentação escura (sem adição de luz) em escala ampliada com o propósito de aumentar a produção de H₂, utilizando uma cultura mista com predominância de *Clostridium sp.*, *Lactobacillus sp.* e *Enterobacter sp.*. Avaliaram o modo de operação em batelada repetida com adição isolada, alternada e simultânea da fonte de carbono, glicose e lactose oriunda do Permeado de Soro de queijo em pó. Observaram que a fermentação com alimentação alternada da fonte de carbono, possibilitou manter a cultura ativa com potencial para produção de hidrogênio por um período superior a 900 horas. O valor da produtividade de hidrogênio alcançada foi de 132,06 mmol H₂/L.dia.

Machado et al. (2018) também avaliaram a produção de hidrogênio em batelada repetida utilizando o efluente da fermentação escura (sem adição de luz) como substrato para co-cultura de *Rhodopseudomonas palustris* e *Rhodobacter capsulatus*, utilizando como fonte de carbono, glicose e permeado de soro de leite. Os resultados mostraram que o sistema empregando a co-cultura com alternância da fonte de carbono apresentou maiores resultados de produtividade de 266,60 ± 5,33 mmol de H₂/L.dia.

Os resultados obtidos neste trabalho foram consideravelmente superiores aos encontrados na literatura. A produtividade máxima encontrada foi no Ensaio 20 de 319,35 mmol H₂/L.dia, valor 20 % superior ao estudo de Machado et al. (2018) e 241% superior ao trabalho de Moreira et al. (2017), o que indica que as bactérias utilizadas e a forma de alimentação apresentam uma sinergia que favorece a alta produção de hidrogênio.

Zagrodnik e Łaniecki (2017b) avaliaram o efeito do pH na produção de hidrogênio em um único estágio, utilizando co-cultura de bactéria na proporção 1:2: escura (*Clostridium acetobutylicum*) e fotofermentativa (*Rhodobacter sphaeroides*), utilizando o amido como fonte de carbono e o gás inerte argônio. O uso da co-cultura resultou em um consumo completo do amido sem acúmulo de ácidos orgânicos. A produção máxima de hidrogênio obtida foi de 195,88 mmol H₂/L.dia no pH de 7,0.

Morsy (2015) avaliou a produção de hidrogênio por bactérias mistas escuras e fotofermentativas de hidrogênio, *Escherichia coli*, *Clostridium acetobutylicum*, *Rhodobacter capsulatus* e *Rhodobacter sphaeroides*, utilizando como substrato o amido bruto de grãos de sorgo. A maior eficiência foi alcançada usando *R. capsulatus* e *R. sphaeroides* em co-cultura do que usando cada cepa no escuro e fotofermentação isoladas. A produtividade máxima encontrada foi de 432 mmol H₂/L.dia, com duração de apenas 80 horas de processo fermentativo.

Cai et al. (2018) estudaram diferentes proporções na associação de um consórcio de bactérias fermentativas escuras, obtidas a partir de um lodo anaeróbico de um tanque de camarão marinho, com uma bactéria fotofermentativa marinha tolerante à ácido, *Rhodovulum sulfidophilum*. A proporção de 1:10 do consórcio/foto, produziu o maior rendimento de hidrogênio (1924 mL/L). O uso da co-cultura estabilizou o valor do pH, diminuindo o potencial de redução da oxidação do sistema de co-cultura e prolongou o período de produção de hidrogênio.

Finalmente, o uso de fontes alternadas de carbono em fermentações de estágio único com co-cultura favoreceu a obtenção de altos valores de produtividade de hidrogênio, valores superiores aos encontrados em alguns trabalhos da literatura, conforme apresentado.

5.8 Considerações Finais

No presente estudo foi demonstrado a produção de hidrogênio em um único estágio por fotofermentação, utilizando o microrganismo *Enterobacter cloacae* e uma bactéria fotossintetizante: *Rhodobacter capsulatus* ou *Rhodopseudomonas palustris*, a partir do uso da glicose P.A. e da lactose proveniente do Permeado do Soro de queijo em pó.

Durante a primeira e segunda etapas, verificou-se que o microrganismo *Enterobacter cloacae* tem capacidade de produção de hidrogênio em condições distintas, com ou sem a presença de luz, ou diferentes gases inertes. O uso do permeado de Soro de Queijo em Pó, favoreceu a uma maior produção de hidrogênio, quando comparado ao uso da glicose como fonte de carbono, verificando que esse subproduto agroindustrial permite alcançar valores significativos na produção de hidrogênio.

As terceira e quarta etapas foram realizadas a fim de avaliar o sistema e co-cultura em um único estágio com a modificação dos meios fermentescíveis. Verificou-se que o nitrogênio

total e carbono total, que são provenientes da composição dos meios, favorecem a produção de hidrogênio.

Por fim, a quinta etapa teve como objetivo testar a alternância da fonte de carbono em fermentações de um único estágio com co-cultura. Nesta etapa foram obtidos valores elevados de produtividade de hidrogênio, sendo valores superiores aos encontrados na literatura.

Durante os processos fermentativos, vários metabólitos foram produzidos junto com o hidrogênio. Os metabólitos encontrados nas 5 etapas realizadas neste trabalho foram: ácido lático, ácido butírico, ácido acético, ácido propiônico, e etanol.

A produção de ácido acético e etanol são indicadores na produção de hidrogênio, conforme a Equação (3.8), fato observado em todas etapas do trabalho. A presença do ácido propiônico leva a uma diminuição na produção de hidrogênio, pois na sua rota de produção, são consumidos mols de H₂ para a produção do ácido propiônico conforme Equação (3.9).

Do ponto de vista ambiental, o uso de um subproduto agroindustrial, rico em carboidrato como o Permeado de soro de queijo em Pó, minimiza o seu acúmulo nos processos industriais, sem que haja prejuízo para o mercado consumidor do produto, visto o potencial do mesmo, apontado neste estudo.

Do ponto de vista econômico, com este estudo foi possível compreender os processos envolvidos na produção de hidrogênio por um único estágio, sendo uma alternativa a fim de eliminar as etapas de pré-tratamento no efluente a ser utilizado na fotofermentação.

Este trabalho permite afirmar que o sistema proposto se apresenta como uma alternativa viável para a produção de hidrogênio em um único estagio com co-cultura de microrganismos. No entanto, faz se necessário o desenvolvimento de pesquisas para otimizar os parâmetros elevando a eficiência na produção de hidrogênio, para que se tornem comercialmente competitivos.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, mostraram que o microrganismo *Enterobacter cloacae* é um microrganismo promissor para produção de hidrogênio via fermentação líquida na presença ou não de luz.

Nos Ensaios de 1 a 4, verificou-se que o microrganismo *Enterobacter cloacae*, apresentou resultados promissores para produção de hidrogênio em todos os ensaios, utilizando glicose como fonte carbono. A produtividade máxima encontrada foi de 207,45 mmol H₂/L.dia para o Ensaio 1, utilizando o gás inerte nitrogênio sem a presença de luz. O Ensaio 4 apresentou uma produtividade de 174,57 mmol H₂/L.dia, utilizando o gás inerte argônio com a presença de luz, o que indica que o microrganismo produz H₂ em uma quantidade semelhante para ambas situações.

Nos Ensaios de 5 a 8, observou-se que o microrganismo *Enterobacter cloacae*, apresentou resultados satisfatórios para produção de hidrogênio apenas para os ensaios utilizando o gás inerte argônio e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono. A produtividade máxima foi de 197,63 mmol H₂/L.dia para o Ensaio 8, com o gás inerte argônio e com a presença de luz.

Nos Ensaios de 9 a 12, verificou-se que o sistema de co-cultura para a produção de hidrogênio por fotofermentação, utilizando o microrganismo *Enterobacter cloacae* e a *Rhodobacter capsulatus*, no meio de cultivo RCV, obtiveram melhores resultados. A produtividade máxima encontrada foi para o Ensaio 10, de 133,04 mmol H₂/L.dia, utilizando glicose como fonte de carbono e para o Ensaio 12, de 141,67 mmol H₂/L.dia utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono.

Nos ensaios de 13 a 16, verificou-se que o sistema de co-cultura para a produção de hidrogênio por fotofermentação, utilizando o microrganismo *Enterobacter cloacae* e as bactérias púrpuras não sulfurosas, *Rhodopseudomonas palustris* e *Rhodobacter capsulatus*, no meio de cultivo Caldo Nutriente, os melhores resultados foram obtidos utilizando a lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó como fonte de carbono. A produtividade máxima foi encontrada nos Ensaios 15 e 16, de 172,08 e 201,15 mmol H₂/L.dia, respectivamente. O tempo de duração destes ensaios foram maiores do que os ensaios utilizando a *E. cloacae* isolada, alcançando tempos superiores a 400 horas.

Nos Ensaios de 17 a 20, averiguou-se que a influência da forma de alimentação alternada da fonte de carbono, glicose e lactose proveniente do Permeado de Soro de queijo em pó,

promoveu resultados relevantes no sistema de co-cultura, utilizando o microrganismo *Enterobacter cloacae* e as bactérias púrpuras não sulfurosas: *Rhodopseudomonas palustris* e *Rhodobacter capsulatus*. As produtividades máximas encontradas foram para os Ensaios 19 e 20, de 262,77 e 319,35 mmol H₂/L.dia, respectivamente, utilizando o meio reacional Caldo Nutriente.

A quinta etapa do trabalho foi a que promoveu os maiores resultados da produtividade de hidrogênio, sendo que a alternância da fonte de carbono, é influenciada pela alteração da rota metabólica, produzindo altos valores de hidrogênio. A realização do processo fermentativo em um único estágio, elimina as etapas de pré-tratamento no efluente a ser utilizado na fotofermentação, diminuindo os custos do processo.

6.1 Sugestões de trabalhos futuros

- Testar o uso de outros subprodutos agroindustriais (melaço de soja e cana), de modo a viabilizar a utilização deste material residual, minimizando o seu acúmulo nos processos industriais.
- Testar diferentes proporções das bactérias utilizadas.
- Ampliação do conhecimento sobre ação dos microrganismos no processo fermentativo, identificando os momentos de preferência por tipo de substrato.
- Otimização dos processos fermentativos, testando a alimentação das fontes de carbono de forma simultânea.
- Testar o uso de uma nova cultura pura, *Rhodospirillum rubrum*.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAHMAN, Mohamed Ali; TASHIRO, Yukihiro; SONOMOTO, Kenji. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. **Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 156, n. 4, p. 286–301, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.06.017>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165611003166>.
- AFSAR, Nilüfer; ÖZGÜR, Ebru; GÜRGAN, Muazzez; AKKÖSE, Sevilay; YÜCEL, Meral; GÜNDÜZ, Ufuk; EROGLU, Inci. Hydrogen productivity of photosynthetic bacteria on dark fermenter effluent of potato steam peels hydrolysate. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 36, n. 1, p. 432–438, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.09.096>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319910020069>.
- AHMADI, Negin; KHOSRAVI-DARANI, Kianoush; MORTAZAVIAN, Amir Mohammad. An overview of biotechnological production of propionic acid: From upstream to downstream processes. **Electronic Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 28, p. 67–75, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.04.004>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0717345817300222>.
- AMORIM, N. C. S.; ALVES, I.; MARTINS, J. S.; AMORIM, E. L. C. Biohydrogen production from cassava wastewater in an anaerobic fluidized bed reactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 603–612, 2014. DOI: 10.1590/0104-6632.20140313s00002458. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66322014000300003&lng=en&tlng=en.
- ARIMI, Milton M.; KNODEL, Jan; KIPROP, Ambrose; NAMANGO, Saul S.; ZHANG, Yongjun; GEISSEN, Sven-Uwe. Strategies for improvement of biohydrogen production from organic-rich wastewater: A review. **Biomass and Bioenergy**, [S. l.], v. 75, p. 101–118, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.02.011>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953415000471>.
- BAGHCHEHSARAE, Bita; NAKHLA, George; KARAMANEV, Dimitre; MARGARITIS, Argyrios. Effect of extrinsic lactic acid on fermentative hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 34, n. 6, p. 2573–2579, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.01.010>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319909000469>.
- BASAK, Nitai; JANA, Asim Kumar; DAS, Debabrata. Optimization of molecular hydrogen production by Rhodobacter sphaeroides O.U.001 in the annular photobioreactor using response surface methodology. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 39, n. 23, p. 11889–11901, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.05.108>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319914014906>.
- BASTIDAS-OYANEDEL, Juan-Rodrigo; BONK, Fabian; THOMSEN, Mette Hedegaard; SCHMIDT, Jens Ejbye. Dark fermentation biorefinery in the present and future (bio)chemical

industry. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 473–498, 2015. DOI: 10.1007/s11157-015-9369-3. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11157-015-9369-3>.

BECKERS, Laurent; HILIGSMANN, Serge; HAMILTON, Christopher; MASSET, Julien; THONART, Philippe. Fermentative hydrogen production by Clostridium butyricum CWBI1009 and Citrobacter freundii CWBI952 in pure and mixed cultures. **Biotechnologie, agronomie, société et environnement**, [S. l.], v. 14, n. S2, p. 541–548, 2010.

BEN. Balanço Energético Nacional. [S. l.], 2019. Disponível em: <http://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-377/topico-470/Relatório Síntese BEN 2019 Ano Base 2018.pdf>.

BERBEROĞLU, Halil; JAY, Jenny; PILON, Laurent. Effect of nutrient media on photobiological hydrogen production by Anabaena variabilis ATCC 29413. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 33, n. 4, p. 1172–1184, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.12.036>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319907007616>.

BRAÚNA, Carlos Henrique da Costa. **Co-digestão anaeróbia de tortas de oleaginosas visando à produção de metano**. 2012. Universidade Federal do Ceará, [S. l.], 2012.

BRAZ ROMÃO, Betânia; MOREIRA SILVA, Felipe Thalles; COUTINHO DE BARCELOS COSTA, Henrique; SANTOS MOREIRA, Felipe; DE SOUZA FERREIRA, Juliana; REGINA XAVIER BATISTA, Fabiana; LUIZ CARDOSO, Vicelma. Influence of heat pre-treated inoculum and pH control on the hydrogen production by microbial consortium. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 505–512, 2018. DOI: 10.1002/ep.12672. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/ep.12672>.

BURROWS, Elizabeth H.; WONG, Weng-Keen; FERN, Xiaoli; CHAPLEN, Frank W. R.; ELY, Roger L. Optimization of pH and nitrogen for enhanced hydrogen production by Synechocystis sp. PCC 6803 via statistical and machine learning methods. **Biotechnology Progress**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 1009–1017, 2009. DOI: 10.1002/btpr.213. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/btpr.213>.

CABROL, Lea; MARONE, Antonella; TAPIA-VENEGAS, Estela; STEYER, Jean-Philippe; RUIZ-FILIPPI, Gonzalo; TRABLY, Eric. Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: useful insights for driving the ecosystem function. **FEMS Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 158–181, 2017. DOI: 10.1093/femsre/fuw043. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsre/article/2979383/Microbial>.

CAI, Jinling; GUAN, Yue; JIA, Tingting; YANG, Junjie; HU, Yang; LI, Pengpeng; DUAN, Yue; ZHANG, Lei; YU, Peng. Hydrogen production from high slat medium by co-culture of Rhodovulum sulfidophilum and dark fermentative microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 43, n. 24, p. 10959–10966, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.05.014>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319918314782>.

CHENG, Jun; ZHANG, Minghui; SONG, Wenlu; XIA, Ao; ZHOU, Junhu; CEN, Kefa. Cogeneration of hydrogen and methane from Arthrosphaera maxima biomass with bacteria domestication and enzymatic hydrolysis. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 36, n. 2, p. 1474–1481, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.11.009>.

Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S036031991002224X>.

CHONG, Mei-Ling; SABARATNAM, Vikineswary; SHIRAI, Yoshihito; HASSAN, Mohd Ali. Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 34, n. 8, p. 3277–3287, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.02.010>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319909002079>.

CHONG, Poh She; JAHIM, Jamaliah Md.; HARUN, Shuhaida; LIM, Swee Su; MUTALIB, Sahilah Abd.; HASSAN, Osman; NOR, Mohd Tusirin Mohd. Enhancement of batch biohydrogen production from prehydrolysate of acid treated oil palm empty fruit bunch. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 38, n. 22, p. 9592–9599, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.01.154>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319913002632>.

DAS, Debabrata; VEZIROĞLU, T. Nejat. Advances in biological hydrogen production processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 33, n. 21, p. 6046–6057, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.098>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S036031990800918X>.

DAS, Debabrata; VEZIROĞLU, T. Nejat. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 13–28, 2001. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0360-3199\(00\)00058-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0360-3199(00)00058-6). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319900000586>.

DASGUPTA, Chitralekha Nag; JOSE GILBERT, J.; LINDBLAD, Peter; HEIDORN, Thorsten; BORGVANG, Stig A.; SKJANES, Kari; DAS, Debabrata. Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 35, n. 19, p. 10218–10238, 2010. DOI: [10.1016/j.ijhydene.2010.06.029](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.06.029). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S036031991001205X>.

DAVILA-VAZQUEZ, Gustavo; ALATRISTE-MONDRAGÓN, Felipe; DE LEÓN-RODRÍGUEZ, Antonio; RAZO-FLORES, Elías. Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 33, n. 19, p. 4989–4997, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.06.065>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319908008057>.

DAVILA-VAZQUEZ, Gustavo; DE LEÓN-RODRÍGUEZ, Antonio; ALATRISTE-MONDRAGÓN, Felipe; RAZO-FLORES, Elías. The buffer composition impacts the hydrogen production and the microbial community composition in non-axenic cultures. **Biomass and Bioenergy**, [S. l.], v. 35, n. 7, p. 3174–3181, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.04.046>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953411002480>.

DE GIOANNIS, G.; MUNTONI, A.; POLETTINI, A.; POMI, R. A review of dark fermentative hydrogen production from biodegradable municipal waste fractions. **Waste Management**, [S. l.], v. 33, n. 6, p. 1345–1361, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2013.02.019>. Disponível em: <file:///www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956053X13001074>.

DEMIRBAS, Ayhan. **Biohydrogen**. London: Springer London, 2009. DOI: 10.1007/978-1-

84882-511-6. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-84882-511-6>.

DEMIREL, Burak; SCHERER, Paul; YENIGUN, Orhan; ONAY, Turgut T. Production of Methane and Hydrogen from Biomass through Conventional and High-Rate Anaerobic Digestion Processes. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, [S. l.], v. 40, n. 2, p. 116–146, 2010. DOI: 10.1080/10643380802013415. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10643380802013415>.

DINCER, Ibrahim; ACAR, Canan. Review and evaluation of hydrogen production methods for better sustainability. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 40, n. 34, p. 11094–11111, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.12.035>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319914034119>.

DING, Jie; LIU, Bing-Feng; REN, Nan-Qi; XING, De-Feng; GUO, Wan-Qian; XU, Ji-Fei; XIE, Guo-Jun. Hydrogen production from glucose by co-culture of Clostridium Butyricum and immobilized Rhodopseudomonas faecalis RLD-53. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 34, n. 9, p. 3647–3652, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.02.078>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S036031990900367X>.

DING, Lingkan; CHENG, Jun; QIAO, Dan; YUE, Liangchen; LI, Yu-You; ZHOU, Junhu; CEN, Kefa. Investigating hydrothermal pretreatment of food waste for two-stage fermentative hydrogen and methane co-production. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 241, p. 491–499, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.114>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852417307769>.

ELBESHIBHY, Elsayed; DHAR, Bipro Ranjan; NAKHLA, George; LEE, Hyung-Sool. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 79, p. 656–668, 2017. DOI: 10.1016/j.rser.2017.05.075. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032117307153>.

ELSHARNOUBY, Omneya; HAFEZ, Hisham; NAKHLA, George; EL NAGGAR, M. Hesham. A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 38, n. 12, p. 4945–4966, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.02.032>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319913003984>.

EROGLU, Ela; MELIS, Anastasios. Photobiological hydrogen production: Recent advances and state of the art. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 102, n. 18, p. 8403–8413, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.026>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852411003683>.

ESPINOZA-ESCALANTE, Froylán M.; PELAYO-ORTÍZ, Carlos; NAVARRO-CORONA, José; GONZÁLEZ-GARCÍA, Yolanda; BORIES, André; GUTIÉRREZ-PULIDO, Humberto. Anaerobic digestion of the vinasses from the fermentation of Agave tequilana Weber to tequila: The effect of pH, temperature and hydraulic retention time on the production of hydrogen and methane. **Biomass and Bioenergy**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 14–20, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2008.04.006>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953408000949>.

FANG, Herbert H. P.; LIU, Hong. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 82, n. 1, p. 87–93, 2002. DOI:

- https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00110-9. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852401001109.
- GINKEL, Steven Van; SUNG, Shihwu; LAY, Jiunn-Jyi. Biohydrogen Production as a Function of pH and Substrate Concentration. **Environmental Science & Technology**, [S. l.], v. 35, n. 24, p. 4726–4730, 2001. DOI: 10.1021/es001979r. Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es001979r.
- GIRARD, Jean-Michel; ROY, Marie-Laine; HAFSA, Mhammed Ben; GAGNON, Jonathan; FAUCHEUX, Nathalie; HEITZ, Michèle; TREMBLAY, Réjean; DESCHÈNES, Jean-Sébastien. Mixotrophic cultivation of green microalgae *Scenedesmus obliquus* on cheese whey permeate for biodiesel production. **Algal Research**, [S. l.], v. 5, p. 241–248, 2014. DOI: https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.03.002. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926414000265.
- GOMES, Simone Damasceno; FUESS, Lucas Tadeu; MAÑUNGA, Tatiana; FEITOSA DE LIMA GOMES, Paulo Clairmont; ZAIAT, Marcelo. Bacteriocins of lactic acid bacteria as a hindering factor for biohydrogen production from cassava flour wastewater in a continuous multiple tube reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 41, n. 19, p. 8120–8131, 2016. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.11.186. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319916308655.
- GUO, Xin Mei; TRABLY, Eric; LATRILLE, Eric; CARRÈRE, Hélène; STEYER, Jean-Philippe. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 35, n. 19, p. 10660–10673, 2010. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.008. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319910004520.
- GUWY, A. J.; DINSDALE, R. M.; KIM, J. R.; MASSANET-NICOLAU, J.; PREMIER, G. Fermentative biohydrogen production systems integration. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 102, n. 18, p. 8534–8542, 2011. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.04.051. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852411005657.
- HAFEZ, Hisham; NAKHLA, George; EL. NAGGAR, M. Hesham; ELBESHIBISHY, Elsayed; BAGHCHEHSARAEE, Bita. Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 81–92, 2010. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.10.051. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319909016498.
- HALLENBECK, Patrick C.; BENEMANN, John R. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 27, n. 11–12, p. 1185–1193, 2002. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00131-3. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319902001313.
- HALLENBECK, Patrick C.; GHOSH, Dipankar. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? **Trends in Biotechnology**, [S. l.], v. 27, n. 5, p. 287–297, 2009. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.02.004. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779909000572.
- HAN, Wei; LIU, Da Na; SHI, Yi Wen; TANG, Jun Hong; LI, Yong Feng; REN, Nan Qi. Biohydrogen production from food waste hydrolysate using continuous mixed immobilized sludge reactors. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 180, p. 54–58, 2015. DOI:

- [https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.067.](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.067) Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852414018136>.
- HARUN, Irina; JAHIM, Jamaliah Md; ANUAR, Nurina; HASSAN, Osman. Hydrogen production performance by Enterobacter cloacae KBH3 isolated from termite guts. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 37, n. 20, p. 15052–15061, 2012. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2012.07.101. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360319912017314>.
- HITIT, Zeynep Yilmazer; ZAMPOL LAZARO, Carolina; HALLENBECK, Patrick C. Increased hydrogen yield and COD removal from starch/glucose based medium by sequential dark and photo-fermentation using Clostridium butyricum and Rhodopseudomonas palustris. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 42, n. 30, p. 18832–18843, 2017. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2017.05.161. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360319917320694>.
- HOSSEINI, Seyed Ehsan; ABDUL WAHID, Mazlan; JAMIL, M. M.; AZLI, Anis A. M.; MISBAH, Mohamad F. A review on biomass-based hydrogen production for renewable energy supply. **International Journal of Energy Research**, [S. l.], v. 39, n. 12, p. 1597–1615, 2015. DOI: 10.1002/er.3381. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/er.3381>.
- HUESEMANN, Michael H.; HAUSMANN, Tom S.; CARTER, Blaine M.; GERSCHLER, Jared J.; BENEMANN, John R. Hydrogen Generation Through Indirect Biophotolysis in Batch Cultures of the Nonheterocystous Nitrogen-Fixing Cyanobacterium Plectonema boryanum. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 162, n. 1, p. 208–220, 2010. DOI: 10.1007/s12010-009-8741-6. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12010-009-8741-6>.
- JAYASINGHEARACHCHI, H. S.; SARMA, Priyangshu M.; SINGH, Sneha; AGINIHOTRI, Anil; MANDAL, Ajay K.; LAL, Banwari. Fermentative hydrogen production by two novel strains of Enterobacter aerogenes HGN-2 and HT 34 isolated from sea buried crude oil pipelines. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 34, n. 17, p. 7197–7207, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.06.079>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319909009719>.
- JIANG, Danping; GE, Xumeng; LIN, Long; ZHANG, Tian; LIU, Huiliang; HU, Jianjun; ZHANG, Quanguo. Continuous photo-fermentative hydrogen production in a tubular photobioreactor using corn stalk pith hydrolysate with a consortium. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 45, n. 6, p. 3776–3784, 2020. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2019.06.078. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360319919323213>.
- JIANG, Ling; FU, Hongxin; YANG, Hopen K.; XU, Wei; WANG, Jufang; YANG, Shang-Tian. Butyric acid: Applications and recent advances in its bioproduction. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 36, n. 8, p. 2101–2117, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.09.005>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975018301629>.
- KAMALASKAR, Leena B.; DHAKEPHALKAR, P. K.; MEHER, K. K.; RANADE, D. R. High biohydrogen yielding Clostridium sp. DMHC-10 isolated from sludge of distillery waste treatment plant. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 35, n. 19, p. 10639–10644, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.05.020>. Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319910009559>.

KAPDAN, Ilgi Karapinar; KARGI, Fikret. Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 38, n. 5, p. 569–582, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.09.015>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022905005053>.

KARGI, Fikret; OZMIHCI, Serpil. Effects of dark/light bacteria ratio on bio-hydrogen production by combined fed-batch fermentation of ground wheat starch. **Biomass and Bioenergy**, [S. l.], v. 34, n. 6, p. 869–874, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.01.031>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953410000450>.

KAWAGOSHI, Yasunori; OKI, Yukinori; NAKANO, Issei; FUJIMOTO, Aya; TAKAHASHI, Hirokazu. Biohydrogen production by isolated halotolerant photosynthetic bacteria using long-wavelength light-emitting diode (LW-LED). **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 35, n. 24, p. 13365–13369, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.11.121>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319909019545>.

KESKIN, Tugba; HALLENBECK, Patrick C. Hydrogen production from sugar industry wastes using single-stage photofermentation. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 112, n. Supplement C, p. 131–136, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.077>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412003288>.

KHANNA, Namita; DASGUPTA, Chitralekha Nag; MISHRA, Preeti; DAS, Debabrata. Homologous overexpression of [FeFe] hydrogenase in Enterobacter cloacae IIT-BT 08 to enhance hydrogen gas production from cheese whey. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 36, n. 24, p. 15573–15582, 2011. DOI: [10.1016/j.ijhydene.2011.09.020](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.09.020). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360319911020994>.

KHANNA, Namita; KUMAR, Kanhaiya; TODI, Sona; DAS, Debabrata. Characteristics of cured and wild strains of Enterobacter cloacae IIT-BT 08 for the improvement of biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 37, n. 16, p. 11666–11676, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.05.051>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319912011949>.

KHETKORN, Wanthanee; LINDBLAD, Peter; INCHAROENSAKDI, Aran. Enhanced biohydrogen production by the N₂-fixing cyanobacterium Anabaena siamensis strain TISTR 8012. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 35, n. 23, p. 12767–12776, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.08.135>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S036031991001774X>.

KIM, B. W.; CHANG, K. P.; CHANG, H. N. Effect of light source on the microbiological desulfurization in a photobioreactor. **Bioprocess Engineering**, [S. l.], v. 17, n. 6, p. 343, 1997. DOI: [10.1007/s004490050395](https://doi.org/10.1007/s004490050395). Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s004490050395>.

KIM, Jun Pyo; KIM, Kyoung-Rok; CHOI, Seung Phill; HAN, Se Jong; KIM, Mi Sun; SIM, Sang Jun. Repeated production of hydrogen by sulfate re-addition in sulfur deprived culture of Chlamydomonas reinhardtii. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 35, n. 24, p. 13387–13391, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.11.113>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319909019466>.

- KIM, Tae-Hyeong; LEE, Yunhee; CHANG, Kwang-Hyeon; HWANG, Sun-Jin. Effects of initial lactic acid concentration, HRTs, and OLRs on bio-hydrogen production from lactate-type fermentation. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 103, n. 1, p. 136–141, 2012. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.09.093. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852411013812>.
- KIRTAY, Elif. Recent advances in production of hydrogen from biomass. **Energy Conversion and Management**, [S. l.], v. 52, n. 4, p. 1778–1789, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.11.010>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196890410005108>.
- KOKU, Harun; EROĞLU, İnci; GÜNDÜZ, Ufuk; YÜCEL, Meral; TÜRKER, Lemi. Aspects of the metabolism of hydrogen production by Rhodobacter sphaeroides. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 27, n. 11, p. 1315–1329, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00127-1](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00127-1). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319902001271>.
- KUMAR, Narendra; DAS, Debabrata. Enhancement of hydrogen production by Enterobacter cloacae IIT-BT 08. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 589–593, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00109-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00109-0). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959299001090>.
- LEVIN, David B.; PITT, Lawrence; LOVE, Murray. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 29, n. 2, p. 173–185, 2004. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0360-3199\(03\)00094-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0360-3199(03)00094-6). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319903000946>.
- LI, Chenlin; FANG, Herbert H. P. Fermentative Hydrogen Production From Wastewater and Solid Wastes by Mixed Cultures. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 1–39, 2007. DOI: 10.1080/10643380600729071. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10643380600729071>.
- LIANG, Shaobo; MCDONALD, Armando G.; COATS, Erik R. Lactic acid production from potato peel waste by anaerobic sequencing batch fermentation using undefined mixed culture. **Waste Management**, [S. l.], v. 45, p. 51–56, 2015. DOI: 10.1016/j.wasman.2015.02.004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956053X15000872>.
- LIN, Chiu-Yue; LAY, Chyi-How; SEN, Biswarup; CHU, Chen-Yeon; KUMAR, Gopalakrishnan; CHEN, Chin-Chao; CHANG, Jo-Shu. Fermentative hydrogen production from wastewaters: A review and prognosis. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 37, n. 20, p. 15632–15642, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.02.072>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319912004363>.
- LIU, Xiaoguang; ZHU, Ying; YANG, Shang-Tian. Butyric acid and hydrogen production by Clostridium tyrobutyricum ATCC 25755 and mutants. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 38, n. 3–4, p. 521–528, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmotec.2005.07.008>. Disponível em: <file:///www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022905003042>.
- LOGAN, Bruce E.; OH, Sang-Eun; KIM, In S.; VAN GINKEL, Steven. Biological Hydrogen Production Measured in Batch Anaerobic Respirometers. **Environmental Science & Technology**, [S. l.], v. 36, n. 11, p. 2530–2535, 2002. DOI: 10.1021/es015783i. Disponível em:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es015783i>.

LOSS, Raquel Aparecida. **Avaliação da produção de hidrogênio por consórcio bacteriano fotoheterotrófico**. 2011. Universidade Federal de Santa Catarina, [S. l.], 2011.

MACHADO, R. G.; MOREIRA, F. S.; BATISTA, F. R. X.; FERREIRA, J. S.; CARDOSO, V. L. Repeated batch cycles as an alternative for hydrogen production by co-culture photofermentation. **Energy**, [S. l.], v. 153, p. 861–869, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.energy.2018.04.101>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S036054421830714X>.

MADIGAN, Michael T.; MARTINKO, John M.; BENDER, Kelly S.; BUCKLEY, Daniel H.; STAHL, David A. **Microbiologia de Brock-14^a Edição**. [s.l.] : Artmed Editora, 2016.

MANDAL, Biswajit; NATH, Kaushik; DAS, Debabrata. Improvement of Biohydrogen Production Under Decreased Partial Pressure of H₂ by Enterobacter cloacae. **Biotechnology Letters**, [S. l.], v. 28, n. 11, p. 831–835, 2006. DOI: 10.1007/s10529-006-9008-8. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-006-9008-8>.

MASSET, Julien; CALUSINSKA, Magdalena; HAMILTON, Christopher; HILIGSMANN, Serge; JORIS, Bernard; WILMOTTE, Annick; THONART, Philippe. Fermentative hydrogen production from glucose and starch using pure strains and artificial co-cultures of Clostridium spp. **Biotechnology for Biofuels**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 35, 2012. DOI: 10.1186/1754-6834-5-35. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-35>.

MASUKAWA, Hajime; SAKURAI, Hidehiro; HAUSINGER, Robert P.; INOUE, Kazuhito. Sustained photobiological hydrogen production in the presence of N₂ by nitrogenase mutants of the heterocyst-forming cyanobacterium Anabaena. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 39, n. 34, p. 19444–19451, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.09.090>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319914026494>.

MCKINLAY, James B.; HARWOOD, Caroline S. Photobiological production of hydrogen gas as a biofuel. **Current Opinion in Biotechnology**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 244–251, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.02.012>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166910000285>.

MEHER KOTAY, Shireen; DAS, Debabrata. Biohydrogen as a renewable energy resource—Prospects and potentials. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 258–263, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.07.031>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319907003904>.

MIDILLI, A.; AY, M.; DINCER, I.; ROSEN, M. A. On hydrogen and hydrogen energy strategies: I: current status and needs. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 255–271, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2004.05.003>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032104000644>.

MIN, H.; SHERMAN, L. A. Hydrogen Production by the Unicellular, Diazotrophic Cyanobacterium *Cyanothece* sp. Strain ATCC 51142 under Conditions of Continuous Light. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 76, n. 13, p. 4293–4301, 2010. DOI: 10.1128/AEM.00146-10. Disponível em: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.00146-10>.

MIRZA, Saima Shahzad; QAZI, Javed Iqbal; LIANG, Yu; CHEN, Shulin. Growth characteristics and photofermentative biohydrogen production potential of purple non sulfur bacteria from sugar cane bagasse. **Fuel**, [S. l.], v. 255, p. 115805, 2019. DOI: 10.1016/j.fuel.2019.115805. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016236119311573>.

MOHANRAJ, Sundaresan; KODHAIYOLII, Shanmugam; RENGASAMY, Mookan; PUGALENTHI, Velan. 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**, [S. l.], v. 39, n. 23, p. 11920–11929, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.06.027>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S036031991401667X>.

MONA, Sharma; KAUSHIK, Anubha; KAUSHIK, C. P. Hydrogen production and metal-dye bioremoval by a Nostoc linckia strain isolated from textile mill oxidation pond. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 102, n. 3, p. 3200–3205, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.005>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410018079>.

MOREIRA, F. S.; MACHADO, R. G.; ROMÃO, B. B.; BATISTA, F. R. X.; FERREIRA, J. S.; CARDOSO, V. L. Improvement of hydrogen production by biological route using repeated batch cycles. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 58, p. 60–68, 2017. DOI: 10.1016/j.procbio.2017.04.013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511316310236>.

MORSY, Fatthy Mohamed. CO₂-free biohydrogen production by mixed dark and photofermentation bacteria from sorghum starch using a modified simple purification and collection system. **Energy**, [S. l.], v. 87, p. 594–604, 2015. DOI: 10.1016/j.energy.2015.05.044. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360544215006258>.

MOSCOVIZ, Roman; TRABLY, Eric; BERNET, Nicolas; CARRÈRE, Hélène. The environmental biorefinery: state-of-the-art on the production of hydrogen and value-added biomolecules in mixed-culture fermentation. **Green Chemistry**, [S. l.], v. 20, n. 14, p. 3159–3179, 2018. DOI: 10.1039/C8GC00572A. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C8GC00572A>.

NAGARAJAN, Dillirani; LEE, Duu-Jong; KONDO, Akihiko; CHANG, Jo-Shu. Recent insights into biohydrogen production by microalgae – From biophotolysis to dark fermentation. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 227, p. 373–387, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.104>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852416317825>.

NAKASHIMADA, Y.; RACHMAN, M. A.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N. Hydrogen production of Enterobacter aerogenes altered by extracellular and intracellular redox states. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 27, n. 11, p. 1399–1405, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00128-3](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00128-3). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319902001283>.

NASR, Noha; GUPTA, Medhavi; HAFEZ, Hisham; EL NAGGAR, M. Hesham; NAKHLA, George. Mono- and co-substrate utilization kinetics using mono- and co-culture of Clostridium beijerinckii and Clostridium saccharoperbutylacetonicum. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 241, p. 152–160, 2017. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.05.086. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852417307411>.

NATH, Kaushik; KUMAR, Anish; DAS, Debabrata. Hydrogen production by Rhodobacter sphaeroides strain O.U.001 using spent media of Enterobacter cloacae strain DM11. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 68, n. 4, p. 533–541, 2005. DOI: 10.1007/s00253-005-1887-4. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-005-1887-4>.

NAVARRO, E.; MONTAGUD, A.; FERNÁNDEZ DE CÓRDOBA, P.; URCHUEGUÍA, J. F. Metabolic flux analysis of the hydrogen production potential in Synechocystis sp. PCC6803. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 34, n. 21, p. 8828–8838, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.08.036>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319909012622>.

NIU, Kun; ZHANG, Xu; TAN, Wen-Song; ZHU, Ming-Long. Characteristics of fermentative hydrogen production with Klebsiella pneumoniae ECU-15 isolated from anaerobic sewage sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 71–80, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.10.071>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319909016693>.

NOIKE, Tatsuya; TAKABATAKE, Hiroo; MIZUNO, Osamu; OHBA, Mika. Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 27, n. 11, p. 1367–1371, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00120-9](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00120-9). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319902001209>.

OBEID, Jamila; FLAUS, Jean-Marie; ADROT, Olivier; MAGNIN, Jean-Pierre; WILLISON, John C. State estimation of a batch hydrogen production process using the photosynthetic bacteria Rhodobacter capsulatus. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 35, n. 19, p. 10719–10724, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.02.051>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319910003332>.

PRAZERES, Ana R.; CARVALHO, Fátima; RIVAS, Javier. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, [S. l.], v. 110, n. Supplement C, p. 48–68, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479712002769>.

RABELO, Camila Abreu B. Silva; SOARES, Laís Américo; SAKAMOTO, Isabel Kimiko; SILVA, Edson Luiz; VARESCHE, Maria Bernadete Amâncio. Optimization of hydrogen and organic acids productions with autochthonous and allochthonous bacteria from sugarcane bagasse in batch reactors. **Journal of Environmental Management**, [S. l.], v. 223, p. 952–963, 2018. DOI: [10.1016/j.jenvman.2018.07.015](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.07.015). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301479718307679>.

RAN, Chunqiu; ZHANG, Fengjie; SUN, Hongjie; ZHAO, Budiao. Effect of culture medium on hydrogen production by sulfur-deprived marine green algae *Platymonas subcordiformis*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, [S. l.], v. 14, n. 6, p. 835–841, 2009. DOI: [10.1007/s12257-008-0287-x](https://doi.org/10.1007/s12257-008-0287-x). Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12257-008-0287-x>.

REN, Nanqi; WANG, Baozhen; HUANG, Ju-Chang. Ethanol-type fermentation from carbohydrate in high rate acidogenic reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, [S. l.], v. 54, n. 5, p. 428–433, 1997. DOI: [10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970605\)54:5<428::AID-BIOTEC>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970605)54:5<428::AID-BIOTEC>3.0.CO;2-1).

BIT3>3.0.CO;2-G. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291097-0290%2819970605%2954%3A5%3C428%3A%3AAID-BIT3%3E3.0.CO%3B2-G>.

ROSSI, Daniele Misturini; BERNE DA COSTA, Janaína; AQUINO DE SOUZA, Elisangela; PERALBA, Maria do Carmo Ruaro; SAMIOS, Dimitrios; ZÁCHIA AYUB, Marco Antônio. Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 36, n. 8, p. 4814–4819, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.01.005>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319911000139>.

SÁ, Lívia R. Vasconcelos De; CAMMAROTA, Magali C.; FERREIRA-LEITÃO, Viridiana S. Hydrogen production by anaerobic fermentation - general aspects and possibility of using Brazilian agro-industrial wastes. **Química Nova**, [S. l.], 2014. DOI: 10.5935/0100-4042.20140138. Disponível em: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0100-4042.20140138>.

SAADY, Noori M. Cata. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 38, n. 30, p. 13172–13191, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.122>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S036031991301906X>.

SAĞIR, Emrah; YUCEL, Meral; HALLENBECK, Patrick C. Demonstration and optimization of sequential microaerobic dark- and photo-fermentation biohydrogen production by immobilized Rhodobacter capsulatus JP91. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 250, p. 43–52, 2018. DOI: [10.1016/j.biortech.2017.11.018](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.018). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852417319922>.

SAKURAI, Hidehiro; MASUKAWA, Hajime; KITASHIMA, Masaharu; INOUE, Kazuhito. Photobiological hydrogen production: Bioenergetics and challenges for its practical application. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, [S. l.], v. 17, p. 1–25, 2013. DOI: [10.1016/j.jphotochemrev.2013.05.001](https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2013.05.001). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S138955671300021X>.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, [S. l.], v. 3, 2001.

SANTOS, Fernando Miguel Soares Mamede Dos. **Células de combustível uma tecnologia para a geração distribuída**. 2003. Coimbra, [S. l.], 2003. Disponível em: <https://estudogeral.sib.uc.pt/handle/10316/13976>.

SARMA, Saurabh; MAITI, Sampa; BRAR, Satinder; BIHAN, Yann; BUELNA, Gerardo; VERMA, Mausam. Low cost semi-continuous bioprocess and online monitoring of hydrogen production from crude glycerol. **RSC Advances**, [S. l.], v. 5, 2015. DOI: [10.1039/C5RA14470A](https://doi.org/10.1039/C5RA14470A).

SEVINÇ, Pelin; GÜNDÜZ, Ufuk; EROGLU, Inci; YÜCEL, Meral. Kinetic analysis of photosynthetic growth, hydrogen production and dual substrate utilization by Rhodobacter capsulatus. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.], v. 37, n. 21, p. 16430–16436, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.02.176>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319912005411>.

- SHOW, K. Y.; LEE, D. J.; TAY, J. H.; LIN, C. Y.; CHANG, J. S. Biohydrogen production: Current perspectives and the way forward. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.J, v. 37, n. 20, p. 15616–15631, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.109>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319912010026>.
- SILVA, Felipe Thales Moreira; MOREIRA, Luiza Rojas; DE SOUZA FERREIRA, Juliana; BATISTA, Fabiana Regina Xavier; CARDOSO, Vicelma Luiz. Replacement of sugars to hydrogen production by Rhodobacter capsulatus using dark fermentation effluent as substrate. **Bioresource Technology**, [S. l.J, v. 200, p. 72–80, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.002>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852415013863>.
- SILVA, Felipe Thalles Moreira. **Produção de biohidrogênio por Rhodobacter capsulatus utilizando como substrato o efluente da fermentação escura**. 2015. Universidade Federal de Uberlândia, [S. l.J, 2015. DOI: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/15246>.
- SINGH, Vaishali; SINGH, Harshita; DAS, Debabrata. Optimization of the medium composition for the improvement of hydrogen and butanol production using Clostridium saccharoperbutylacetonicum DSM 14923. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.J, v. 44, n. 49, p. 26905–26919, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.08.125>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319919331398>.
- SKONIECZNY, Monika T.; YARGEAU, Viviane. Biohydrogen production from wastewater by Clostridium beijerinckii: Effect of pH and substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.J, v. 34, n. 8, p. 3288–3294, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.01.044>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319909001177>.
- SUN, Lili; HUANG, Aiyou; GU, Wenhui; MA, Yingchao; ZHU, Daling; WANG, Guangce. Hydrogen production by Enterobacter cloacae isolated from sugar refinery sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.J, v. 40, n. 3, p. 1402–1407, 2015. DOI: [10.1016/j.ijhydene.2014.11.121](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.11.121). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360319914032558>.
- SUWANSAARD, Maneewan; CHOORIT, Wanna; ZEILSTRA-RYALLS, Jill H.; PRASERTSAN, Poonsuk. Phototropic H₂ production by a newly isolated strain of Rhodopseudomonas palustris. **Biotechnology Letters**, [S. l.J, v. 32, n. 11, p. 1667–1671, 2010. DOI: [10.1007/s10529-010-0345-2](https://doi.org/10.1007/s10529-010-0345-2). Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-010-0345-2>.
- SYDNEY, Eduardo Bittencourt; LARROCHE, Christian; NOVAK, Alessandra Cristine; NOUAILLE, Regis; SARMA, Saurabh Jyoti; BRAR, Satinder Kaur; LETTI, Luiz Alberto Junior; SOCCOL, Vanete Thomaz; SOCCOL, Carlos Ricardo. Economic process to produce biohydrogen and volatile fatty acids by a mixed culture using vinasse from sugarcane ethanol industry as nutrient source. **Bioresource Technology**, [S. l.J, v. 159, p. 380–386, 2014. DOI: [10.1016/j.biortech.2014.02.042](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.042). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852414002132>.
- TAI, Jung; ADAV, Sunil S.; SU, Ay; LEE, Duu-Jong. Biological hydrogen production from phenol-containing wastewater using Clostridium butyricum. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.J, v. 35, n. 24, p. 13345–13349, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.11.111>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852414002132>.

[http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319909019442.](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319909019442)

TIAN, Xin; LIAO, Qiang; ZHU, Xun; WANG, Yongzhong; ZHANG, Pan; LI, Jun; WANG, Hong. Characteristics of a biofilm photobioreactor as applied to photo-hydrogen production. **Bioresource Technology**, [S. l.J, v. 101, n. 3, p. 977–983, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.007>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852409011833>.

TORRES DE SOUZA, Isadora; MOREIRA, Felipe Santos; DE SOUZA FERREIRA, Juliana; CARDOSO, Vicelma Luiz; BATISTA, Fabiana Regina Xavier. Technological advances in hydrogen production by Enterobacter bacteria upon substrate, luminosity and anaerobic conditions. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.J, v. 44, n. 31, p. 16190–16198, 2019. DOI: [10.1016/j.ijhydene.2019.05.036](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.05.036). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S036031991931866X>.

VENETSANEAS, Nikolaos; ANTONOPOULOU, Georgia; STAMATELATOУ, Katerina; KORNAROS, Michael; LYBERATOS, Gerasimos. Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. **Bioresource Technology**, [S. l.J, v. 100, n. 15, p. 3713–3717, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.025>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852409000492>.

WANG, Jianlong; WAN, Wei. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.J, v. 34, n. 2, p. 799–811, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.015>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319908015073>.

WANG, Wen; XIE, Li; LUO, Gang; ZHOU, Qi; LU, Qin. Optimization of biohydrogen and methane recovery within a cassava ethanol wastewater/waste integrated management system. **Bioresource Technology**, [S. l.J, v. 120, p. 165–172, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.048>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412009522>.

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

WILLQUIST, Karin; ZEIDAN, Ahmad A.; VAN NIEL, Ed WJ. Physiological characteristics of the extreme thermophile Caldicellulosiruptor saccharolyticus: an efficient hydrogen cell factory. **Microbial Cell Factories**, [S. l.J, v. 9, n. 1, p. 89, 2010. DOI: [10.1186/1475-2859-9-89](https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-89). Disponível em: <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-9-89>.

YOSHINO, Fuminori; IKEDA, Hiroshi; MASUKAWA, Hajime; SAKURAI, Hidehiro. High Photobiological Hydrogen Production Activity of a Nostoc sp. PCC 7422 Uptake Hydrogenase-Deficient Mutant with High Nitrogenase Activity. **Marine Biotechnology**, [S. l.J, v. 9, n. 1, p. 101–112, 2007. DOI: [10.1007/s10126-006-6035-3](https://doi.org/10.1007/s10126-006-6035-3). Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10126-006-6035-3>.

YOU, Shengping; CHANG, Hongxing; YIN, Qingdian; QI, Wei; WANG, Mengfan; SU, Rongxin; HE, Zhimin. Utilization of whey powder as substrate for low-cost preparation of β-galactosidase as main product, and ethanol as by-product, by a litre-scale integrated process.

Bioresource Technology, [S. l.J, v. 245, p. 1271–1276, 2017. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.08.092. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852417313974>.

ZAGRODNIK, R.; ŁANIECKI, M. The effect of pH on cooperation between dark- and photofermentative bacteria in a co-culture process for hydrogen production from starch. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.J, v. 42, n. 5, p. 2878–2888, 2017. a. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.12.150>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319917300162>.

ZAGRODNIK, R.; ŁANIECKI, M. Hydrogen production from starch by co-culture of Clostridium acetobutylicum and Rhodobacter sphaeroides in one step hybrid dark- and photofermentation in repeated fed-batch reactor. **Bioresource Technology**, [S. l.J, v. 224, p. 298–306, 2017. b. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.060>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852416314663>.

ZHANG, Chong; LV, Feng-Xiang; XING, Xin-Hui. Bioengineering of the Enterobacter aerogenes strain for biohydrogen production. **Bioresource Technology**, [S. l.J, v. 102, n. 18, p. 8344–8349, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.018>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852411008212>.

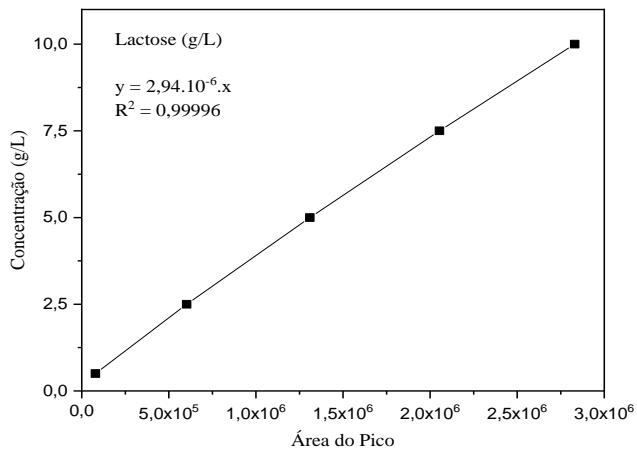
ZHU, Zhinan; SHI, Jiping; ZHOU, Zhihua; HU, Fengxian; BAO, Jie. Photo-fermentation of Rhodobacter sphaeroides for hydrogen production using lignocellulose-derived organic acids. **Process Biochemistry**, [S. l.J, v. 45, n. 12, p. 1894–1898, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.017>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511310003284>.

ZINATIZADEH, Ali Akbar; MIRGHORAYSHI, Mahsa; BIRGANI, Payam Moradi; MOHAMMADI, Parviz; IBRAHIM, Shaliza. Influence of thermal and chemical pretreatment on structural stability of granular sludge for high-rate hydrogen production in an UASB bioreactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, [S. l.J, v. 42, n. 32, p. 20512–20519, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.07.029>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319917327180>.

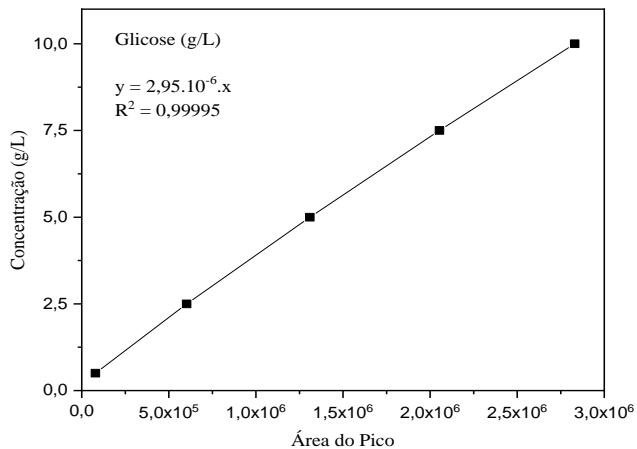
CAPÍTULO 8

APÊNDICE A

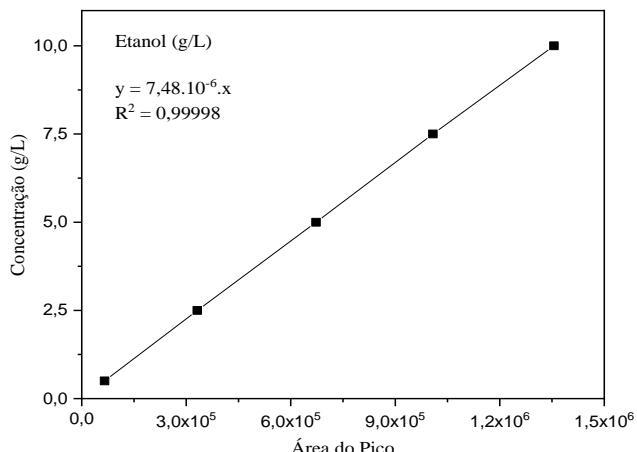
A.1 - Curva de calibração para concentração de lactose.



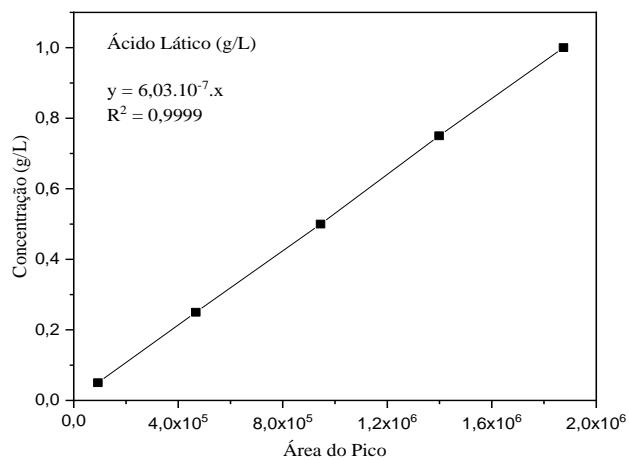
A.2 - Curva de calibração para concentração de glicose.



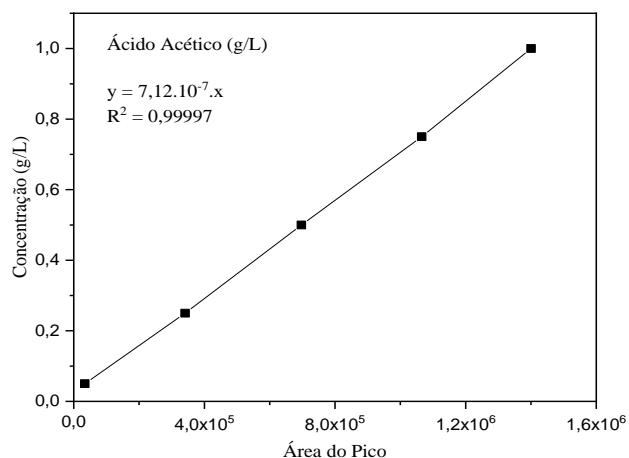
A.3 - Curva de calibração para concentração de etanol.



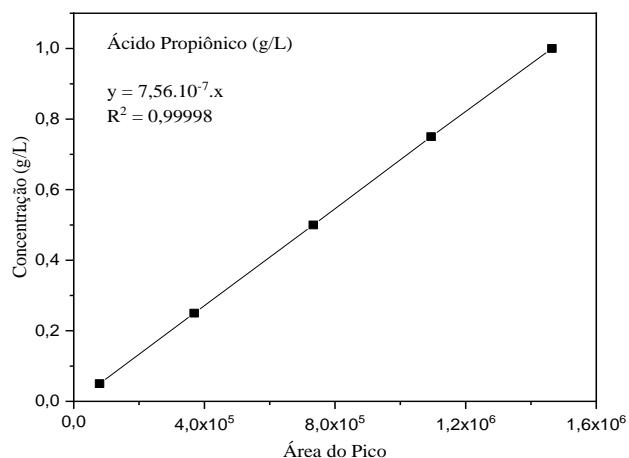
A.4 - Curva de calibração para concentração de ácido láctico.



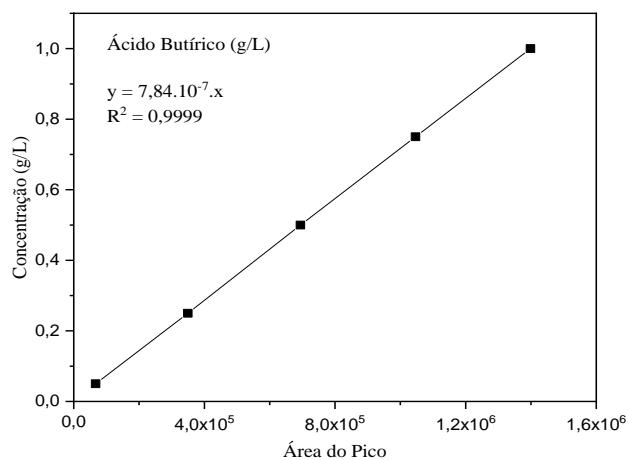
A.5 - Curva de calibração para concentração de ácido acético.



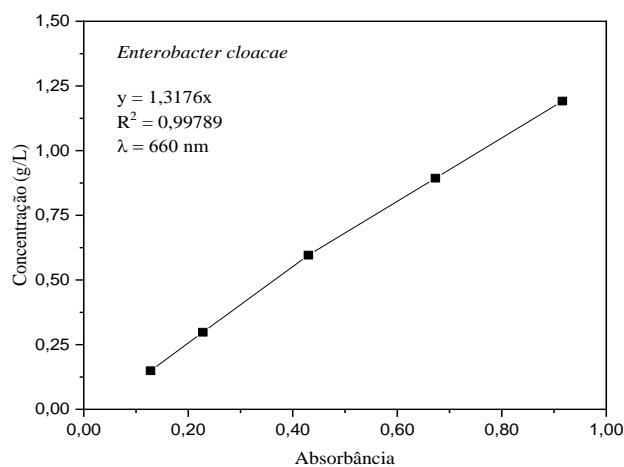
A.6 - Curva de calibração para concentração de ácido propiônico.



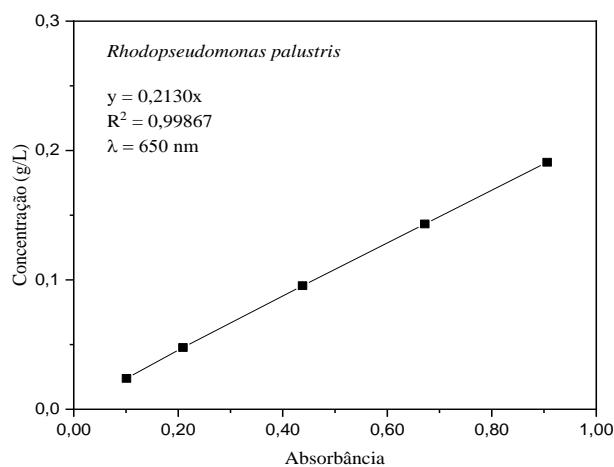
A.7 - Curva de calibração para concentração de ácido butírico.

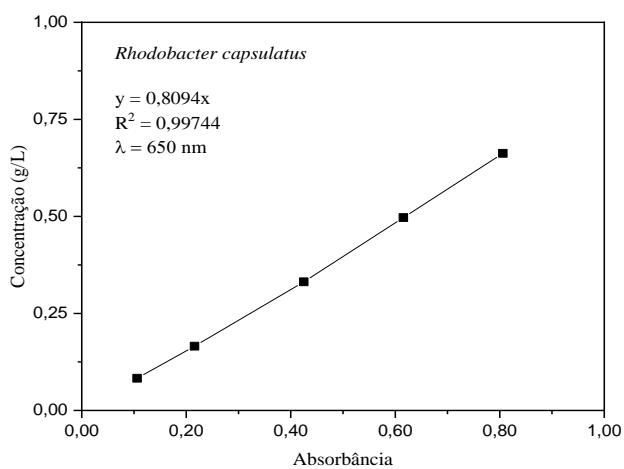


A.8 - Curva de calibração para concentração de *Enterobacter cloacae*.



A.9 - Curva de calibração para concentração de *Rhodopseudomonas palustris*.



A.10 - Curva de calibração para concentração de *Rhodobacter capsulatus*.**A.11 - Curva de calibração para concentração de co-cultura.**