

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

MARINA CRISTINA TOMASINI

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E METANO A PARTIR DE VINHAÇA E
HEMICELULOSE DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR: processos individuais e
integrados para o aproveitamento biotecnológico de subprodutos da indústria sucroalcooleira

RIO DE JANEIRO

2025

Marina Cristina Tomasini

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E METANO A PARTIR DE VINHAÇA E
HEMICELULOSE DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR: processos individuais e
integrados para o aproveitamento biotecnológico de subprodutos da indústria sucroalcooleira

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de
Química, Universidade Federal do Rio de
Janeiro, como requisito parcial à obtenção do
título de Doutora em Ciências.

Orientadora: D. Sc. Viridiana Santana Ferreira-Leitão

Coorientador: D. Sc. Ricardo Sposina Sobral Teixeira

Rio de Janeiro

2025

CIP - Catalogação na Publicação

T655p Tomasini, Marina Cristina
PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E METANO A PARTIR DE
VINHAÇA E HEMICELULOSE DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR:
processos individuais e integrados para o
aproveitamento biotecnológico de subprodutos da
indústria sucroalcooleira / Marina Cristina
Tomasini. -- Rio de Janeiro, 2025.
168 f.

Orientador: Viridiana Santana Ferreira-Leitão.
Coorientador: Ricardo Sposina Sobral Teixeira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio
de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós
Graduação em Bioquímica, 2025.

1. Vinhaça. 2. Pentoses. 3. Cofermentação. 4.
Hidrogenio. 5. Metano. I. Santana Ferreira-Leitão,
Viridiana, orient. II. Sposina Sobral Teixeira,
Ricardo, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

Marina Cristina Tomasini

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E METANO A PARTIR DE VINHAÇA E
HEMICELULOSE DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR: processos individuais e
integrados para o aproveitamento biotecnológico de subprodutos da indústria sucroalcooleira

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de
Química, Universidade Federal do Rio de
Janeiro, como requisito parcial à obtenção do
título de Doutora em Ciências.

31 de outubro de 2025

Dra. Viridiana Santana Ferreira-Leitão - INT

Prof. Dr. Marcos Dias Pereira - UFRJ

Pra. Dra. Bruna Soares Fernandes - UNESP

Prof. Dr. Lucas Tadeu Fuess - USP

Pra. Dra. Sarita Cândida Rabelo - UNESP

*Dedico àqueles que são minha origem, minha família,
pela base sólida de amor e encorajamento que tornou
possível esta realização.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Viridiana Santana Ferreira-Leitão, pela confiança, pela liberdade intelectual e pela parceria generosa na construção deste trabalho. É um privilégio trilhar minha trajetória científica e profissional ao seu lado, aprendendo com seu exemplo de excelência, ética e paixão pela pesquisa. Minha sincera admiração e gratidão por ser uma fonte constante de inspiração.

À Profa. Dra. Ayla Sant'Ana da Silva, pelos ensinamentos, contribuições e olhar atento que tanto contribuíram para o meu crescimento científico e pessoal.

Ao Dr. Ronaldo Rodrigues, pela parceria e apoio durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, Zélia Saltarelli e José Tomasini, ao meu padrasto Nilton Velho de Cristo, ao meu irmão Luis Paulo, à Amanda, ao meu sobrinho Caetano, por todo amor e incentivo para seguir meus sonhos.

Aos meus professores do PPGBq, que admiro profundamente, agradeço especialmente a Anderson de Sá Pinheiro (*in memoriam*), Cris Ano Bom, Denise Freire, Elisa Cavalcanti, Fábio Nogueira, Lucia Paiva e Ricardo Sposina pelo apoio, ensinamentos e inspiração ao longo desta jornada.

Às minhas grandes amigas de vida e de ciência, Mariana Faber, Raquel Lopes e Roberta Espinheira, por todas as conversas, pelo acolhimento e pela amizade que tornaram esta caminhada mais significativa. Vocês foram fundamentais nesses anos de muitas mudanças e transformações. Aos amigos de sala e de laboratório, Alvaro Monteiro, Mariana Mattos, Gabriel Haguihara, Gabriel Martins, Caroline Ribeiro e William Monteiro, pela colaboração, carinho e pelas boas risadas (e cervejinhas).

A todos do Labic, Carolina Reis, Daniel Fasheun, Davi Marconi, Ingrid Míguez, Gabriel Santos, Nadinne Assis, Pedro e alunos de iniciação científica, Victória Gavazza, Franciny Pires, Lucas da Silva, Arianne, Isabelle, Victória, Maiza, Vitória que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho.

À família que a vida me deu, Samanta Toledo, Luiz Thomas, Marcos Giro, Rafael Souza e Bruna Maluhy, e à minha terapeuta Nayara Tobias, pelo apoio e acolhimento em todos os momentos.

Ao INT pela infraestrutura disponibilizada, à equipe de limpeza pelo trabalho essencial e dedicado, que garante um ambiente sempre organizado e acolhedor.

Aos órgãos de fomento à pesquisa FAPERJ, CAPES, CNPq, GALP, ANP e EMBRAPPI pelo apoio e investimento no desenvolvimento deste trabalho.

O conhecimento compartilhado é ferramenta de libertação.

RESUMO

A cana-de-açúcar desempenha papel estratégico na economia brasileira, sendo a principal matéria-prima para açúcar e etanol. Na safra 2025/26, o Brasil consolida-se como maior produtor mundial, com estimativa de 669 milhões de toneladas de cana e cerca de 27 bilhões de litros de etanol. A produção desse biocombustível gera grandes volumes de efluentes, como a vinhaça (10 a 15 L por litro de etanol) e, paralelamente, cerca de 140 kg de palha por tonelada de cana colhida. Atualmente, a vinhaça destina-se à fertirrigação e a palha ao manejo do solo no pós-colheita. A vinhaça, rica em matéria orgânica e minerais quando utilizada de forma contínua e sem manejo adequado na fertirrigação, pode causar poluição do solo e das águas subterrâneas. Já a palha da cana, um resíduo lignocelulósico, ainda representa desafios: o acúmulo deste material no campo e seu potencial energético é subaproveitado. Embora contenha cerca de um terço dos carboidratos estruturais da cana, parte desses açúcares, especialmente as pentoses da hemicelulose, só é convertida em etanol de segunda geração por microrganismos geneticamente modificados, o que torna o processo economicamente desafiador e ainda pouco competitivo em relação ao etanol de primeira geração. Nesse contexto, a elevada DQO da vinhaça e os carboidratos da palha despontam como fontes estratégicas para a produção de hidrogênio (H_2) e metano (CH_4) via fermentação e digestão anaeróbia, possibilitando simultaneamente o tratamento de resíduos e a geração de bioenergia. Este estudo teve como objetivo produzir H_2 a partir da vinhaça e do hidrolisado hemicelulósico (HH) da palha, em mono-fermentação e em cofermentação, além de gerar CH_4 de forma sequencial a partir dos efluentes das fermentações. Lodo anaeróbio de estação de tratamento de esgoto foi utilizado como inóculo. Sistemas selados ou com liberação de gás foram utilizados para entender os efeitos da pressão parcial de hidrogênio na etapa de fermentação. A produção de H_2 a partir da vinhaça (25 g_{DQO}/L) atingiu 246 NmL/L em 48 horas, sob condição termofílica (50 °C), pH 5,5, utilizando reator acoplado a manômetro e válvula de liberação de gás, evitando que a pressão excedesse 0,6 bar. A pressão parcial não foi um fator dominante na inibição da produção de H_2 , pois o estudo comparativo com frasco selado não apresentou diferenças significativas em relação ao reator com controle de pressão, indicando que, nas condições estudadas, a complexidade do processo está mais associada às características do efluente. Nas fermentações com hidrolisado hemicelulósico, foram avaliadas concentrações de 1, 5 e 10 g/L de carboidratos em reatores selados, nas mesmas condições de pH e temperatura aplicadas à vinhaça. O desvio de rota, principalmente para a via homoacetogênica, foi observado devido à concentração de gás no sistema, que favoreceu a ativação dessa via. Em concentrações mais elevadas, como 10 g/L , a fermentação realizada em reator manométrico com liberação de gás atingiu 1108 NmL/L em 24 horas, um valor 82% superior ao obtido no sistema selado. A cofermentação da vinhaça e do hidrolisado melhorou a adaptação microbiana ao meio com vinhaça, resultando no aumento de 58% de H_2 em comparação à fermentação apenas com vinhaça, atingindo 387 NmL/L de H_2 , com relação C/N 24. Neste estudo foi evidenciado que os carboidratos do hidrolisado auxiliaram na digestibilidade da vinhaça pelos microrganismos. A produção sequencial de CH_4 a partir do efluente da cofermentação gerou 4529 NmL/L (343 NmL/g_{DQO}); o efluente da mono-fermentação da vinhaça alcançou 3618 NmL/L (386 NmL/g_{DQO}), frente a 2628 NmL/L (185 NmL/g_{DQO}) obtidos na digestão direta da vinhaça *in natura*. Já a digestão em dois estágios do efluente do hidrolisado elevou a produção de CH_4 em cerca de cinco vezes (1259 NmL/L ; 190 NmL/g_{DQO}), comparada à digestão em um estágio (253 NmL/L ; 20 NmL/g_{DQO}). A separação da digestão anaeróbia em dois estágios permitiu o pré-tratamento da matéria-prima para a etapa metanogênica, resultando em maiores ganhos na produção e concentração de CH_4 no biogás. Este estudo destaca os benefícios da cofermentação e da digestão em dois estágios para a integração da bioenergia em biorrefinarias de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: vinhaça, pentoses, cofermentação, hidrogênio, metano, biogás.

ABSTRACT

Sugarcane plays a strategic role in the Brazilian economy, serving as the primary raw material for sugar and ethanol production. In the 2025/26 harvest, Brazil consolidated its position as the world's largest producer, producing 669 million tons of sugarcane and approximately 27 billion liters of ethanol. Ethanol production generates significant volumes of effluents, such as vinasse, with about 10 to 15 liters produced per liter of distilled ethanol. Additionally, sugarcane harvesting and processing generate around 140 kg of straw per ton of harvested cane. Currently, the main uses of these byproducts are fertigation for vinasse, while sugarcane straw is used for soil management after harvest. Vinasse, a material rich in organic load (COD) and minerals, can lead to soil and groundwater pollution when applied continuously and without proper management. Given the large volumes produced, sustainable management strategies are essential. Sugarcane straw, a lignocellulosic residue, also presents challenges: its accumulation in the field and its energy potential remain underutilized. Although it contains one-third of the structural carbohydrates of sugarcane, part of these sugars, particularly hemicellulosic pentoses from the hemicellulosic fraction, can only be converted into second-generation ethanol by genetically modified microorganisms, making the process economically challenging and still less competitive than first-generation ethanol. In this context, the high COD of vinasse and the carbohydrates from straw hemicellulose emerge as strategic substrates for hydrogen (H_2) and methane (CH_4) production through fermentation and anaerobic digestion, providing both waste treatment and bioenergy generation. This study aimed to produce H_2 from vinasse and hemicellulose hydrolysate (HH) of sugarcane straw, both individually and through co-fermentation, and to sequentially generate CH_4 from the fermentation effluents. Anaerobic sludge from a wastewater treatment plant was used as inoculum. Both sealed systems and gas-releasing systems were evaluated to assess the effects of partial pressure. Hydrogen production from vinasse (25 g_{COD}/L) reached 245.86 NmL/L within 48 hours under thermophilic conditions (50 °C, pH 5.5) using a manometric reactor equipped with a gas release valve to prevent pressure from exceeding 0.6 bar. Partial pressure was not a dominant inhibitory factor for H_2 production, as comparison with sealed reactors revealed no significant differences, indicating that the complexity of the process is more closely associated with the characteristics of the effluent. Fermentation with hemicellulose hydrolysate was evaluated for carbohydrate concentrations of 1, 5, and 10 g/L in sealed reactors under the same pH and temperature conditions. Pathway shifts, primarily towards the homoacetogenic pathway, were observed due to gas accumulation, which favored its activation. At higher concentrations, such as 10 g/L, fermentation using a manometric reactor with gas release achieved 1107.97 NmL/L in 24 hours, an 82% increase compared to the sealed system. Co-fermentation of vinasse and hydrolysate improved microbial adaptation to the medium, resulting in a 58% increase in H_2 production compared to vinasse mono-fermentation, reaching 386.60 NmL/L of H_2 with a C/N ratio of 24. This study demonstrated that carbohydrates from the hydrolysate enhanced the digestibility of vinasse by microorganisms. Sequential CH_4 production from the co-fermentation effluent reached 4529 NmL/L (343 NmL/g_{COD}), while the effluent from single-stage vinasse fermentation achieved 3618 NmL/L (386 NmL/g_{COD}), compared to 2628 NmL/L (185 NmL/g_{COD}) obtained from the direct digestion of raw vinasse. Two-stage digestion of the hydrolysate effluent increased CH_4 production approximately five-fold (1259.37 NmL/L; 190 NmL/g_{COD}) compared to single-stage digestion (253.40 NmL/L; 20 NmL/g_{COD}). The separation of anaerobic digestion into two stages allowed for substrate pretreatment for the methanogenesis, resulting in greater CH_4 production and concentrations in the biogas. Overall, this study highlights the benefits of co-fermentation and two-stage digestion for enhancing bioenergy integration within sugarcane biorefineries.

Key-words: Vinasse, pentoses, co-fermentation, hydrogen, methane, biogas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo das rotas de aproveitamento da cana-de-açúcar, resíduos e efluente em biorrefinarias de cana-de-açúcar de primeira e segunda geração.	21
Figura 2 – Etapas do manejo e utilização da vinhaça na agricultura. (A) Vista aérea de áreas agrícolas destinadas ao cultivo de cana-de-açúcar, principais consumidoras da vinhaça para fertirrigação; (B) Lagoa de armazenamento de vinhaça em usina sucroenergética; (C) Ponto de coleta da vinhaça para ser distribuída; (D) Carregamento de vinhaça em caminhão-tanque adaptado que será destinado às plantações de cana-de-açúcar para ser utilizada na fertirrigação.	23
Figura 3 – Palha de cana-de-açúcar; (A) Ilustração da cana-de-açúcar demonstrando suas partes divididas em palha (ponteiro, folhas verdes e folhas secas) e colmo. (B) Palha de cana-de-açúcar moída	27
Figura 4 – Representação esquemática de um tecido vegetal de monocotiledônea, destacando a parede celular das células, composta por lignina, celulose e hemicelulose. Entre os diferentes tipos de hemicelulose presentes, a glucoroarabinoxilana representa a da palha de cana-de-açúcar.....	31
Figura 5 - Usos biotecnológicos da xilose, principal açúcar da fração hemicelulósica, e microrganismos associados às diferentes rotas de conversão. (*) Microrganismos geneticamente modificados.	34
Figura 6 - Poder calorífico dos compostos comumente utilizados como combustível.	36
Figura 7 - Classificação do hidrogênio em diferentes categorias de cores — preto, marrom, cinza, azul, azul turquesa, verde, verde musgo, rosa e branco — de acordo com o método de produção utilizado.	38
Figura 8 - Representação dos conceitos relacionados aos Níveis de Maturidade Tecnológica (Technology Readiness Levels – TRLs) (A). Panorama das pesquisas em hidrogênio verde no Brasil, com indicação dos respectivos TRLs alcançados para cada tecnologia (B).	40
Figura 9 - Principais rotas metabólicas em um consórcio microbiano durante a fermentação de substratos, incluindo carboidratos e ácidos graxos.....	42
Figura 10 – Etapas da digestão anaeróbia e indicação do pré-tratamento do inóculo para a separação das fases fermentativa e metanogênica do processo.	49
Figura 11 - Evolução do número de plantas de biogás e da capacidade de produção acumulada (Nm ³ /ano) entre 2014 e 2022. O gráfico mostra o crescimento do número total de plantas (barras roxas), o número de novas plantas instaladas a cada ano (barras verdes) e a capacidade	

acumulada de produção de biogás (linha vermelha), indicando a expansão contínua do setor ao longo do período.....	53
Figura 12 - Participação das fontes renováveis e não renováveis na matriz energética brasileira em 2023. Os gráficos mostram a distribuição percentual das fontes renováveis (como biomassa de cana, hidráulica, eólica e solar) e das fontes não renováveis (como petróleo e derivados, gás natural e carvão mineral), indicando que 49% da matriz energética é composta por fontes renováveis, enquanto 51% é proveniente de fontes não renováveis.	65
Figura 13 - Diagrama de blocos simplificado das etapas dos experimentos do estudo.....	70
Figura 14 - Reator selado utilizado para os ensaio de fermentação (A); Manômetro utilizado para medir a pressão dos reatores selados ao final dos experimentos (B).....	75
Figura 15 – Reator com manômetro acoplado e válvula para a liberação de gás utilizado neste trabalho	76
Figura 16 – Representação dos sólidos presentes na vinhaça	80
Figura 17 - Composição química do lote único de palha de cana-de-açúcar, gentilmente fornecida pela empresa GranBio, e caracterizada conforme os protocolos “Determination of Extractives in Biomass” (Sluiter <i>et al.</i> , 2005) e “Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass” (Sluiter <i>et al.</i> , 2012).	83
Figura 18 – Composição percentual da vinhaça em termos de DQO na vinhaça <i>in natura</i> e pontos iniciais das fermentações apresentadas na Tabela 7. (VI) = Vinhaça.....	89
Figura 19 - Produção de hidrogênio a partir da vinhaça (25 g DQO/L) a 50 °C e pH 5,5 usando dois tipos de reatores: (A) reator selado (a pressão foi medida exclusivamente ao final de cada hora de incubação) e (B) reator manométrico (pressão avaliada durante a fermentação), denominado como experimento VII. A concentração do substrato e dos metabólitos é apresentada em barras, enquanto a produção experimental de H ₂ e CO ₂ , em volume específico, é representada por marcadores, bem como a pressão interna do sistema. Parâmetros estimados pela modelagem dos dados experimentais de produção de H ₂ pela equação de Gompertz: (A) 153,76 NmL/L (Hmax); 132,87 mL/L.h (Rm); 15 h (λ); 0,84 (R ²); (B) 203,74 NmL/L (Hmax); 37,92 mL/L.h (Rm); 18 h (λ); 0,91 (R ²);	94
Figura 20 - Produção de hidrogênio usando hidrolisado de hemicelulose nas concentrações iniciais de carboidrato 1g/L = pHH1 (A), 5g/L = pHH5 (B) e 10 g/L = pHH10 (C) a 50 °C e pH 5,5, em reatores selados sem alívio de pressão. A pressão foi medida exclusivamente ao final de cada hora de incubação. A concentração do substrato e dos metabólitos é apresentada em barras, enquanto a produção experimental de H ₂ e CO ₂ , em volume específico, é representada por marcadores, bem como a pressão interna do sistema. Parâmetros estimados pela modelagem	

dos dados experimentais de produção de H_2 pela equação de Gompertz: $HH1 = 316,25 \text{ NmL/L}$ (H_{max}); $25,89 \text{ mL/L.h}$ (R_m); 7 h (λ); $0,84$ (R^2); $HH5 = 833,94 \text{ NmL/L}$ ($H_{\text{máx}}$); 44 mL/L.h (R_m); 7 h (λ); $0,96$ (R^2); $HH10 = 706,88$ ($H_{\text{máx}}$); $49,34 \text{ mL/L.h}$ (R_m); 9 h (λ); $0,99$ (R^2). ...99

Figura 21 – Correlação entre o hidrogênio produzido (barras pretas) e hidrogênio consumido pela homoacetogênese (barras brancas) de acordo com a equação 8 (Zhao *et al.*, 2022) nas concentrações iniciais de carboidrato $1 \text{ g/L} = pHH1$ (A), $5 \text{ g/L} = pHH5$ (B) e $10 \text{ g/L} = pHH10$ (C) a 50°C e $\text{pH } 5,5$, em reatores selados sem alívio de pressão. A pressão foi medida exclusivamente ao final de cada hora de incubação. 103

Figura 22 - Produção de hidrogênio usando hidrolisado de hemicelulose nas concentrações iniciais de carboidrato $10 \text{ g/L} = HH10$ (A) e $20 \text{ g/L} = HH20$ a 50°C e $\text{pH } 5,5$, em reatores manométricos com liberação de gás. A pressão foi medida e liberada durante o experimento em cada hora de análise, garantindo que não excedesse $0,6 \text{ bar}$. A concentração do substrato e dos metabólitos é apresentada em barras, enquanto a produção experimental de H_2 e CO_2 , em volume específico, é representada por marcadores, bem como a pressão interna do sistema. Parâmetros estimados pela modelagem dos dados experimentais de produção de H_2 pela equação de Gompertz: $HH10P = 1123,18 \text{ NmL/L}$ (H_{max}); $86,03 \text{ mL/L.h}$ (R_m); 10 h (λ); $0,97$ (R^2); $HH20P = 526,88 \text{ NmL/L}$ ($H_{\text{máx}}$); $57,04 \text{ mL/L.h}$ (R_m); 12 h (λ); $0,96$ (R^2); $HH10 = 706,88$ ($H_{\text{máx}}$); $49,34 \text{ mL/L.h}$ (R_m); 9 h (λ); $0,79$ (R^2). 108

Figura 23 Cofermentação vinhaça (VI) e hidrolisado hemicelulósico (HH) a 50°C e $\text{pH } 5,5$, em reatores manométricos com liberação de gás em relações: $\text{C/N } 24 = \text{VHI1}$ (A); $\text{C/N } 36 = \text{VHI2}$; $\text{C/N } 52 = \text{VH3}$. A pressão foi medida e liberada durante o experimento em cada hora de análise, garantindo que não excedesse $0,6 \text{ bar}$. A concentração do substrato e dos metabólitos é apresentada em barras, enquanto a produção experimental de H_2 e CO_2 , em volume específico, é representada por marcadores, bem como a pressão interna do sistema. 115

Figura 24 - Produção de metano usando o efluente da fermentação da vinhaça (EPH-VI1) usando reator manométrico, DQO experimental de $10,57 \text{ g/L}$; 35°C ; $\text{pH } 7$. A pressão foi medida durante o período incubação. A concentração do substrato e dos metabólitos é apresentada em barras, enquanto a produção experimental de CH_4 e CO_2 , em volume específico, é representada por marcadores, bem como a DQO do sistema. Parâmetros estimados pela modelagem dos dados experimentais de produção de CH_4 pela equação de Gompertz: $3722,71 \text{ NmL/L}$ ($H_{\text{máx}}$); $151,58 \text{ mL/L.h}$ (R_m); 1 d (λ); $0,89$ (R^2). 119

Figura 25 - Produção de metano usando a vinhaça *in natura* (VI1), DQO total de 25 g/L e DQO experimental de $17,5$ (A); DQO total 15 g/L e DQO experimental de $9,85$ (B); 35°C ; $\text{pH } 7$ em reatores manométricos com liberação de gás. A pressão foi medida durante o período

incubação. A concentração do substrato e dos metabólitos é apresentada em barras, enquanto a produção experimental de CH₄ e CO₂, em volume específico, é representada por marcadores, bem como a DQO do sistema. Parâmetros estimados pela modelagem dos dados experimentais de produção de CH₄ pela equação de Gompertz: (A) 2914.45 NmL/L (Hmax); 69.05 mL/L.h (Rm); 4 d (λ); 0.83 (R²); (B) 1618.89 NmL/L (Hmax); 84.72 mL/L.h (Rm); 1 d (λ); 0.99 (R²).

..... 121

Figura 26 - Produção de metano usando o efluente da fermentação com hidrolisado (HH10) em DQO experimental 7,76 g/L em processo sequencial (A); produção de metano em um estágio com hidrolisadohemiceuósico com 10 g/L de carboidratos (HH10) e DQO experimental de 11,74 g/L (B); 35 °C; pH 7, em reatores manométricos com liberação de gás. A pressão foi medida durante o período incubação. A concentração dos substratos e dos metabólitos é apresentada em barras, enquanto a produção experimental de CH₄ e CO₂, em volume específico, é representada por marcadores, bem como a DQO do sistema. Parâmetros estimados pela modelagem dos dados experimentais de produção de H₂ pela equação de Gompertz: 1192,08 NmL/L (Hmax); 114,57 mL/L.d (Rm); 3 d (λ); 0,90 (R²). (B) DQO experimental de 11,74 gDQO/L; 35 °C; pH 7. Parâmetros estimados pela modelagem dos dados experimentais de produção de H₂ pela equação de Gompertz: 216,25 NmL/L (Hmax); 10,06 mL/L.d (Rm); 4 d (λ); 0,99 (R²).

..... 124

Figura 27 - Produção de metano usando o efluente da fermentação com vinhaça e hidrolisado (EPH-VH1) em DQO experimental 17,87 g/L em processo sequencial; 35 °C; pH 7, em reatores manométricos com liberação de gás. A pressão foi medida durante o período de incubação. A concentração dos substratos e dos metabólitos é apresentada em barras, enquanto a produção experimental de CH₄ e CO₂, em volume específico, é representada por marcadores, bem como a DQO do sistema. Parâmetros estimados pela modelagem dos dados experimentais de produção de H₂ pela equação de Gompertz: 4447,18 NmL/L (Hmax); 210,58 mL/L.d (Rm); 7 d (λ); 0,99 (R²).

..... 127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação da composição físico-química de vinhaças provenientes de melaço, usina anexa e usina autônoma encontrados na literatura	23
Tabela 2 – Principais reações químicas envolvidas nas etapas de acidogênese, acetogênese, homoacetogênese, solventogênese e metanogênese durante a digestão anaeróbia. A etapa fermentativa corresponde ao processo de acidogênese. ΔG° (kJ) corresponde a variação da energia livre de Gibbs padrão (25 °C e 1 atm) de uma reação química.	44
Tabela 3 - Resultados comparativos de estudos que identificam as relações carbono/nitrogenio em seus trabalhos com produção de hidrogênio utilizando resíduos agroindustriais ou meios sintéticos	62
Tabela 4 - Composição do meio de fermentação em reatores manométricos com liberação de gás utilizando vinhaça de cana-de-açúcar e hidrolisado de hemicelulose (HH) da palha de cana	77
Tabela 5 - Caracterização da vinhaça de cana-de-açúcar usada como matéria-prima neste estudo	81
Tabela 6 - Caracterização do hidrolisado hemicelulósico da palha de cana-de-açúcar obtido após pré-tratamento com ácido diluído ($H_2SO_4 = 2,9 \%$ (m/v)) na proporção 1:4 (palha:ácido); 130°C por 30 min).	84
Tabela 7 - Produção de H_2 utilizando vinhaça (15 g_{DQO}/L), cujas concentrações de matéria orgânica inicial das fermentações foram medidas por meio da DQO do meio centrifugado, pH e temperatura inicial das fermentações, degradação do substrato e metabólitos produzidos em reatores selados sem alívio de pressão. A pressão foi medida exclusivamente ao final de cada período de incubação e não excedeu 0,6 bar. A produção máxima de H_2 aconteceu no sistema denominado pVI	86
Tabela 8 - Estudos comparativos na produção de H_2 utilizando vinhaça como matéria-prima por fermentação em modo batelada e pH 5,5.	96
Tabela 9 - Estudos comparativos na produção de hidrogênio usando frações de hemicelulose de palhas de cana-de-açúcar e arroz em batelada.	110
Tabela 10 - Resultados comparativos da cofermentação (HV) com hidrolisado hemicelulósico e vinhaça; mono-fermentação da vinhaça (VI) e do hidrolisado hemicelulósico (HH) para produção de hidrogênio	113
Tabela 11 – Estudos comparativos de cofermentações de resíduos e efluentes agroindustriais, utilizando lodo anaeróbio como inóculo em condição termofílica de 55°C	117

Tabela 12 - Estudos comparativos de digestão anaeróbica em um e dois estágios utilizando resíduos agroindustriais.	129
Tabela 13. Comparação dos principais parâmetros avaliados neste estudo para a produção de hidrogênio e metano a partir de vinhaça, hidrolisado hemicelulósico de palha e da cofermentação de ambos. São apresentados a redução da carga orgânica (%), o volume acumulado (NmL/L), o respectivo tempo (h ou d), a produtividade (NmL/L·h ou NmL/L·d) e o potencial energético (cal/g _{DQO}).	132

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CoA	Coenzima A
DQO	Demanda química de oxigênio
DA HH10	Digestão anaeróbia com hidrolisado em concentração inicial de carboidratos de 10 g/L
DA EPH-HH10	Digestão anaeróbia com o efluente da produção de H ₂ com hidrolisado em concentração inicial de carboidratos de 10 g/L
DA EPH-VII	Digestão anaeróbia com o efluente da produção de H ₂ com vinhaça em concentração inicial de 25 g/L
DA EPH VH1	Digestão anaeróbia com o efluente da cofermentação para produção de H ₂ com vinhaça e hidrolisado
DA VII	Digestão anaeróbia com vinhaça em concentração de 25 g/L
EPH	Efluente da produção de H ₂
EPH-HH10	Efluente da produção de H ₂ com hidrolisado em concentração inicial de carboidratos de 10 g/L
EPH-VII	Efluente da produção de H ₂ com vinhaça em concentração inicial de 25 g/L
EPH-VHI	Efluente da cofermentação para produção de H ₂ com vinhaça e hidrolisado
Etanol 2G	Etanol de segunda geração
ETE	Estação de tratamento de esgoto
FHL	Complexo formiato-hidrogenase-liase
HMF	Hidroximetilfurfural
HH10	Fermentação e digestão com hidrolisado em concentração inicial de carboidratos de 10 g/L em reator com manômetro e válvula;
HH20	Fermentação e digestão com hidrolisado em concentração inicial de carboidratos de 20 g/L em reator com manômetro e válvula
IR	Detector de índice de refração
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina
pHH1	Fermentação com hidrolisado em concentração inicial de carboidratos de 1 g/L em reator selado;
pHH5	Fermentação com hidrolisado em concentração inicial de carboidratos de 5 g/L em reator selado;
pHH10	Fermentação com hidrolisado em concentração inicial de carboidratos de 10 g/L em reator selado;
pVI	Fermentação com vinhaça em concentração inicial de 15 g/L com manômetro e válvula;
SSV	Sólidos suspensos voláteis
TCD	Detector de condutividade térmica
UV	Ultravioleta
UV-VIS	Detector UV visível
VII	Fermentação e digestão com vinhaça em concentração inicial de 25 g/L com manômetro e válvula;
Yp/s	Rendimento de produto por substrato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 BIORREFINARIA E RESÍDUOS DA CANA-DE-AÇÚCAR	20
2.1.1 Vinhaça de cana-de-açúcar	22
2.1.2 Palha de cana-de-açúcar	27
2.2 HIDROGÊNIO	35
2.2.1 Produção biológica de H ₂ via processo fermentativo	41
2.2.2 Digestão anaeróbia	47
2.3 METANO	52
2.4 FATORES QUE INFLUENCIAM A DIGESTÃO ANAERÓBIA	56
2.4.1 Temperatura	56
2.4.2 Geração de ácidos e alterações no pH.....	58
2.4.3 Pressão parcial	60
2.4.4 Relação carbono/nitrogênio (C/N)	61
2.5 COFERMENTAÇÃO.....	63
2.6 CONTEXTO ENERGÉTICO	64
3. JUSTIFICATIVA	67
4. OBJETIVOS	68
4.1 OBJETIVO GERAL.....	68
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	68
5. MATERIAIS E MÉTODOS	69
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA VINHAÇA	71
5.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR <i>IN NATURA</i>	71
5.2.1 Determinação dos extrativos na biomassa cartuchos	71
5.3 PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	73
5.4 CARACTERIZAÇÃO POR CLAE DOS COMPONENTES DA BIOMASSA E DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO	73

5.4.1 Condições cromatográficas	74
5.5 ORIGEM E PRÉ-TRATAMENTO DO INÓCULO	74
5.6 PRODUÇÃO DE H₂.....	74
5.6.1 Fermentação em reatores selados sem liberação de pressão	74
5.6.2 Fermentação em reatores com válvula de liberação de gás.....	76
3.6.3 Fermentação com vinhaça e hidrolisado	77
5.7 PRODUÇÃO DE CH₄.....	77
5.7.1 Produção de CH₄ sequencial.....	77
5.7.2 Produção de metano em um único estágio	78
5.7.3 Quantificação e cálculos de biogás	78
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
6.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS	80
6.1.1 Caracterização da vinhaça.....	80
6.1.2 Caracterização da palha de cana-de-açúcar <i>in natura</i>.....	82
6.1.3 Caracterização do hidrolisado hemicelulósico.....	84
6.2 PRODUÇÃO DE H₂.....	85
6.2.1 Avaliação comparativa da produção de H₂ em condição mesofílica e termofílica em diferentes valores pH utilizando a vinhaça como matéria-prima	85
6.2.2 Avaliação da produção de H₂ utilizando vinhaça em maiores concentrações e alteração para reator manométrico com alívio de pressão.....	92
6.2.3 Produção de H₂ utilizando hidrolisado hemicelulósico como matéria-prima avaliando os efeitos de aumento de concentração inicial e pressão parcial nos reatores selados.....	96
6.2.4 Avaliação da produção de H₂ utilizando hidrolisado hemicelulósico em maiores concentrações e em reatores manométricos com alívio de pressão.....	105
6.2.5 Cofermentação da vinhaça e hidrolisado de hemicelulose de palha de cana-de-açúcar	111
6.3 PRODUÇÃO DE METANO.....	118

6.3.1 Digestão anaeróbia da vinhaça	118
6.3.2 Digestão anaeróbia do hidrolisado hemicelulósico	122
6.3.3 Digestão anaeróbia sequencial do efluente da fermentação com vinhaça e hidrolisado hemicelulósico	125
7. CONCLUSÕES.....	133
8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	135
REFERÊNCIAS.....	136
ANEXOS.....	160

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma das matérias-primas de maior valor econômico no Brasil. Na safra 2025/26, é estimada a produção de 668,9 milhões de toneladas de cana, resultando em aproximadamente 27 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2025). O ciclo produtivo desse biocombustível gera uma quantidade expressiva de efluente, a vinhaça, na proporção de 10 a 15 litros para cada litro de etanol destilado (Almeida e Colombo, 2021). Assim, serão gerados cerca de 270 bilhões de litros de vinhaça neste período.

Atualmente, a vinhaça é amplamente utilizada na fertirrigação das culturas agrícolas associadas à produção de etanol. No entanto, o uso contínuo e excessivo desse efluente pode acarretar impactos ambientais significativos, devido a sua elevada concentração de sais e alta carga orgânica, podendo resultar em erosão do solo, eutrofização de corpos d'água, contaminação de lençóis freáticos e processos de desertificação (Corazza, 2001; Fuess, Garcia e Zaiat, 2018). Por outro lado, a elevada carga orgânica, proveniente de resíduos de açúcares, proteínas e ácidos orgânicos, aliada à presença de minerais como nitrogênio, fósforo e potássio, torna a vinhaça uma fonte potencial de carbono e nutrientes para microrganismos anaeróbios, possibilitando sua utilização na produção de hidrogênio (H₂) e metano (CH₄) (Elihimas *et al.*, 2025; Fuess, 2024; Sydney *et al.*, 2021; Vandenberghe *et al.*, 2022).

Além da vinhaça, resíduos sólidos, como a palha, também são gerados durante a colheita e o processamento da cana-de-açúcar para a produção de açúcar e etanol (Ferreira-Leitão *et al.*, 2017). Estima-se que cerca de 123 milhões de toneladas de palha tenham sido produzidas na safra analisada, e esse material permanece no campo após a colheita (Castro *et al.*, 2019; CONAB, 2025; Watanabe *et al.*, 2020). A palha é um resíduo lignocelulósico composto principalmente por celulose (22–29%), hemicelulose (23–31%) e lignina (19–34%) (Almeida e Colombo, 2021; Menandro *et al.*, 2017; Tomasini, 2020).

O aproveitamento da celulose para a produção de etanol de segunda geração (2G) ou para outros produtos baseados em uma plataforma utilizando glicose é explorado em algumas biorrefinarias do Brasil (Aguiar *et al.*, 2021; EPE, 2025; Lorenzi e Andrade, 2019). A hemicelulose, por sua vez, constitui a segunda maior fração estrutural, composta majoritariamente por pentoses (fração C5). Quando submetida a pré-tratamento ácido, essa fração libera os carboidratos em sua forma monomérica no meio líquido (Moutta *et al.*, 2013; Silva, da *et al.*, 2013). No entanto, a conversão das pentoses em etanol ainda enfrenta desafios consideráveis. Embora existam leveduras naturalmente capazes de metabolizar esses açúcares, como *Spathaspora passalidarum*, *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* e *Pachysolen tannophilus*

(Garcia-choa *et al.*, 2021) tais microrganismos apresentam baixa tolerância ao etanol e elevada sensibilidade aos compostos inibidores do hidrolisado, especialmente ácido acético e furfural, o que resulta em reduções acentuadas nos rendimentos e produtividades fermentativas (Perez *et al.*, 2022). O uso de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada tem avançado na viabilização da fermentação de pentoses; contudo, a diauxia ainda representa um obstáculo central. A preferência pela glicose retarda o início da metabolização da xilose, prolongando o tempo total de fermentação e reduzindo a eficiência do processo (Pinheiro *et al.*, 2025). Apesar desses desafios, a hemicelulose tem potencial para ser utilizada como matéria-prima em outros bioprocessos, como a produção de hidrogênio (H_2) e metano (CH_4) por meio da digestão anaeróbia utilizando fonte de microrganismos de ambientes naturais como lodos anaeróbios (Mattiello-Francisco *et al.*, 2024; Sá, de *et al.*, 2020; Tomasini, Faber e Ferreira-Leitão, 2022).

Além disso, os carboidratos da fração C5 podem ser utilizados como cossustratos em processos fermentativos com a vinhaça. A conversão biológica desse efluente ainda enfrenta desafios, que exigem investigações detalhadas sobre sua composição, a presença de compostos recalcitrantes, as vias metabólicas empregadas pelos microrganismos e as relações entre carbono e nitrogênio (C/N) (Comparato *et al.*, 2024; Elihimas *et al.*, 2025; Luz *et al.*, 2020; Piffer *et al.*, 2022). Nesse cenário, a cofermentação com outras fontes de substratos destaca-se como uma estratégia promissora, pois a combinação de diferentes resíduos permite a complementação das propriedades das matérias-primas, favorece o equilíbrio nutricional do meio reacional, especialmente no que se refere às relações C/N, e potencializa a produção de H_2 .

Considerando a crescente relevância desse gás, é importante destacar que o H_2 é amplamente utilizado em diversas indústrias, como as de metalurgia, petróleo, fertilizantes e processamento de alimentos (Osman *et al.*, 2021). Além dessas aplicações, destaca-se como vetor energético devido à sua alta densidade energética (141,9 MJ/kg) e à formação exclusiva de água como subproduto da sua combustão (Castellanos-Sánchez *et al.*, 2024). Em razão dessas características, o H_2 desponta como um dos principais candidatos a protagonizar a transição energética global rumo a uma economia de baixo carbono (ABH2, 2024). No entanto, atualmente o H_2 é produzido majoritariamente a partir de hidrocarbonetos ou carvão, o que intensifica o consumo de combustíveis fósseis e contribui para o aquecimento global (IEA, 2025). A sustentabilidade energética do H_2 depende fundamentalmente da rota utilizada para sua obtenção. Nesse contexto, a via biológica destaca-se por ser um método carbono-neutro e por apresentar vantagens relevantes em relação aos processos termoquímicos e eletroquímicos,

incluindo a menor demanda energética, já que opera em condições brandas de pressão e temperatura (Ananthi *et al.*, 2024).

Assim como o H_2 , o metano (CH_4) também se configura como um vetor energético, apresentando elevado poder calorífico (55 MJ/kg). O CH_4 pode ser convertido em energia elétrica e térmica, utilizado como combustível veicular e também como gás de cozinha (Castellanos-Sánchez *et al.*, 2024). Por apresentar propriedades físico-químicas semelhantes às do gás natural, o CH_4 renovável pode ser injetado diretamente na infraestrutura existente de gasodutos, atuando como substituto do gás natural fóssil (Jensen, Ottosen e Kofoed, 2021).

Tanto o H_2 quanto o CH_4 , quando produzidos a partir de matérias-primas residuais por processos de baixa demanda energética, como os processos biológicos, apresentam elevado potencial para se consolidarem como vetores estratégicos na descarbonização da matriz energética global. Nesse contexto, destaca-se a digestão anaeróbia, uma alternativa promissora que utiliza a ação consorciada de microrganismos para a degradação de compostos orgânicos. Esse processo ocorre em quatro etapas sucessivas, hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, que viabilizam a conversão eficiente da matéria orgânica em biogás (Swinbourn, Li e Wang, 2024).

Na fase fermentativa (hidrólise-acidogênese), ocorre a produção de H_2 e CO_2 juntamente com metabólitos intermediários, como ácidos orgânicos e álcoois. Essa etapa pode ser separada da metanogênese, via de consumo do H_2 , por meio de pré-tratamentos aplicados ao consórcio microbiano. Tais métodos, de natureza ácida ou térmica, criam condições hostis à sobrevivência de microrganismos não esporulantes, como as arqueias metanogênicas, responsáveis pela conversão de H_2 em CH_4 (Karim *et al.*, 2021; Magrini *et al.*, 2021). O efluente gerado na fermentação, ainda rico em carga orgânica, pode ser aproveitado como matéria-prima para a produção de CH_4 pela rota metanogênica, utilizando-se um consórcio microbiano *in natura* (sem pré-tratamento). Esse processo sequencial possibilita a obtenção integrada e sustentável de dois gases de alta densidade energética. Além disso, apresenta vantagens em termos de recuperação energética: aproximadamente 10–20% da demanda química de oxigênio (DQO) do sistema é direcionada à produção de H_2 na etapa fermentativa, enquanto a digestão subsequente de compostos mais complexos na fase metanogênica permite a conversão de cerca de 80–90% da DQO em CH_4 (Faber, Meireles e Ferreira-Leitão, 2022; Fasheun, Sant’Ana da Silva, *et al.*, 2024; Santos, Dos *et al.*, 2021; Soares *et al.*, 2023; Tomasini, Faber e Ferreira-Leitão, 2022).

Neste contexto, este estudo mostra a utilização da vinhaça e da fração hemicelulósica da palha de cana-de-açúcar para a produção de H_2 , tanto de forma individual quanto integrada,

por meio de processos de cofermentação. Além disso, foi explorada a produção sequencial de H_2 e CH_4 a partir dos efluentes gerados nas fermentações desses materiais, buscando estratégias de valorização da vinhaça e da fração C5 provenientes do setor sucroenergético. A proposta visa oferecer uma solução para o aproveitamento sustentável desses resíduos gerados ou com potencial de geração em grande quantidade, apresentando uma alternativa complementar ou mais eficiente para a geração de energia renovável. Essa abordagem também promove benefícios ambientais, integrando o tratamento de resíduos e efluentes à geração de créditos de carbono e contribuindo para a ampliação da sustentabilidade energética do setor sucroenergético.

Para facilitar a compreensão deste estudo, sua organização foi dividida da seguinte forma: uma revisão bibliográfica (Seção 2), abordando os principais conceitos necessários ao entendimento do tema; justificativa (Seção 3), destacando a relevância e a importância da pesquisa; objetivos (Seção 4) e a metodologia empregada para atingi-los (Seção 5); resultados obtidos e discutidos (Seção 6); conclusões (Seção 7) e as perspectivas para a continuidade deste trabalho (Seção 8).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo apresenta os fundamentos teóricos necessários para a compreensão do trabalho e para a discussão dos resultados obtidos. Inicialmente, aborda-se o conceito de biorrefinaria da cana-de-açúcar e suas principais abordagens, seguido da caracterização e das possíveis aplicações da vinhaça e da palha de cana. Em seguida, discute-se a estrutura lignocelulósica da biomassa, com ênfase na hemicelulose e em suas aplicações biotecnológicas dentro de estratégias de biorrefinaria. São também explorados aspectos relacionados à produção biológica de H_2 , às vias metabólicas envolvidas no processo fermentativo, aos processos de cofermentação e à produção sequencial de H_2 e CH_4 , além de uma síntese dos principais fatores que influenciam a digestão anaeróbia. Por fim, o capítulo inclui uma breve discussão sobre o contexto energético e as perspectivas de transição para fontes renováveis. Juntas, essas discussões fornecem o embasamento necessário para contextualizar as análises e interpretações que se segirão.

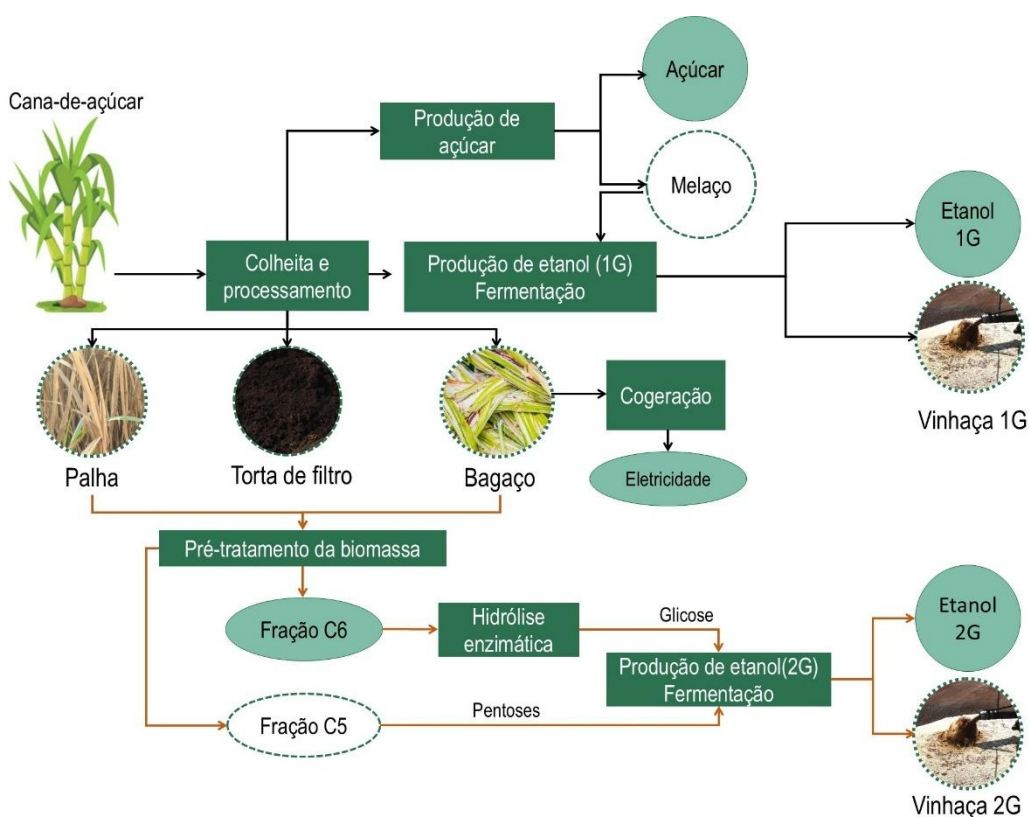
2.1 BIORREFINARIA E RESÍDUOS DA CANA-DE-AÇÚCAR

Uma biorrefinaria consiste em um sistema integrado e sustentável voltado à conversão de biomassas em uma variedade de produtos com valor agregado (Righetti *et al.*, 2020). Estas podem utilizar matérias-primas orgânicas como vegetais, resíduos agrícolas, florestais e industriais ricos em carboidratos e/ou ácidos graxos, para produzir biocombustíveis (etanol de primeira e segunda geração, biodiesel, biogás, H_2), insumos bioquímicos (ácidos orgânicos), materiais renováveis (bioplásticos, biopolímeros), enzimas e bioenergia (Qaseem, Shaheen e Wu, 2021; Vandenberghe *et al.*, 2022; Volpi, Fuess e Moraes, 2023). Grande parte dessa conversão ocorre por meio da ação de microrganismos, capazes de transformar a biomassa em produtos de valor comercial. De modo análogo ao funcionamento das refinarias de petróleo, que processam o petróleo bruto para gerar combustíveis, produtos químicos e diversos materiais, as biorrefinarias adotam uma abordagem integrada voltada a maximizar o aproveitamento da biomassa, reduzir impactos ambientais e substituir derivados do petróleo por alternativas renováveis.

A cana-de-açúcar destaca-se como uma matéria-prima versátil, capaz de ser convertida em um amplo espectro de produtos, incluindo açúcares, enzimas e bioenergia (Aguiar *et al.*, 2021; Kamdem *et al.*, 2018; Volpi, Fuess e Moraes, 2023). No Brasil, existem dois tipos principais de unidades de processamento da cana: as plantas autônomas e as anexas (Piffer *et*

al., 2022). As plantas autônomas destinam integralmente o caldo extraído da cana à fermentação para produção de etanol, sem a fabricação de açúcar. Já as plantas anexas realizam a produção simultânea de açúcar e etanol. Nesses sistemas, o açúcar é obtido pela concentração do caldo em etapas sucessivas, gerando o melaço como principal subproduto. Esse melaço é então misturado à fração restante do caldo, formando um substrato posteriormente fermentado para obtenção de etanol (Fuess, 2024). A maioria das biorrefinarias de cana-de-açúcar no Brasil é do tipo anexa (Ferraz Junior *et al.*, 2022) (Figura 1).

Figura 1 - Esquema representativo das rotas de aproveitamento da cana-de-açúcar, resíduos e efluente em biorrefinarias de cana-de-açúcar de primeira e segunda geração.



Fonte: Elaboração própria com base em Fuess, 2017.

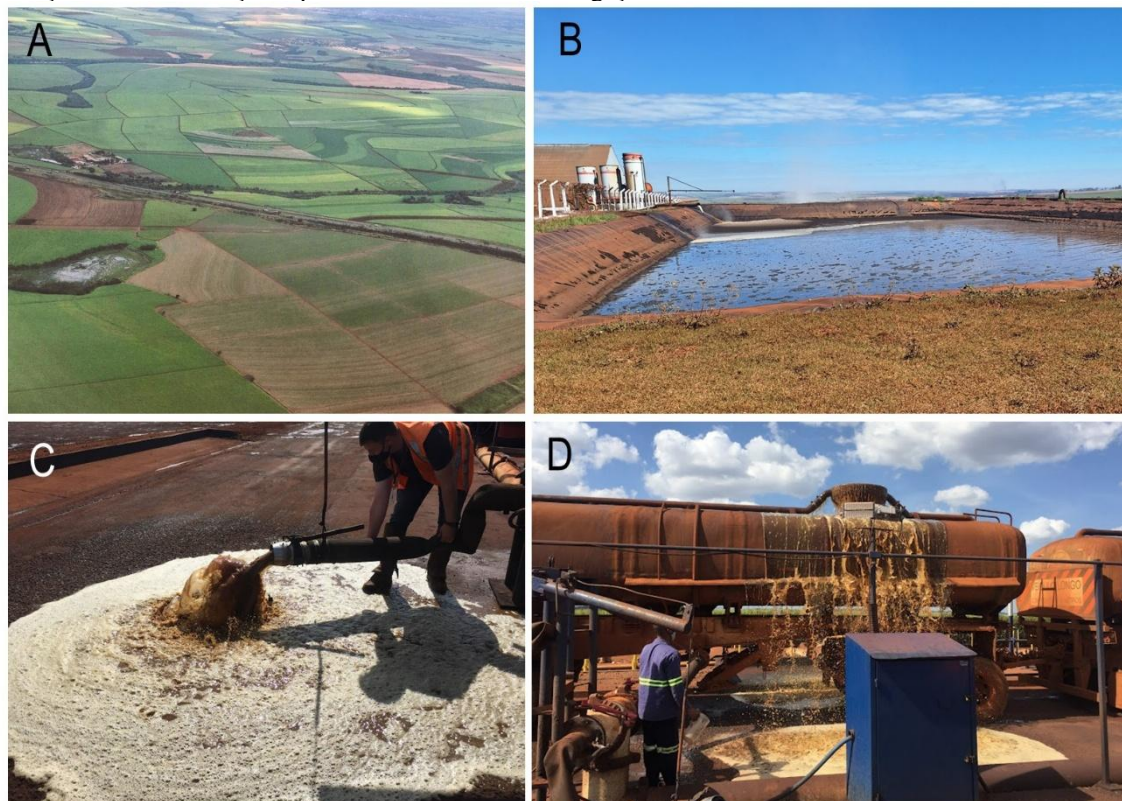
No ciclo produtivo do açúcar e do etanol, são gerados resíduos, como a palha da cana-de-açúcar, proveniente da colheita, o bagaço, resultante do processo de extração do caldo. Ambos são biomassas lignocelulósicas, compostas principalmente por carboidratos estruturais, que podem ser convertidas em bioprodutos e bioenergia. Já a torta de filtro, gerada na clarificação e filtração do caldo de cana, apresenta alto teor de fósforo e outros nutrientes, sendo amplamente empregada como fertilizante para aumentar a produtividade agrícola (Duarte *et al.*, 2020). Nesse mesmo ciclo produtivo, é gerada a vinhaça, um efluente da destilação do etanol

produzido em grandes quantidades e que representa um desafio para as biorrefinarias de cana quanto ao seu reaproveitamento. Esse desafio decorre de suas características, como a acidez e a alta carga orgânica, fatores que têm motivado pesquisadores a explorar alternativas além da fertirrigação. No entanto, a grande quantidade de vinhaça gerada não apenas impõe desafios, mas também se apresenta como uma oportunidade para diversificar seus usos dentro das usinas sucroenergéticas, especialmente na geração de energia limpa e sustentável, podendo ser integrada a outros resíduos do setor.

2.1.1 Vinhaça de cana-de-açúcar

A vinhaça é o principal efluente gerado na etapa de destilação do etanol, com um volume produzido de aproximadamente 10 a 15 litros para cada litro de etanol destilado (Figura 2) (Almeida e Colombo, 2021; Rabelo, Costa, da e Vaz Rossel, 2015). Na safra 2025/26 é estimada a produção total de aproximadamente 27 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2025). Isto representa a geração mínima de 270 bilhões de litros de vinhaça. Independente do modelo de processo, usina anexa ou autônoma, a vinhaça é sempre gerada como efluente. Após a destilação, a vinhaça gerada apresenta temperaturas entre 65 e 90 °C (Fuess *et al.*, 2023a; Rabelo, Costa, da e Vaz Rossel, 2015). Em seguida, o efluente passa por torres de resfriamento, onde sua temperatura é reduzida para 40 a 50 °C, permitindo seu uso na fertirrigação ou seu armazenamento em lagoas (Figura 2B) (Almeida e Colombo, 2021; Rabelo, Costa, da e Vaz Rossel, 2015). Sua composição tem sido amplamente discutida na literatura, e a Tabela 1 apresenta as faixas de concentração dos principais compostos identificados nesse efluente.

Figura 2 – Etapas do manejo e utilização da vinhaça na agricultura. (A) Vista aérea de áreas agrícolas destinadas ao cultivo de cana-de-açúcar, principais consumidoras da vinhaça para fertirrigação; (B) Lagoa de armazenamento de vinhaça em usina sucroenergética; (C) Ponto de coleta da vinhaça para ser distribuída; (D) Carregamento de vinhaça em caminhão-tanque adaptado que será destinado às plantações de cana-de-açúcar para ser utilizada na fertirrigação.



Fonte: Arquivo pessoal da autora

Tabela 1 - Comparação da composição físico-química de vinhaças provenientes de melaço, usina anexa e usina autônoma encontrados na literatura

	Unidade	Vinhaça usina anexa ^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10}	Vinhaça de usina autônoma ^{1,2,3,11}
pH	-	4 - 4,8	4,2 - 4,6
DQO	mg/L	31.604 - 49.000	17.850 - 19.510
Sólidos totais	mg/L	2.426 - 5.400	14.035 - 23.010
Sólidos voláteis	mg/L	2.006 - 4.778	1.716 - 2.700
Carboidratos totais	g/L	3,68 - 11,43	0,45 - 4,70
Glicerol	g/L	2,52 - 4,20	2,52 - 2,86
Ácido láctico	g/L	1,05 - 2,43	0,92 - 1,48
Ácido acético	g/L	1,12 - 2,88	0 - 0,15
Ácido propiônico	g/L	0,06 - 1,17	0
Ácido butírico	g/L	0	0
Metanol	g/L	0,07 - 0,39	0 - 0,59
Etanol	g/L	0,57 - 5,94	0 - 0,15

Fenóis totais	mg/L	1.706 - 6.258	0,36 - 0,62
Sulfato	mg/L	790 - 3.700	1.041 - 1.990
Fosfato	mg/L	44 - 345	-
Potássio	mg/L	2537 - 2693	
Nitrogênio total	mg/L	620 - 1065	-
Carbono	g/kg	46	-
C/N		12	-

¹(Piffer *et al.*, 2022); ²(Fuess, Zaiat e Nascimento, 2019); ³ (Santos *et al.*, 2019); ⁴(Ramos, Silva e Luis, 2019); ⁵(Barros *et al.*, 2019); ⁶(Niz *et al.*, 2019); ⁷(Rego *et al.*, 2020); ⁸(Takeda *et al.*, 2022); ⁹(Aguilar *et al.*, 2023); ¹⁰ (Lima *et al.*, 2023); ¹¹ (Borges *et al.*, 2021);

Durante as décadas de 1940 e 1950, a quantidade de vinhaça gerada era ainda pouco expressiva (Corazza, 2001). Contudo, com a criação do Programa Nacional do Alcool (Proálcool), em 1975, o consumo de etanol no Brasil aumentou significativamente, impulsionando a expansão da produção e, conseqüentemente, o volume de vinhaça produzido. Em resposta aos riscos ambientais associados a esse resíduo, o extinto Ministério do Interior publicou, em 1978, a Portaria nº 323, que proibiu o despejo de vinhaça em mananciais (Carvalho, 2010). Até a década de 1970, o descarte desse efluente era realizado em "áreas de sacrifício", prática que, pela ausência de controle e de tratamento, comprometia a fertilidade dos solos e degradava os ecossistemas locais. A partir da década de 1980, a fertirrigação foi adotada como alternativa para a disposição da vinhaça, visando seu reaproveitamento agrícola e a mitigação dos impactos ambientais (Corazza, 2006).

Atualmente a vinhaça bruta continua sendo utilizada na fertirrigação de culturas agrícolas associadas à produção de etanol, devido ao seu elevado teor de minerais essenciais, como potássio, nitrogênio e fósforo, que auxiliam na fertilização do solo. No Brasil, a utilização da vinhaça como fertirrigante é regulamentada pelas normativas da CETESB, com base em sua concentração de potássio (CETESB, 2015). A regulamentação delimita a aplicação da vinhaça a partir de parâmetros agronômicos e ambientais, considerando a capacidade de troca catiônica do solo, o teor pré-existente de potássio na vinhaça e a capacidade da cana-de-açúcar de absorvê-lo por hectare ao longo do ciclo produtivo anual (Rabelo, Costa, da e Vaz Rossel, 2015). No entanto, o uso excessivo ao longo dos anos vem trazendo impactos ambientais, como acúmulo excessivo de sais, alta carga orgânica e contaminação dos recursos hídricos, favorecendo a erosão do solo, eutrofização de corpos d'água, contaminação de lençóis freáticos e até desertificação (Sydney *et al.*, 2021).

Este efluente é uma matriz complexa, na qual os principais substratos passíveis de fermentação incluem carboidratos, glicerol e ácido láctico. Os carboidratos presentes correspondem a açúcares residuais não convertidos em etanol (Tabela 1). Além desses

compostos, foi identificado a presença de proteínas na vinhaça, possivelmente oriundas de resíduos celulares das leveduras (Borges *et al.*, 2021; Takeda *et al.*, 2022). Em temperaturas elevadas, proteínas e carboidratos podem reagir por meio da reação de *Maillard*, levando à formação de polímeros como as melanoidinas. Essas macromoléculas possuem propriedades antioxidantes, conferindo resistência à degradação biológica e tornando a conversão biotecnológica da vinhaça mais desafiadora (Comparato *et al.*, 2024).

O glicerol é um subproduto do metabolismo da levedura submetida a estresse osmótico durante a fermentação para a produção de etanol (Fuess, 2024). Esse composto pode servir como substrato para a geração de H_2 por meio de vias oxidativas, além de ser consumido na via redutiva para a formação de 1,3-propanodiol, um composto de alto valor agregado com diversas aplicações industriais (Faber, Meireles e Ferreira-Leitão, 2022). Já o ácido láctico é um dos principais indicadores de contaminação da fermentação alcoólica por bactérias ácido-láticas (Fuess, 2024).

A vinhaça é considerada ácida devido ao seu elevado teor de ácidos orgânicos (Tabela 1). Além disso, os compostos fenólicos mencionados na literatura são geralmente quantificados pelo método colorimétrico de *Folin-Ciocalteu*, que pode não ser o mais adequado para materiais complexos como a vinhaça, devido à sua coloração escura, o que pode gerar erros experimentais. Estratégias de extração e análise, como a extração líquido-líquido combinada com técnicas de espectrometria de massas (LC-MS), têm sido usadas para isolar e identificar esses compostos, ampliando o entendimento sobre o potencial da vinhaça como fonte de biomoléculas de interesse. Em uma fração obtida com diclorometano, o ácido siríngico foi identificado, ácido fenólico com efeito fitotóxico. Este estudo abre novas perspectivas para a utilização da vinhaça no desenvolvimento de bio-herbicidas inovadores, contribuindo para minimizar o descarte inadequado desse efluente (Luz *et al.*, 2020). Na análise de outro extrato obtido com acetato de etila, foram encontrados os ácidos pinélico e tianásico, ambos ácidos graxos com potencial fitotóxico e antimicrobiano (Divya *et al.*, 2023; Luz *et al.*, 2020). Esses compostos tóxicos provenientes da cana-de-açúcar e presentes na vinhaça podem tornar um desafio o seu uso em processos biológicos como a fermentação e digestão anaeróbia (Comparato *et al.*, 2024; Divya *et al.*, 2023).

A digestão anaeróbia da vinhaça tem sido consistentemente destacada como uma das estratégias mais eficientes para a recuperação de recursos e a reciclagem de nutrientes (Moraes *et al.*, 2014). Compostos inorgânicos, como o potássio, permanecem em elevada concentração no efluente mesmo após a biodigestão, o que possibilita sua utilização como insumo na adubação do solo (Moraes *et al.*, 2014).

No entanto, apesar de seu potencial, algumas limitações relevantes ainda precisam ser superadas. Um dos principais desafios refere-se às elevadas concentrações de sulfato (SO_4^{2-}), resultantes do uso de ácido sulfúrico nas usinas de etanol para restaurar o pH ideal do processo, controle de contaminações bacterianas, reduzir compostos tóxicos acumulados durante a fermentação, prevenção de contaminações nas dornas e tratamento ácido das células após cada ciclo de fermentação para recuperação da massa celular do caldo fermentado (Ceccato-Antonini, 2018; Silva-Neto *et al.*, 2020). Esse fator compromete significativamente a produção de CH_4 em sistemas convencionais de digestão anaeróbia em estágio único. Durante a etapa metanogênica, os efeitos negativos do sulfato se intensificam, uma vez que sua presença favorece o crescimento de bactérias redutoras de sulfato (BRS). Esses microrganismos competem diretamente com arqueias metanogênicas por substratos como acetato e H_2 e, de forma indireta, promovem a formação de sulfeto pela redução de sulfato em pH superior a 6. O acúmulo de sulfeto, além de ser tóxico para as arqueias, compromete a qualidade do biogás, elevando consideravelmente os custos de purificação para seu aproveitamento energético (Fuess *et al.*, 2023a).

Por outro lado, a atividade fermentativa realizada por bactérias acidogênicas, responsáveis pela produção de ácidos e solventes, não é significativamente afetada pela presença de sulfeto, dado que esses microrganismos apresentam maior tolerância em comparação com arqueias metanogênicas e as próprias BRS (Gil-Garcia *et al.*, 2018). Diante disso, uma alternativa promissora para o aproveitamento da vinhaça, é a digestão anaeróbia em dois estágios. A criação de condições sulfetogênicas na etapa acidogênica, pode favorecer a redução de sulfato a sulfeto, reduzindo, assim, os efeitos inibitórios do H_2S sobre a fase metanogênica subsequente e contribuindo para o aumento da eficiência e da recuperação energética global do sistema (Fuess, Zaiat e Nascimento, 2019; Gil-Garcia *et al.*, 2018; Rego *et al.*, 2020).

Essas características tornam a vinhaça um efluente desafiador e ao mesmo tempo promissor para processos de digestão anaeróbia, além de possibilitarem uma abordagem integrada capaz de promover a remoção da carga orgânica, reduzir significativamente seu impacto ambiental e potencializar sua valorização energética no contexto das biorrefinarias. Nesse sentido, a superação dos desafios técnicos associados, aliada ao desenvolvimento de tecnologias mais eficientes, é crucial para consolidar a vinhaça como um recurso estratégico tanto para a promoção de uma agricultura sustentável quanto para o fortalecimento da matriz energética renovável.

2.1.2 Palha de cana-de-açúcar

A palha da cana é composta por aproximadamente 40% de folhas verdes e ponteiro, e 60% de folhas secas (Figura 3) (Menandro *et al.*, 2017). A cada hectare colhido, são obtidas entre 70 e 75 toneladas de cana (Castro *et al.*, 2019). Na safra 2025/26, destina-se à produção de cerca de 8,85 milhões de hectares, resultando em um total estimado de 125 milhões de toneladas de palha (CONAB, 2025).

Figura 3 – Palha de cana-de-açúcar; (A) Ilustração da cana-de-açúcar demonstrando suas partes divididas em palha (ponteiro, folhas verdes e folhas secas) e colmo. (B) Palha de cana-de-açúcar moída



Fonte: (A) (Negrão *et al.*, 2021); (B) Arquivo pessoal da autora

Atualmente, a colheita da cana-de-açúcar é majoritariamente mecanizada. O percentual de mecanização, que era de 24,4% na safra 2007/2008, atingiu aproximadamente 92,4% na safra atual (CONAB, 2018, 2025). Esse processo deixa uma fração da palha sobre o solo, contribuindo para sua proteção contra erosão e a manutenção da fertilidade, correspondendo a cerca de 50% do material residual (Forchezatto e Neves, 2020; Longati *et al.*, 2019). Essa prática contribui para o balanço e a ciclagem de nutrientes, promove o equilíbrio do microbioma local, melhora a infiltração e o armazenamento de água no solo e reduz a incidência de radiação solar direta, inibindo a germinação de algumas plantas daninhas. Como consequência, há uma menor necessidade do uso de herbicidas e um aumento da produtividade do solo (Camargo *et al.*, 2020).

No entanto, o acúmulo excessivo de palha no solo pode prejudicar o desenvolvimento inicial da cana-de-açúcar e favorecer a proliferação de pragas (Forchezatto e Neves, 2020; Soares, Duft, *et al.*, 2019). Quando há grande excedente de palha, este material pode ser destinado ao parque industrial tanto misturado diretamente à carga da colheita (cana + palha) quanto na forma de fardos (Forchezatto e Neves, 2020). Na usina, a palha é então incorporada ao bagaço, aumentando o volume total de biomassa disponível para cogeração para a obtenção

de eletricidade para a usina e venda à rede (Camargo *et al.*, 2020). Entretanto, o uso da palha nas caldeiras apresenta diversos desafios devido à composição química, que contém impurezas como SiO₂ (17–41%), K₂O (8–32%), CaO (7–21%), SO₃ (9–28%), Fe₂O₃ (1–7%) e Cl (0,3–6%) (Bizzo *et al.*, 2014; Soares, 2019). Esses elementos favorecem a formação de incrustações nas caldeiras, levando à corrosão do equipamento, sendo a composição variada devido à espécie vegetal utilizada, ao método de colheita da cultura e ao momento da colheita (Sampaio *et al.*, 2019; Soares, *et al.*, 2019).

Soares *et al.* (2019) analisaram os impactos do uso da palha na queima para cogeração e constataram que, em uma usina de médio porte, aproximadamente 45 mil toneladas de impurezas minerais foram introduzidas no sistema a cada safra. Além disso, diferenças na composição química da palha em comparação ao bagaço, como menor umidade (12 a 45% comparada a 48-52% do bagaço) e tamanho irregular das partículas, podem causar entupimentos no alimentador da caldeira, reduzindo a eficiência energética do processo (Camargo *et al.*, 2020; Soares, *et al.*, 2019; Watanabe *et al.*, 2020).

Quanto ao tamanho das partículas, estudos demonstraram que a moagem apresenta maior eficiência do que os trituradores convencionais na obtenção de partículas com distribuição mais próxima à do bagaço (Soares, *et al.*, 2019). Essas estratégias têm sido implementadas para minimizar os desafios da cogeração de energia. No entanto, considerando o potencial das biomassas lignocelulósicas, como o bagaço e a palha, a busca por processos mais eficientes de conversão energética e pela obtenção de produtos de maior valor agregado pode contribuir para a otimização do ciclo produtivo das usinas sucroenergéticas.

O etanol de segunda geração (E2G) é uma estratégia que traz a conversão desses resíduos em bioproductos e assim como este, outros produtos de valor agregado podem ser gerados. Para a obtenção de açúcares da biomassa lignocelulósica há duas etapas principais: i) pré-tratamento da biomassa para diminuir a sua recalcitrância por meio da remoção da hemicelulose ou desorganização estrutural da biomassa, aumentando sua área superficial expondo a celulose para ser mais facilmente digerida pelas celulasas; ii) conversão enzimática da celulose por β -glicosídeos, endoglucanases e exoglucanases em glicose livre (Almeida e Colombo, 2021; Gilna *et al.*, 2017).

A *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo mais utilizado na metabolização das hexoses para a produção de etanol. Essa levedura se destaca por sua rápida taxa de fermentação, alta produtividade e excelente tolerância a altas concentrações de etanol, açúcar e compostos tóxicos, como ácidos orgânicos gerados na fermentação (Milessi *et al.*, 2020). No entanto, os principais desafios para ampliar a capacidade produtiva e a competitividade econômica do

bioetanol de segunda geração estão na eficiência da etapa de pré-tratamento e nos altos custos das enzimas envolvidas no processo (CNPEM, 2018).

Quanto à produção de etanol de E2G a partir da hemicelulose, a segunda fração mais abundante da biomassa lignocelulósica, ocorre por meio da fermentação das pentoses. Durante o pré-tratamento ácido, as pentoses, como xilose e arabinose, são liberadas em sua forma monomérica na fração líquida (Silva, da *et al.*, 2013). Caso sejam solubilizadas como xilooligômeros por outros tipos de pré-tratamento (*Tópico 2.1.2.1*), é necessário hidrolisá-los em monômeros antes da fermentação. Esse processo envolve a ação de xilanases, incluindo endo-xilanase (EC 3.2.1.8) e β -xilosidase (EC 3.2.1.37), além de enzimas auxiliares responsáveis por hidrolisar as cadeias laterais da xilana, tais como α -galactosidase (EC 3.2.1.22), α -glucuronidase (EC 3.2.1.131), acetilxilano esterase (EC 3.1.1.72), ácido ferúlico esterase (EC 3.1.1.73) e α -arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) (Bhardwaj, Kumar e Verma, 2019). Devido ao alto custo e à complexidade dos coquetéis enzimáticos de que o pré-tratamento convencionalmente aplicado na indústria solubiliza a hemicelulose em carboidratos monoméricos, a aplicação industrial de xilanases em usinas brasileiras ainda não foi relatada (Ramos *et al.*, 2022).

A fermentação das pentoses no ciclo produtivo do etanol de E2G requer linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* com alta eficiência na conversão de xilose e arabinose (Bettiga *et al.*, 2009). No entanto, ainda não há relatos de aplicações industriais bem-sucedidas dessas leveduras geneticamente modificadas, especialmente em países como o Brasil, onde as leis de biossegurança são rigorosas (Milessi *et al.*, 2020). Apesar dos avanços significativos no desenvolvimento de tecnologias voltadas ao etanol 2G em escala mundial, sua produção ainda é limitada quando comparada à do etanol de primeira geração, obtido a partir da cana-de-açúcar e do milho (EPE, 2025; Susmozas *et al.*, 2025).

Devido à sua composição rica em carboidratos, como xilose e arabinose, a hemicelulose pode ser aproveitada em diferentes bioprocessos, entre eles, na produção de vetores energéticos, como H_2 e CH_4 , por meio de fermentação e digestão anaeróbia (Mattiello-Francisco *et al.*, 2024; Sá, de *et al.*, 2020; Tomasini, Faber e Ferreira-Leitão, 2022). Esses processos utilizam microrganismos provenientes de fontes naturais, como lodos anaeróbios. Essa abordagem representa uma estratégia eficiente para integrar essa corrente residual da produção de etanol de segunda geração ao conceito de biorrefinaria, promovendo a valorização desta fração com grande potencial fermentescível.

2.1.2.1 Estrutura lignocelulósica

O que caracteriza uma biomassa lignocelulósica é a predominância de celulose, lignina e hemicelulose na parede secundária formando uma estrutura recalcitrante (Miguez *et al.*, 2023). A composição e organização das biomassas lignocelulósicas variam conforme a espécie, tipo celular, função do tecido e condições de crescimento, além de mudarem durante o desenvolvimento celular, influenciando sua estrutura geral (Silva, da *et al.*, 2013).

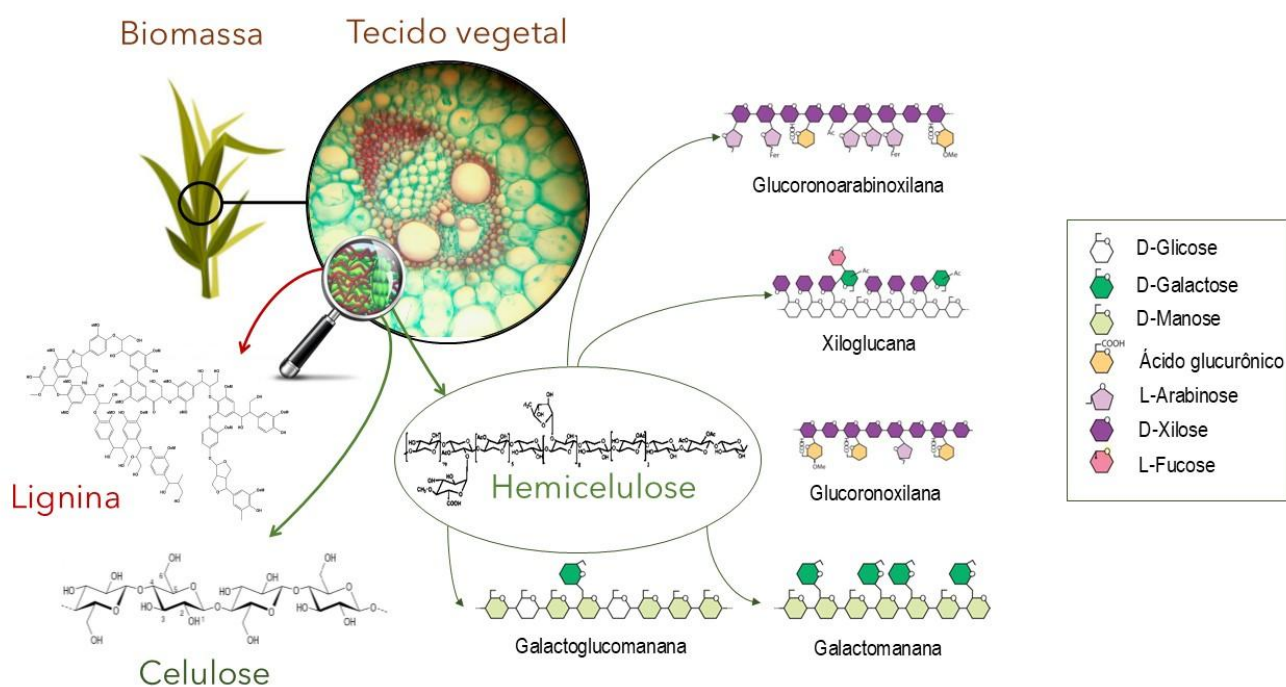
A celulose é um homopolissacarídeo formada por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4 e corresponde ao componente mais abundante da parede celular (Datta, 2024). Esta estrutura possui regiões amorfas e cristalinas, sendo esta última formada por ligações glicosídicas unindo hidroxila primária (C6-OH) e dois grupos hidroxila secundárias (C2-OH e C3-OH), que formam uma microfibrila insolúvel de difícil acesso às enzimas hidrolíticas (French e Santiago Cintrón, 2013; Gomide *et al.*, 2019). A hidrólise da celulose pode ocorrer por meio de processos químicos ou bioquímicos, sendo a via bioquímica mais vantajosa em comparação a termoquímica, pois evita a destruição dos carboidratos, preservando sua fração original (Datta, 2024). Dada a complexidade das estruturas cristalinas e amorfas da celulose, é necessária a ação sinérgica de múltiplas enzimas para sua hidrólise eficiente. Essas enzimas, produzidas principalmente por fungos e bactérias, incluem as endo- β -1,4-glucanases (endocelulases, EC 3.2.1.9.1), as celobiohidrolases (exocelulases, EC 3.2.1.91) e as β -1,4-glucosidases (celobiasas, EC 3.2.1.21), que atuam de forma complementar para garantir a hidrólise eficaz da celulose (Lynd *et al.*, 2002).

Quanto à lignina, esta é uma macromolécula complexa e irregular, altamente reticulada com a hemicelulose e a celulose nas paredes celulares das plantas. É composta por compostos fenólicos, como álcoois coniferílico, sinapílico e p-cumárico, ligados por ligações éter e ligações carbono-carbono (Moraes *et al.*, 2018).

A hemicelulose, também conhecida como fração C5, é a segunda fração mais abundante da estrutura lignocelulósica, sendo um heteropolímero ramificado composto por uma variedade de monossacarídeos, incluindo pentoses (como xilose e arabinose), hexoses (como glicose, manose e galactose) e ácidos urônicos (como ácido-D-glucurônico, ácido α -D-galacturônico e α -D-4-O-metilgalacturônico) e grupos acetil (Yang *et al.*, 2020). As hemiceluloses apresentam uma diversidade de tipos, incluindo xilanas, xiloglucanas, mananas e β -glucanas (Rennie e Scheller, 2014; Scheller e Ulvskov, 2010). As xilanas são polímeros constituídos por cadeias lineares de xilose por ligações glicosídicas β -1,4, apresentando substituições por resíduos ácido glucurônico em ligações α -(1 $\rightarrow$ 2), sendo, por isso, denominadas glucuronoxilanas (Busse-

Wicher *et al.*, 2014; Park e Cosgrove, 2012). Quando essas cadeias possuem resíduos de arabinose em suas ramificações, são chamadas de arabinoxilanas ou glucuronoarabinoxilanas. Além disso, em certas xilanas naturais, ocorrem substituições por arabinofuranosil, ligado por meio de uma ligação éster ao ácido ferúlico na posição 5-O, uma característica típica das xilanas de monocotiledôneas. A maior parte das xilanas também apresenta grupos acetil, que se ligam predominantemente à posição O-3 dos resíduos de xilose e, em menor proporção, à posição O-2 (Carvalho, D. M. de *et al.*, 2017; Gírio *et al.*, 2010; Huisman, Schols e Voragen, 2000; Scheller e Ulvskov, 2010). Os grupos acetil são responsáveis por cerca de 1–6% da composição da biomassa (Qaseem, Shaheen e Wu, 2021; Qaseem e Wu, 2020) (Figura 4).

Figura 4 – Representação esquemática de um tecido vegetal de monocotiledônea, destacando a parede celular das células, composta por lignina, celulose e hemicelulose. Entre os diferentes tipos de hemicelulose presentes, a glucoroarabinoxilana representa a da palha de cana-de-açúcar.



Fonte: Elaboração própria com base em Scheller e Ulvskov, 2010.

No caso específico da palha e do bagaço de cana-de-açúcar, as hemiceluloses são predominantemente compostas por xilanas do tipo L-arabino-(4-O-metilglucurono)-D-xilana. Nessas estruturas, as unidades de ácido glucurônico e arabinose estão ligadas às posições O-2 e O-3, respectivamente (Costa *et al.*, 2023; Yang *et al.*, 2020). A hemicelulose presente na palha apresenta um maior número de substituições por unidades de arabinose em comparação ao bagaço, além de um menor teor de grupos acetila, que estão localizados principalmente nas posições O-3, O-2 e O-2,3.

A complexa interação entre celulose, hemicelulose e lignina apresenta desafios quanto à aplicação biotecnológica destas frações, como, por exemplo, na produção de biocombustíveis e outros produtos de valor agregado. Atualmente, para utilizar a hemicelulose na produção de E2G é necessário empregar *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada, conforme discutido anteriormente. Isto não a torna competitivamente atraente em relação ao uso da celulose, tornando-a um resíduo em potencial a ser explorado para geração de bioprodutos. A fração C5 pode ser utilizada como matéria-prima em diferentes bioprocessos e vem apresentando resultados promissores na produção de H₂ e CH₄ por meio da digestão anaeróbia (Rashama, Ijoma e Matambo, 2019; Sá, de *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2018; Thungklin, Sittijunda e Reungsang, 2018; Tomasini, Faber e Ferreira-Leitão, 2022; Yang e Wang, 2018). O pré-tratamento das biomassas lignocelulósicas é uma etapa necessária para maximizar a acessibilidade dos microrganismos e enzimas a estas frações para que possam ser exploradas biotecnologicamente.

2.1.2.2 Pré-tratamentos para obtenção da hemicelulose e suas aplicações biotecnológicas no contexto de biorrefinaria

A hemicelulose pode ser extraída por meio de pré-tratamentos com ácidos diluídos, como ácido sulfúrico (H₂SO₄), ácido clorídrico (HCl) e ácido oxálico (H₂C₂O₄), ou pelo pré-tratamento hidrotérmico. Os pré-tratamentos ácidos promovem a clivagem das ligações poliméricas da biomassa, resultando na solubilização das hemiceluloses em carboidratos em sua forma monomérica, enquanto a celulose permanece praticamente intacta (Özbay *et al.*, 2023; Yildirim *et al.*, 2022). Embora esses métodos possam remover pequenas quantidades de lignina, não são altamente eficientes para sua remoção completa (Baksi *et al.*, 2023).

Dentre os ácidos utilizados, o H₂SO₄ é um dos mais amplamente empregados devido à sua alta eficiência na hidrólise da hemicelulose, mesmo em concentrações relativamente baixas, alcançando até 90% de eficiência na recuperação dos carboidratos da biomassa (Luterbacher *et al.*, 2014). Por outro lado, o HCl também se mostra eficaz na clivagem de ligações glicosídicas, porém sua alta volatilidade e corrosividade exigem medidas adicionais de segurança no manuseio e no projeto dos reatores utilizados no processo (Baksi *et al.*, 2023). O ácido oxálico (H₂C₂O₄), por sua vez, tem sido estudado como uma alternativa mais branda, com menor impacto ambiental, embora sua eficiência ainda seja objeto de investigação (Yildirim *et al.*, 2022). Contudo, o uso de altas concentrações de ácido pode levar à formação de subprodutos indesejáveis provenientes da degradação das pentoses e hexoses, como furfural e 5-

hidroximetilfurfural (HMF) respectivamente, compostos furânicos que apresentam toxicidade para células microbianas, podendo comprometer processos fermentativos que utilizam a hemicelulose como matéria-prima (Guo *et al.*, 2022).

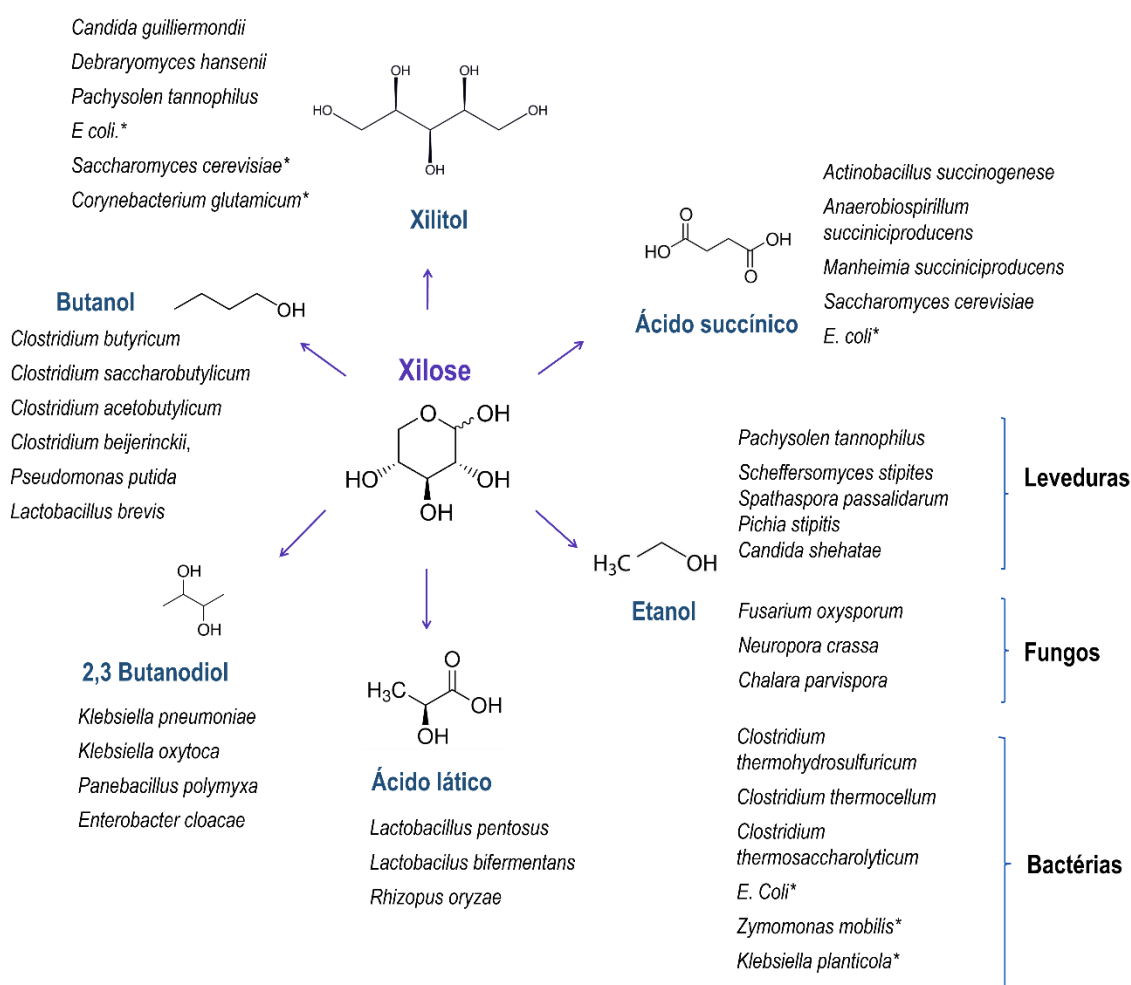
O pré-tratamento hidrotérmico utiliza água quente líquida, vapor ou água subcrítica como catalisador, operando entre 150–230 °C por 10–15 minutos, com pressão de 4,9–20 bar. O processo baseia-se na autoionização da água, que libera H_3O^+ e OH^- , promovendo a hidrólise da hemicelulose e a redução do pH do meio (Baksi *et al.*, 2023). Esse método é menos corrosivo e mais sustentável em comparação com os que utilizam ácidos, mas libera os carboidratos da fração hemicelulósica em forma oligomérica, o que impacta na fase adaptativa dos microrganismos quando este hidrolisado é utilizado como matéria-prima em processos fermentativos (Sá, de *et al.*, 2020).

O aproveitamento da hemicelulose no contexto de biorrefinaria é diverso, apresentando produtos provenientes dessa fração na área alimentícia, farmacêutica e têxtil. Exemplificando, na indústria alimentícia xilanas modificadas são utilizadas como emulsificante, hidrogel, aditivo e material para filmes comestíveis e revestimentos de alimentos, devido à sua hidrofobicidade e digestibilidade (Ebringerová, 2005). No contexto farmacêutico, xilanas extraídas do sabugo de milho apresentam diversas propriedades bioativas, incluindo atividades antimicrobiana, antiproliferativa, antioxidante e anticoagulante (Melo-Silveira *et al.*, 2012). Dentre elas, as glucoronoarabinoxilanas destacam-se por sua capacidade imunoestimulante (Qaseem, Shaheen e Wu, 2021). Além disso, a incorporação de fármacos em nanopartículas revestidas com Fe_2O_3 ou sílica modificada com xilana pode aumentar sua biodisponibilidade e especificidade no organismo, tornando-se uma estratégia promissora no tratamento de doenças como o câncer (Bouramtane *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2018). Ainda neste contexto, os mananoligossacarídeos são usados como prebióticos devido à estimulação da flora bacteriana normal, essencial para o funcionamento intestinal ideal e inibição de microrganismos patogênicos (Assis, Ferreira-Leitão e Silva, 2025). Pré-tratamentos que proporcionam a recuperação da hemicelulose em oligossacarídeos desempenham um papel fundamental na obtenção de xilooligossacarídeos (XOS), compostos amplamente utilizados nas indústrias alimentícia e farmacêutica devido às suas propriedades prebióticas (Qaseem, Shaheen e Wu, 2021).

Os monossacarídeos derivados da hemicelulose possuem diversas aplicações biotecnológicas (Figura 5). Entre os produtos derivados da fração C5, o xilitol é um dos mais amplamente utilizados, sendo produzido industrialmente pela hidrogenação da xilose por

leveduras e aplicado na remineralização dentária e como adoçante na indústria farmacêutica. A xilose, por exemplo, pode ser convertida em 2,3-butanodiol, um polímero versátil utilizado como plastificante, aditivo para combustíveis e agente de liberação controlada de fármacos. Essa conversão é realizada por bactérias e leveduras, como *Serratia marcescens*, *Bacillus spp.* e *Klebsiella spp.* (Petrova, Petlichka e Petrov, 2020; Qaseem, Shaheen e Wu, 2021). Já o biobutanol, biocombustível de segunda geração com alta eficiência energética e baixa corrosividade, pode ser produzido a partir da xilose por *Clostridium spp.*, incluindo *C. acetobutylicum* e *C. beijerinckii*, capazes de converter xilanas em butanol. Além disso, linhagens recombinantes de *Bacillus spp.*, *E. coli* e *S. cerevisiae*, modificadas com genes de xilose isomerase e xiluloquinase, foram desenvolvidas para produção em larga escala (Brat e Boles, 2013; Felpeto-Santero *et al.*, 2015).

Figura 5 - Usos biotecnológicos da xilose, principal açúcar da fração hemicelulósica, e microrganismos associados às diferentes rotas de conversão. (*) Microrganismos geneticamente modificados.



Fonte: Elaboração própria com base em Qaseem, Shaheen e Wu, 2021.

Outro composto promissor derivado da xilose é o ácido succínico, amplamente utilizado nas indústrias farmacêutica, cosmética, de polímeros e bioplásticos. Além de ser um precursor de ésteres de perfume, medicamentos, biopolímeros e resinas (PBS e poliamidas), o ácido succínico pode ser convertido em biocombustíveis (Ésteres de 4-butanodiol) e aditivos industriais (Salvachúa *et al.*, 2016; Saxena *et al.*, 2017). Outras bioconversões relevantes incluem a produção de ácido láctico, usado em muitas indústrias, desde a indústria alimentícia como agente aromatizante, conservante, regulador de pH, e na indústria farmacêutica (Semkiv *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2020).

Diante da ampla gama de aplicações da hemicelulose, destaca-se seu uso crescente na produção de vetores energéticos, como H_2 e CH_4 (Jiang *et al.*, 2023; Mattiello-Francisco *et al.*, 2024; Ranganathan *et al.*, 2025; Tomasini, Faber e Ferreira-Leitão, 2022). Embora considerada um resíduo no ciclo produtivo do etanol de segunda geração, essa fração tem sido valorizada dentro do conceito de biorrefinaria da cana-de-açúcar. Sua conversão em biogás não apenas maximiza o aproveitamento da biomassa, mas também integra a geração de energia ao próprio setor, promovendo maior eficiência e sustentabilidade no processo.

Nesse contexto, o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos para a produção de biocombustíveis e bioquímicos emerge como uma solução estratégica e sustentável, combinando abundância, viabilidade econômica e distribuição geográfica favorável. A implementação de cadeias produtivas locais reduz custos logísticos e impactos ambientais, fortalecendo a economia circular ao minimizar desperdícios e agregar valor à resíduos da agroindústria. Além disso, ao não competir com a produção de alimentos, o uso de biomassa residual reforça sua importância na transição para um modelo energético mais sustentável, contribuindo para a descarbonização e a redução da dependência de combustíveis fósseis.

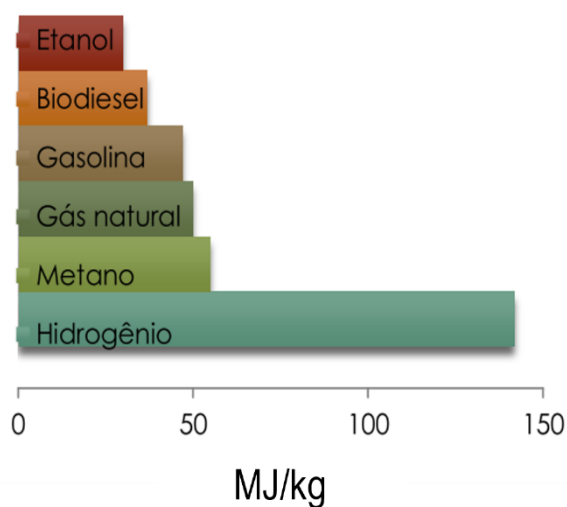
2.2 HIDROGÊNIO

O hidrogênio é reconhecido como um elemento abundante, embora raramente encontrado de forma isolada na natureza (Lozano-Martín, Moreau e Chamorro, 2022). Na maioria dos casos, ocorre na forma diatômica (H_2), apresentando-se em estado gasoso em condições ambientes. Esse elemento desempenha um papel essencial em diversas aplicações industriais, com destaque para o hidrocraqueamento de petróleo. Nesse processo, hidrocarbonetos pesados são transformados em cadeias mais leves, combinando técnicas de craqueamento catalítico com hidrogenação, sendo uma etapa fundamental no refino de petróleo. Nos setores siderúrgicos, pode ser utilizado no refino de metais como níquel, tungstênio,

molibdênio, cobre, zinco, urânio e chumbo (Gunathilake *et al.*, 2024). Há projeção de outros usos industriais para o H₂ visto que a demanda global em 2023 atingiu 97 Mt e em 2024 foi de 100 Mt (IEA, 2024).

Essas novas aplicações, como no transporte de longa distância e no armazenamento de energia, têm o potencial de desempenhar um papel crucial na transição para energias limpas, já que o H₂ é um vetor energético de elevado poder calorífico (141,9 MJ/kg) (Figura 6) e combustão limpa ($\text{H}_2 + \frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$) (Castellanos-Sánchez *et al.*, 2024). Esse elemento pode ser utilizado tanto em veículos convencionais quanto híbridos, na geração de eletricidade por células a combustível, na produção de combustíveis sintéticos para aviação e transporte marítimo, bem como na fabricação de fertilizantes e no fornecimento de energia e matéria-prima para indústrias de alta intensidade energética, como o setor siderúrgico (ABH2, 2024; Lozano-Martín, Moreau e Chamorro, 2022). Apesar de um crescimento de 40% em relação a 2022, a participação do H₂ na demanda energética global ainda permanece abaixo de 1% (IEA, 2024).

Figura 6 - Poder calorífico dos compostos comumente utilizados como combustível.

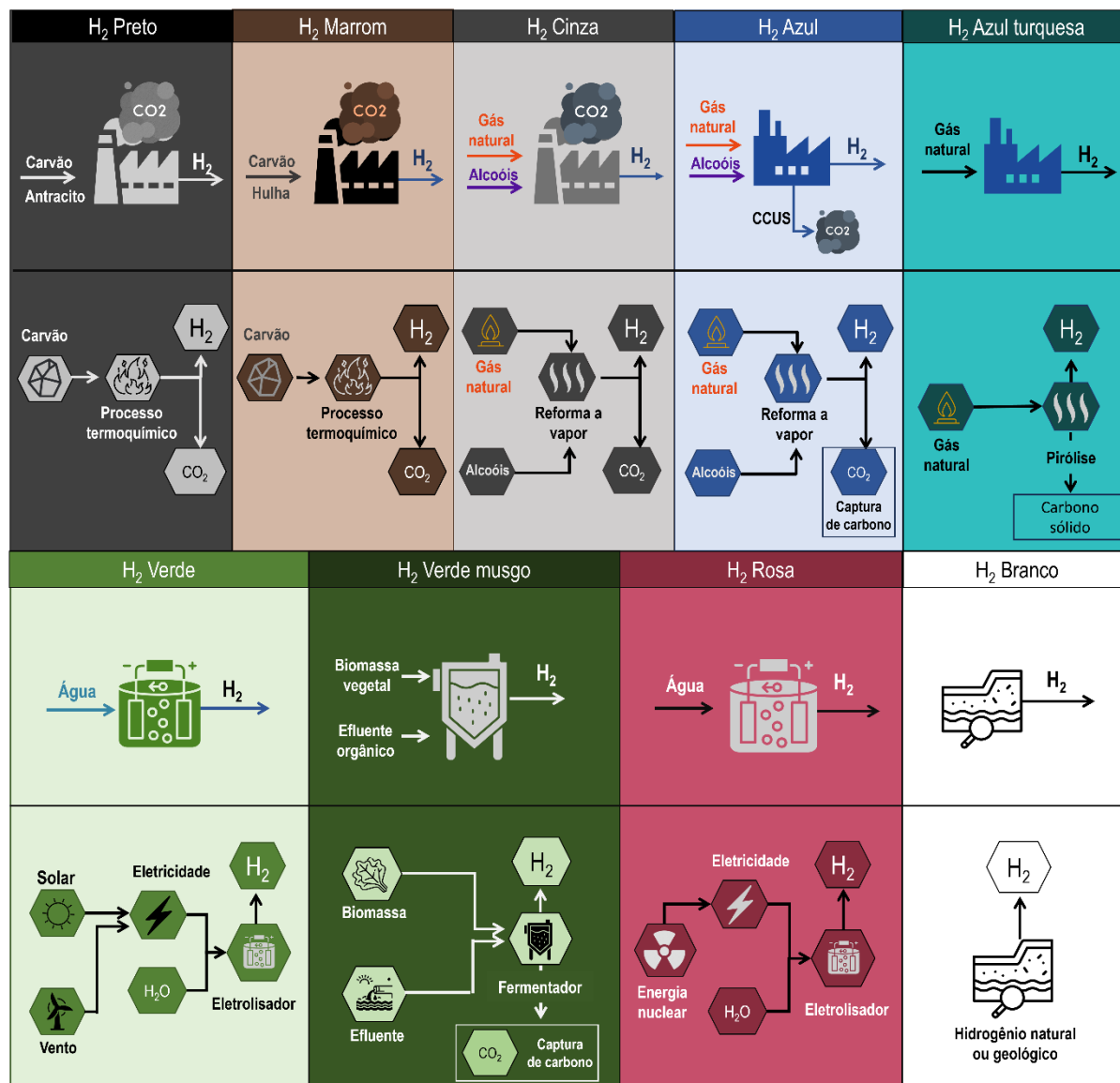


Fonte: Elaboração própria com base em Thungklin, Sittijunda e Reungsang, 2018

O uso do H₂ como fonte sustentável de energia está diretamente relacionado à rota tecnológica empregada em sua produção. O H₂ é classificado nacionalmente em diferentes categorias — preto, marrom, cinza, azul, azul turquesa, verde, verde musgo, rosa e branco — conforme o método utilizado para sua obtenção e o impacto ambiental associado (Figura 7). O H₂ verde distingue-se pela produção isenta de emissões de carbono, geralmente por meio de eletrólise da água utilizando energia renovável. Nesta categoria também se enquadra a produção

de H₂ verde musgo por vias bioquímicas por meio da fermentação de resíduos e efluentes orgânicos processo que pode ou não incorporar etapas de captura do CO₂ gerado durante a fermentação (Samrot *et al.*, 2023). Por outro lado, o H₂ azul e o cinza são obtidos a partir de fontes fósseis, como o gás natural, diferenciando-se pela adoção ou não de tecnologias de captura e armazenamento de carbono (CCUS). Já o H₂ gerado pela gaseificação do carvão é denominado preto e marrom, dependendo do tipo de carvão empregado no processo (Gunathilake *et al.*, 2024). O H₂ rosa, por sua vez, é gerado por eletrólise da água utilizando energia nuclear, embora esse processo enfrente limitações relacionadas à gestão de resíduos radioativos e questões de segurança. Já o H₂ branco possui origem geológica, sendo extraído de reservas naturais subterrâneas e ainda permanece pouco explorado comercialmente (EPE, 2021).

Figura 7 - Classificação do hidrogênio em diferentes categorias de cores — preto, marrom, cinza, azul, azul turquesa, verde, verde musgo, rosa e branco — de acordo com o método de produção utilizado.



Fonte: Elaboração própria adaptado de Hematpur *et al.*, 2023 e EPE, 2021.

A produção de H₂ ainda depende majoritariamente de fontes fósseis, especialmente no processo de reforma do gás natural (IEA, 2024). Em 2023, essa indústria foi responsável pela emissão direta de aproximadamente 680 milhões de toneladas de CO₂, o que representou um aumento de 0,6% em relação a 2022. Vale destacar que existem poucos projetos focados na captura de CO₂ no subsolo, dificultando o alcance dos objetivos de neutralidade de carbono até 2050 estabelecidos no Acordo de Paris (ONU, 2021).

O Brasil possui potencial para se destacar estrategicamente no mercado global de H₂ sustentável, posicionando-se como um dos países com maior capacidade de produção de H₂ de baixo carbono a custos competitivos (ABH2, 2024). Há um avanço expressivo nas tecnologias

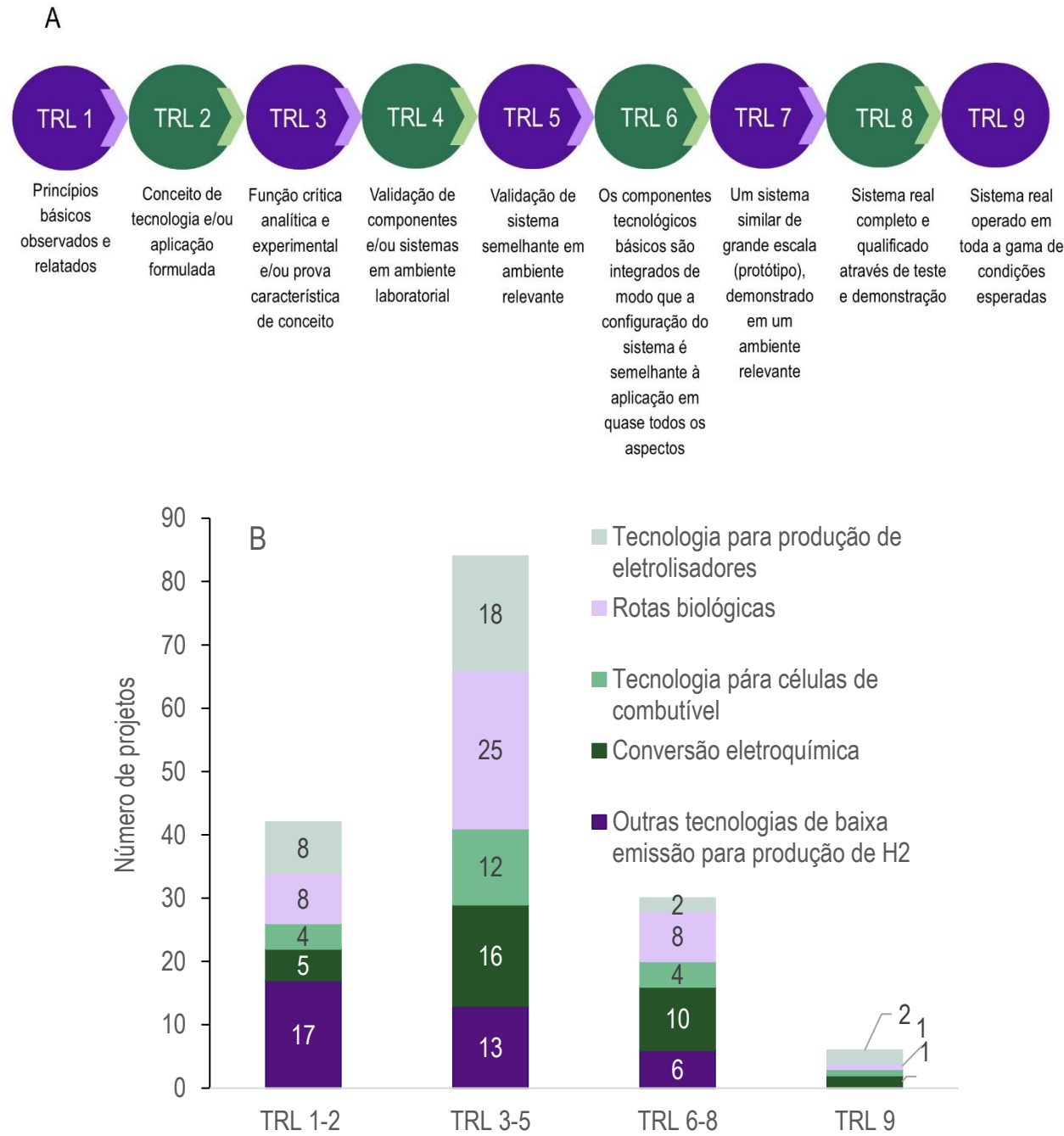
de conversão eletroquímica, que utiliza eletricidade renovável de fonte solar e eólica para produzir H_2 e outros compostos verdes, como amônia e metanol. Neste cenário, a primeira planta de H_2 verde a entrar em produção no Brasil foi a da usina hidrelétrica de Itumbiara (MG) em 2021 com capacidade de produção é de cerca de 100 kg/dia de H_2 (DCA.P, 2023). No complexo do Pecém no Ceará está concentrado o maior polo de H_2 verde (H_2V) do Brasil devido ao seu potencial solar e eólico, localização e infraestrutura para escoamento do produto. A empresa australiana Fortescue investiu em projetos bilionários em produção de H_2V e planeja produzir 837 toneladas/dia de H_2 verde e 5 mil toneladas/dia de amônia verde a partir do consumo de 2,1 mil megawatts (MW) de energia elétrica (SEMASE, 2023; Rodrigues, 2023). A empresa francesa Qair também está com projetos de produção de H_2V no Complexo Industrial e Portuário do Pecém e a expectativa é que comece a operar em 2027 com a produção de 42 mil toneladas/dia de H_2 . Não pretendem, no momento, produzir amônia para exportação, apenas H_2 para o mercado interno (Lemos, 2024; SEMASE, 2024). O Porto de Suape (PE), Antonina (PR) e Paranaguá (PR) e Açú (RJ) também possuem projetos em desenvolvimento para produção de H_2V no país em parceria com empresas como a Shell, Neoenergia, Fuella, com o apoio da Allianz Capital Partners (Machado, 2024).

Em termos de prontidão tecnológica, levantamento da Associação Brasileira do Hidrogênio (ABH2) mostra que a maioria dos projetos de PD&I em H_2 no Brasil está concentrada nos níveis intermediários de maturidade tecnológica (TRL 3-5), correspondendo a 51,9% das iniciativas (Figura 8). Essa faixa reflete um setor em transição, com foco na aplicação prática e em testes-piloto. Destacam-se 25 projetos voltados à produção biológica de H_2 , com base em resíduos agrícolas e urbanos, abrangendo 13 estados e envolvendo parcerias com empresas como Petrobras, Siemens, ArcelorMittal e BMW. As tecnologias voltadas à conversão eletroquímica de energia (eletrólise da molécula da água) somam 18 projetos, com destaque para colaborações com COPEL, Total e Petrogal (ABH2, 2024).

Conforme mostra a Figura 8, nos níveis iniciais (TRL 1-2), que representam 25,9% do total, há forte presença de pesquisas em eletrolisadores e conversão de biomassa, demonstrando o interesse crescente nessas tecnologias. Já os TRLs mais avançados (6-8) somam 18,5%, com 8 projetos em produção biológica de H_2 (digestão anaeróbia e gaseificação) apoiados por instituições como as Universidades Federais de Itajubá e da Bahia, em parceria com Copel, Petrobras e Renault. Por fim, o TRL 9, que representa 3,7% das iniciativas, reúne tecnologias próximas da comercialização, envolvendo conversão eletroquímica à H_2 com destaque para instituições como USP, UNICAMP e Instituto de Energia da USP, que lideram colaborações

com empresas e agências como FINEP, FAPESP, Shell, TotalEnergies e Petronas (ABH2, 2024).

Figura 8 - Representação dos conceitos relacionados aos Níveis de Maturidade Tecnológica (Technology Readiness Levels – TRLs) (A). Panorama das pesquisas em hidrogênio verde no Brasil, com indicação dos respectivos TRLs alcançados para cada tecnologia (B).



Fonte: ABH2, 2024

O setor de H₂ no Brasil vem se destacando pelo forte investimento em rotas de conversão biológica, impulsionado pela robusta capacidade da indústria agrícola nacional em transformar

biomassa em energia. Essa estratégia se apoia na consolidada expertise brasileira em biocombustíveis e no potencial do país para se tornar um ator global relevante no desenvolvimento de soluções sustentáveis para a produção de hidrogênio renovável.

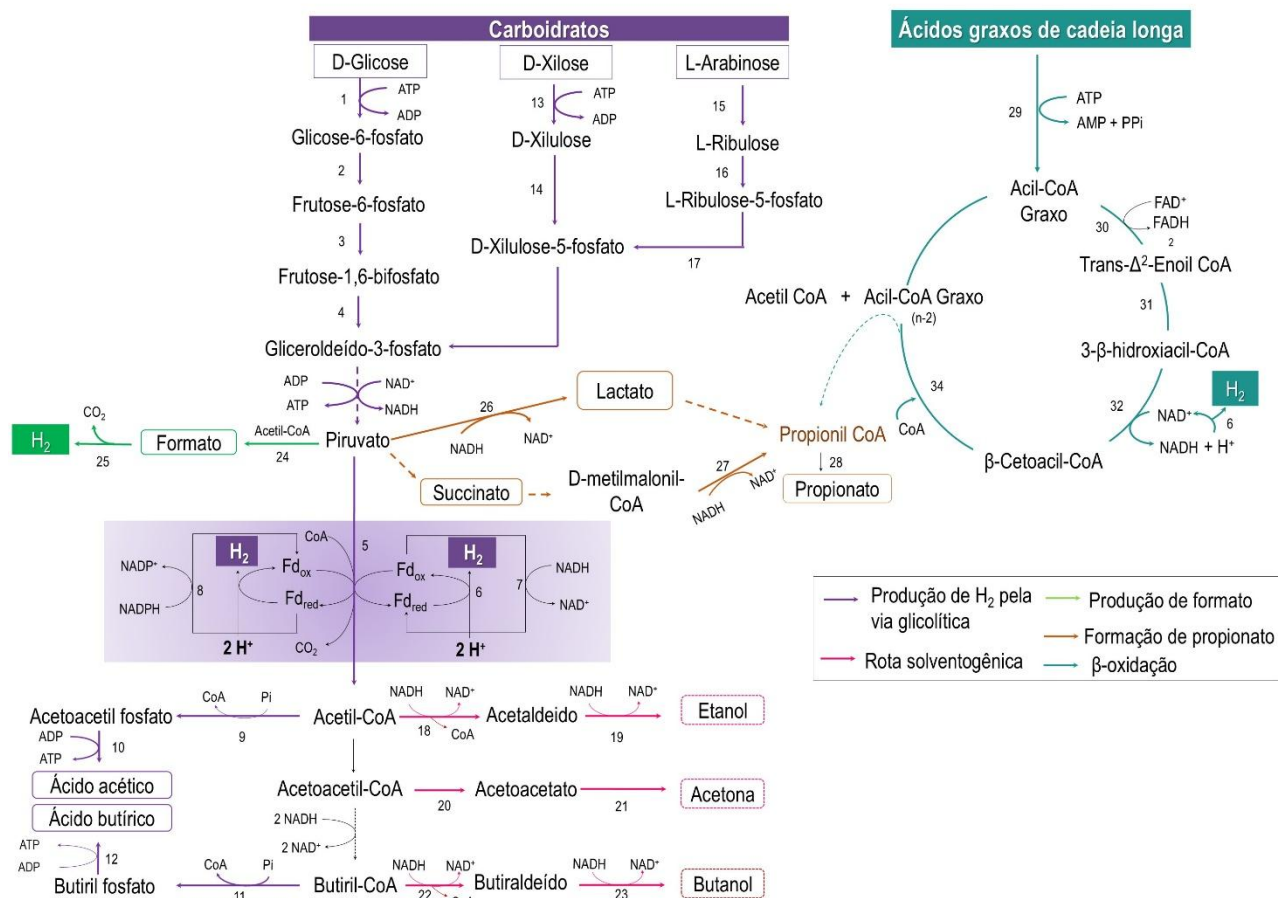
O aproveitamento de biomassas e efluentes provenientes de indústrias agrícolas, alimentícias e de setores urbanos (aterros sanitários e estações de tratamento de esgoto) representa uma abordagem estratégica. Ao integrar a geração de energia com o tratamento de resíduos, essa rota agrega valor a materiais subutilizados e contribui para a economia circular.

Nesse contexto, os processos fermentativos, uma alternativa biotecnológica promissora, permitem a conversão de compostos orgânicos (carboidratos, lipídios e aminoácidos) em hidrogênio, dióxido de carbono, ácidos orgânicos e álcoois, por meio da ação de microrganismos anaeróbios estritos ou facultativos. O desenvolvimento dessas tecnologias sustentáveis é fundamental diante dos desafios globais de descarbonização e da necessidade de uso eficiente de matérias-primas renováveis e residuais.

2.2.1 Produção biológica de H₂ via processo fermentativo

A fermentação, também conhecida como “fermentação escura” (*dark fermentation* em inglês), é um processo no qual microrganismos anaeróbios sintetizam H₂ a partir de substratos como carboidratos, ácidos graxos, determinados ácidos e álcoois. A taxa de produção de H₂ depende das vias metabólicas e da sequência de reações bioquímicas adotadas por diferentes microrganismos. A Figura 9 mostra sequências de reações bioquímicas para a produção de H₂ a partir de carboidratos e ácidos graxos.

Figura 9 - Principais rotas metabólicas em um consórcio microbiano durante a fermentação de substratos, incluindo carboidratos e ácidos graxos.



Fonte: Elaboração própria a partir de Ding, C., Yang e He, 2016; Nelson e Cox, 2014; SÁ, 2015. Enzimas: (1) Hexocinase; (2) Glicose-6-fosfato isomerase; (3) Frutose bifsosfatase; (4) Aldolase; (5) Piruvato-ferredoxina oxidoreductase; (6) Hidrogenase; (7) NADH-ferredoxina oxidoreductase; (8) NADPH-ferredoxina oxidoreductase; (9) Fosfotransacetilase cinase; (10) Acetato liase; (11) Fosfotransbutilase cinase; (12) Butirato cinase; (13) Xilose isomerase; (14) Xilulosecinase; (15) L-arabinose isomerase; (16) L-ribulose-5-fosfato; (17) L-ribulose-fosfato-4-epimerase; (18) Acetaldeído desidrogenase; (19) Etanol desidrogenase; (20) β-hidroximetil-glutaril-CoA liase; (21) Acetato decarboxilase; (22) Butiraldeído desidrogenase; (23) Butanol desidrogenase; (24) Acetato-formato liase; (25) Formato-hidrogenase liase; (26) Lactato desidrogenase; (27) Metilmalonil-CoA decarboxilase; (28) Propionato CoA-transferase; (29) Acil-CoA graxo sintetase; (30) Acil-CoA desidrogenase; (31) Enoil-CoA hidratase; (32) 3L-hidroxiacil-CoA desidrogenase; (33) NADH desidrogenase; (34) β-cetotiolase.

Microrganismos anaeróbios estritos ou facultativos possuem a capacidade de converter carboidratos e lipídios em H₂, CO₂, ácidos graxos voláteis e álcoois (RAJENDRAN et al., 2020). A oxidação destes substratos gera gliceroldeído-3-fosfato e de NADH, e posteriormente, piruvato (Dai et al., 2019; Nelson e Cox, 2014).

A produção de H₂ pelos microrganismos anaeróbios provem da oxidação do piruvato em acetil-CoA, a qual é realizada pela enzima piruvato-ferredoxina oxidorreductase (PFOR) e com geração de CO₂ (Toledo-Alarcón et al., 2018). A fosforilação da acetil-CoA é realizada por meio da fosfotransacetilase ou fosfotransbutilase, em que são gerados ácido acético e ácido

butírico, respectivamente e ATP. A ferredoxina é reduzida para a formação destes ácidos e transfere elétrons para as enzimas hidrogenases que utilizam do H^+ comoceptor final de elétrons. Sucessivamente, a ferredoxina é reoxidada, liberando a molécula de H_2 (Ding, C, Yang e He, 2016; MONTTOYA, 2019). Bactérias formadoras de endósporos, como *Clostridium sp.*, *Bacillus sp.* e *Ruminococcus*, são microrganismos representativos da via aceto-butírica (Mazareli *et al.*, 2019; Patakova *et al.*, 2022). Teoricamente, a produção de H_2 a partir de carboidratos varia conforme o ácido formado: 4 mols de H_2 são gerados por mol de glicose associado à produção de ácido acético (Reação 1) e 2 mols quando associado à produção de ácido butírico (Reação 2) (Couto, P T *et al.*, 2020; Wang e Yin, 2018a), conforme mostrado na Tabela 2. Para pentoses, são produzidos 3,33 mols de H_2 por mol de açúcar quando direcionados à formação de ácido acético (Reação 3), e 1,66 mol quando associados à formação de ácido butírico (Reação 4).

Em um processo fermentativo utilizando um consórcio microbiano, parâmetros como a concentração de substrato e ácidos graxos voláteis, pH, e pressão parcial de H_2 no reator determinam a via metabólica adotada pelas bactérias. Microrganismos do gênero *Clostridium* podem desviar a via metabólica oxidativa para a redutora em condições de elevada pressão parcial de H_2 , alta concentração de substratos e ácidos, pH ácido, no qual, havendo acetoacetil-CoA, butiril-CoA e acetil-CoA, como compostos intermediários, H^+ é utilizado como agente oxidante do NADH, regenerando NAD^+ e contribuindo para a produção de acetona, butanol e etanol (Reações 18, 19 e 20) (Patakova *et al.*, 2022). Esta via é conhecida como solventogênese ou fermentação ABE, rota metabólica concorrente à via de produção de H_2 (Chi *et al.*, 2019; Fonseca *et al.*, 2021; Thaddeus Ezeji, Nasib Qureshi, 2007).

Na fermentação entérica, o piruvato é convertido em formato e Acetil-CoA pela enzima acetato-formiato liase. Alguns microrganismos, como *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Rhodospirillum rubrum*, *Methanobacterium formicicum* e *E. coli*, possuem o complexo formiato-hidrogenase-liase (complexo FHL), que contém classes de hidrogenases como a [NiFe] hidrogenase ou a [FeFe] hidrogenase, as quais convertem o ácido fórmico em H_2 e CO_2 (Reação 9) (Tedsree *et al.*, 2011; Vardar-Schara, Maeda e Wood, 2008).

Tabela 2 – Principais reações químicas envolvidas nas etapas de acidogênese, acetogênese, homoacetogênese, solventogênese e metanogênese durante a digestão anaeróbia. A etapa fermentativa corresponde ao processo de acidogênese. ΔG° (kJ) corresponde a variação da energia livre de Gibbs padrão (25 °C e 1 atm) de uma reação química.

Substrato		ΔG° (kJ)	Produto	Reação (n)	Referência
Acidogênese					
Hexoses	$C_6H_{12}O_6 + 2 H_2O \rightarrow 2 CH_3COOH + 4 H_2 + 2 CO_2$	-206,00	H ₂ + Acetato	1	Couto, P T <i>et al.</i> , 2020; Wang e Yin, 2018b
	$C_6H_{12}O_6 + 2 H_2O \rightarrow CH_2(CH_2)_2COOH + 2 H_2 + 2 CO_2$	-254,00	H ₂ + Butirato	2	
Pentoses	$C_5H_{10}O_5 + 1,67 H_2O \rightarrow 1,67 CH_3COOH + 3,33 H_2 + 1,67 CO_2$	-218,6	H ₂ + Acetato	3	Abdul <i>et al.</i> , 2013
	$C_5H_{10}O_5 \rightarrow 0,83 CH_2(CH_2)_2COOH + 1,67 H_2 + 1,67 CO_2$	-257,4	H ₂ + Butirato	4	
	$3 C_5H_{10}O_5 + 5 H_2 \rightarrow 5 C_3H_6O_2 + 5 H_2O$	-473,00	Propionato	5	Mockaitis <i>et al.</i> , 2020
Glicerol	$C_3H_8O_3 + H_2O \rightarrow CH_3COOH + CO_2 + 3 H_2$	-70,34	H ₂ + Acetato	6	Couto, P T <i>et al.</i> , 2020; Zheng <i>et al.</i> , 2023
	$2 C_3H_8O_3 + H_2O \rightarrow CH_2(CH_2)_2COOH + 2 CO_2 + 4 H_2$	-206,3	H ₂ + Butirato	7	
Lactato + ácido acético	$2CH_3H_6O_3 + CH_3COOH \leftrightarrow H_2 + 1,5 CH_3CH_2CH_2COOH + CO_2 + H_2O$	-56,3	H ₂ + Butirato	8	Saady, 2013
Formato	$HCOOH \leftrightarrow CO_2 + H_2$	-48,4	H ₂	9	Tedsree <i>et al.</i> , 2011
Hexoses	$C_6H_{12}O_6 + 2 H_2 \rightarrow 2 CH_3CH_2COOH + 2 H_2O$	-279,4	Propionato	10	Saady, 2013
	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHOHCOOH + H^+$	-225,4	Lactato	11	Saady, 2013
Lactato + acetato	$2 CH_3CHOHCOOH + CH_3COOH \rightarrow C_6H_{12}O_2 + 2 HCO_3^-$	-53,00	Butanoato	12	Menezes, de <i>et al.</i> , 2023
Lactato	$CH_3CHOHCOOH + H_2 \rightarrow CH_3CH_2COOH + H_2O$	-81,20	Propionato	13	Menezes, de <i>et al.</i> , 2023
Acetogênese					
Propionato	$CH_3CH_2COOH + 2 H_2O \rightarrow CH_3COOH + 3 H_2 + CO_2$	+76,2	Acetato	14	Saady, 2013
Butirato	$CH_3CH_2CH_2COOH + 2H_2O \rightarrow 2 CH_3COOH + 2 H_2$	+48,4	Acetato	15	Saady, 2013
Lactato	$3 CH_3CHOHCOOH \rightarrow 2 CH_3CH_2COOH + CH_3COOH + HCO + H^+$	-165,00	Propionato + acetato	16	Saady, 2013

Homoacetogênese					
Hidrogênio	$4 \text{ H}_2 + 2 \text{ CO}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{ H}_2\text{O}$	-104,0	Acetato	17	Saady, 2013
Solventogenesis					
Hexoses	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 2 \text{ CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 2 \text{ CO}_2$	-164,8	Etanol	18	Saady, 2013
Pentoses	$3 \text{ C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5 \rightarrow 5 \text{ C}_2\text{H}_6\text{O} + 5 \text{ CO}_2$	-609,0	Etanol	19	Mockaitis <i>et al.</i> , 2020
Acetato	$\text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{ H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$	-37,8	Etanol	20	Mockaitis <i>et al.</i> , 2020
Metanogênese					
Hidrogênio	$4 \text{ H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{ H}_2\text{O}$	-135,00	Metano	21	Couto, P T <i>et al.</i> , 2020; Saady, 2013
Acetato	$\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	-35,87	Metano	22	
Formato	$4 \text{ HCOOH} + \text{CH}_4 \rightarrow 3 \text{ CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	-304,2	Metano	23	
Metanol	$4\text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	-312,8	Metano	24	

Outra possibilidade é a redução do piruvato a ácido láctico por enterobactérias, mediada pela enzima lactato desidrogenase, o que resulta na ausência de produção de H_2 (Reação 11). Além disso, é comum em reatores com presença de *Lactobacillus* a clivagem do ácido láctico em ácidos acético e propiônico (Reação 14) (Fuess, 2024). A via do acrilato é adotada por microrganismos como *Clostridium propionicum*, *Coprococcus catus*, *Clostridium homopropionicum*, *Megasphaera elsdenii* e *Prevotella ruminicola* na conversão de lactato em propionato (Reação 13) (Menezes, de *et al.*, 2023; Reichardt *et al.*, 2014; Vidra e Németh, 2018).

Além disso, o propionato também pode ser produzido a partir da oxidação de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) com número ímpar de átomos de carbono. A primeira etapa da oxidação de AGCL é ativada com a síntese de acil-CoA catalisada pela acil-CoA sintetase de ácidos graxos; o acil-CoA é repetidamente metabolizado em ciclos de β -oxidação, nos quais dois átomos de carbono são removidos do acil-CoA de ácidos graxos a cada ciclo (Figura 9). O acil-CoA graxo oxidado passa por uma etapa de hidratação catalisada pela enoil-CoA hidratase, na qual uma molécula de água é adicionada à ligação dupla, resultando na formação de 3L-hidroxiacil-CoA. O H_2 é gerado na terceira reação oxidativa do ciclo, durante a conversão de 3-L-hidroxiacil-CoA em β -Cetoacil-CoA, catalisada pela 3L-hidroxiacil-CoA desidrogenase. Nessa etapa, os elétrons provenientes do NADH são transferidos para o próton (H^+), que atua comoceptor final de elétrons, em uma reação mediada pela NADH desidrogenase, resultando na formação de H_2 . Em seguida, o β -Cetoacil-CoA reage com uma CoA livre em uma reação catalisada pela acil-CoA-acetiltransferase, também conhecida como tiolase, resultando na clivagem do fragmento de dois carbonos do AGCL original na forma de acetil-CoA. Se AGCL contém número par de átomos de carbono, esta contempla a última reação do ciclo da β -oxidação. No caso de AGCL com número ímpar de átomos de carbono, no último ciclo do acil-CoA de ácidos graxos contendo cinco átomos de carbono, são formados acetil-CoA e propionil-CoA (Elsamadony *et al.*, 2021; Nelson e Cox, 2014).

Entre os diversos microrganismos produtores de H_2 , os anaeróbios estritos são os mais investigados. Esses microrganismos obtêm ATP principalmente por meio da fosforilação em nível de substrato e são incapazes de crescer na presença de oxigênio (Cao *et al.*, 2022). Entre os gêneros mais estudados incluem *Clostridia*, bactérias que apresentam alta taxa de produção natural de H_2 por fermentação e possuem a capacidade de formar esporos, o que lhes confere resistência a altas temperaturas e facilita seu manuseio em aplicações industriais. Além disso, os esporos gerados em condições de temperatura elevada podem ser reativados quando o

ambiente se torna favorável, restabelecendo as atividades metabólicas voltadas à produção de H_2 (Durre, 2005).

Essas bactérias são capazes de utilizar diversos substratos para a geração de H_2 , como glicose, xilose, lactose e sacarose (Durre, 2005). Recentemente, o genoma da *Clostridium acetobutylicum* foi complemente sequenciado, permitindo avanços significativos nas análises genômicas do gênero (Patakova *et al.*, 2022; Yoo, Nguyen e Soucaille, 2019). Exemplos de bactérias entéricas produtoras de H_2 são *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli* e *Citrobacter sp.* (Castelló *et al.*, 2020). A *Escherichia coli* é amplamente utilizada como um modelo de células para a produção de proteínas recombinantes e vários metabólitos de valor agregado, além de consumir diversos tipos de carboidratos. Considerando sua clara base genética e facilidade para manipulação de DNA, estratégias de engenharia metabólica têm sido empregadas para *E. coli* para aumentar sua capacidade de produção de H_2 (Lopez-Hidalgo *et al.*, 2021).

Muitas bactérias termofílicas anaeróbias demonstraram a capacidade de produzir H_2 em altas temperaturas, o que processa as vantagens da alta taxa de produção de gás, consumo reduzido de água para resfriamento, menores chances de contaminação da matéria-prima e maior transferência de massa. A fermentação termofílica será discutida no tópico 2.4.1.

Diferentes fatores são cruciais para uma produção satisfatória de H_2 . Nesse contexto, o uso de consórcios microbianos como inóculo para a fermentação oferece vantagens sobre culturas puras, uma vez que a diversidade de microrganismos presentes permite a degradação eficiente de diferentes substratos, como carboidratos, ácidos graxos, aminoácidos e lipídeos. No entanto, vale ressaltar que essa mesma diversidade metabólica pode levar a rendimentos mais baixos, pois diversos microrganismos competem pelos mesmos substratos e direcionam o metabolismo para rotas distintas (Hilgsmann *et al.*, 2011; Wang e Yin, 2019).

2.2.2 Digestão anaeróbia

A digestão anaeróbia é o processo de degradação de matéria orgânica por microrganismos anaeróbios estritos e facultativos, resultando na formação de gases como H_2 , CO_2 e CH_4 . Consórcios microbianos, como o lodo de estações de tratamento de esgoto, contêm microrganismos capazes de atuar de forma sinérgica nas quatro etapas desse processo: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (Figura 10) (Olatunji, Ahmed e Ogunkunle, 2021). A fermentação, destacada anteriormente, ocorre na fase hidrolítica-acidogênica da digestão anaeróbica.

A hidrólise, primeira etapa do processo e geralmente seu fator limitante a depender do teor de sólidos e/ou substratos complexos, consiste na degradação de compostos orgânicos complexos não dissolvidos, como polissacarídeos, proteínas e gorduras, em moléculas mais simples, como monossacarídeos, glicerol, aminoácidos e ácidos graxos (Swinbourn, Li e Wang, 2024). Os produtos solúveis dessa etapa são posteriormente convertidos, durante a fermentação, em ácidos orgânicos voláteis (como acetato, formato, lactato, propionato e butirato), álcoois, H_2 , CO_2 , amônia (proveniente do metabolismo de aminoácidos) e novas células microbianas. Bactérias acidogênicas são predominantemente anaeróbias estritas, porém algumas espécies facultativas podem reduzir a toxicidade para as arqueias na metanogênese ao remover o oxigênio do sistema (Swinbourn, Li e Wang, 2024).

Durante a acetogênese, ocorre a oxidação de ácidos orgânicos, álcoois, aminoácidos e outros metabólitos formados na fase anterior, resultando em produtos assimiláveis pelas arqueias metanogênicas, como H_2 , CO_2 e ácido acético. A homoacetogênese é realizada por microrganismos acetogênicos autotróficos para a produção de ácido acético, por meio da via redutiva do acetil-CoA, também conhecida como via de Wood-Ljungdahl, na qual dióxido de carbono (CO_2) e hidrogênio molecular (H_2) são convertidos em acetato (CH_3COO^-) (Reação 17 - Tabela 2) (Ragsdale e Pierce, 2008).

Em reatores operando em batelada e batelada alimentada, esses microrganismos podem consumir entre 11% e 43% do H_2 gerado, respectivamente (Saady, 2013). Pesquisadores continuam a explorar maneiras de melhorar as taxas e os rendimentos de produção de H_2 no processo fermentativo, enfrentando desafios impostos pela homoacetogênese, como controle cinético, termodinâmico e de agitação, além da remoção de CO_2 do *headspace* (Wooshin Park, Seung H. Hyun, Sang-Eun Oh, Bruce E. Logan, 2005).

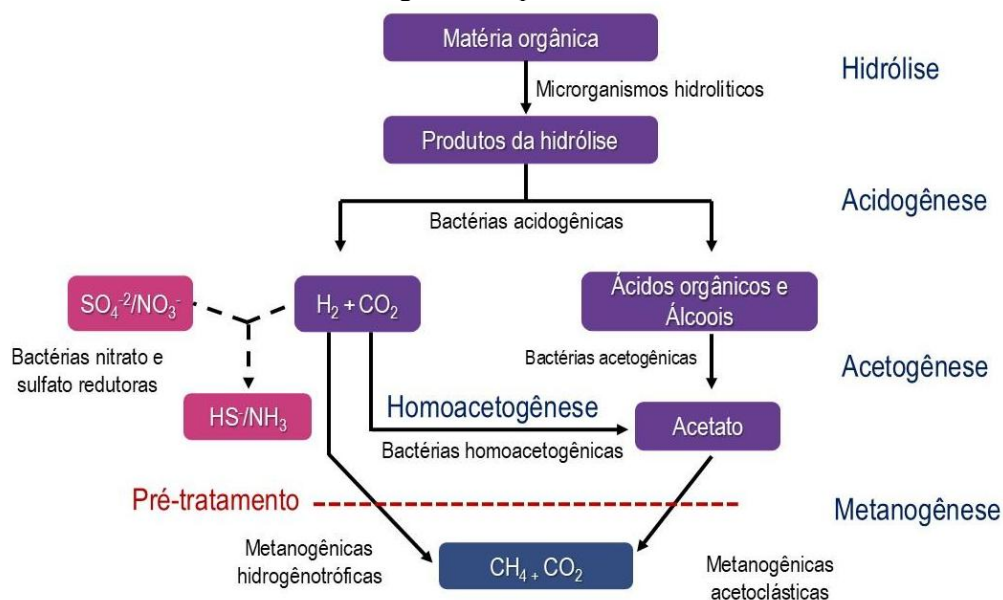
A acetogênese e a metanogênese ocorrem simultaneamente, sendo a metanogênese a etapa final da digestão anaeróbia. Nessa fase, arqueias metanogênicas convertem precursores metabólicos, como H_2 e ácido acético, em CH_4 (Reações 21 a 24 – Tabela 2). Aproximadamente 70% do CH_4 da digestão anaeróbia é produzido por metanogênicos acetoclásticos, que utilizam ácido acético como fonte de carbono (Reação 22 – Tabela 2), enquanto os 30% resultam da atividade de metanogênios hidrogenotróficos, que consomem H_2 e CO_2 para gerar CH_4 (Reação 21 – Tabela 2) (Swinbourn, Li e Wang, 2024). Entre os metanogênicos acetoclásticos, destacam-se as famílias *Methanosarcina*, que metaboliza diversos compostos, e *Methanotrix*, que utiliza exclusivamente acetato.

Os metanogênios hidrogenotróficos consomem H_2 , reduzindo sua disponibilidade e impactando processos dependentes desse gás. Para minimizar esse consumo e aumentar a

produção de H_2 , é essencial selecionar a comunidade microbiana, o que pode ser feito por meio do pré-tratamento do inóculo. Esse processo favorece o enriquecimento seletivo de microrganismos produtores de H_2 , ao mesmo tempo que reduz a população de consumidores desse gás.

O pré-tratamento, que pode ser químico (uso de ácidos ou bases) ou físico (ultrassonicação, irradiação ultravioleta, aeração, tratamento térmico, congelamento e descongelamento), submete os microrganismos a condições adversas, beneficiando bactérias esporulantes (Faloye, Gueguim Kana e Schmidt, 2013; Magrini *et al.*, 2021). Durante a esporulação, esses microrganismos formam endósporos altamente resistentes a fatores ambientais como calor, desidratação, radiação e produtos químicos. Esse processo é rigorosamente regulado, envolvendo a expressão de genes específicos e a formação de estruturas celulares especializadas (Palop, Mañas e Condón, 1999). Essa técnica permite a segregação das etapas de hidrólise-acidogênese e metanogênese, pois reduz a população de microrganismos não esporulantes, como as arqueias consumidoras de H_2 , enquanto favorece as bactérias esporulantes, mais adequadas à produção de H_2 (Appels *et al.*, 2008; Dai *et al.*, 2019; Faloye, Gueguim Kana e Schmidt, 2013; Magrini *et al.*, 2021).

Figura 10 – Etapas da digestão anaeróbia e indicação do pré-tratamento do inóculo para a separação das fases fermentativa e metanogênica do processo.



Fonte: Elaboração própria adaptado de Sá, 2015.

A separação das etapas da digestão anaeróbia em um consórcio microbiano permite a produção sequencial de H_2 e CH_4 . Na fase fermentativa, além da geração de H_2 , ocorre a

liberação de ácidos orgânicos, que podem ser reaproveitados em uma segunda etapa com um inóculo não pré-tratado. Esse inóculo, rico em arqueias metanogênicas, consome os ácidos orgânicos para a conversão em CH₄. A produção sequencial será abordada com mais detalhes no próximo tópico.

Essa abordagem melhora a gestão de resíduos ao mesmo tempo em que contribui para metas energéticas sustentáveis. Além da produção de biogás, o digestato resultante apresenta um alto teor de nutrientes essenciais, como nitrogênio, potássio e fósforo, permitindo seu uso como biofertilizante. A aplicação desses biofertilizantes pode reduzir em até 50% a necessidade de fertilizantes minerais NPK, favorecendo o crescimento das plantas e diminuindo o consumo energético associado à produção desses insumos (Swinbourn, Li e Wang, 2024). Diante disso, países com forte atividade agrícola e baixa produção de fertilizantes minerais, como o Brasil, devem adotar estratégias sustentáveis para garantir a disponibilidade de nutrientes na agricultura.

2.2.2.1 Produção sequencial de H₂ e CH₄

Conforme discutido anteriormente, uma pequena porção da carga orgânica do sistema é reduzida na produção de H₂, representando cerca de 10–20% do total de DQO, associada ao crescimento celular e à produção de polímeros extracelulares (Zhang *et al.*, 2017). A DQO remanescente (80–90%) corresponde aos metabólitos solúveis presentes no efluente do processo (EPH), formados durante a fase acidogênica (Sukphun *et al.*, 2023). Uma alternativa para a recuperação de energia e redução de matéria orgânica é a recuperação deste EPH como matéria-prima para a produção sequencial de CH₄. Nesse sistema integrado, a fase acidogênica, realizada com inóculo pré-tratado, promove a geração de H₂ e ácidos orgânicos, enquanto a fase metanogênica subsequente, utilizando inóculo *in natura*, converte os compostos orgânicos remanescentes em CH₄, representando uma redução de 80% - 90% do DQO, maximizando assim, o aproveitamento energético do processo (Rajendran *et al.*, 2020).

O uso de dois reatores para a separação de fases em sistemas de digestão anaeróbia foi inicialmente proposto por Pohland e Ghosh, em 1971 (Pohland e Ghosh, 1971). Essa abordagem buscava trazer maior estabilidade ao processo, considerando que os dois principais grupos microbianos (bactérias e arqueias) diferem significativamente quanto à fisiologia, às exigências nutricionais, às taxas de crescimento, às características metabólicas e ao grau de sensibilidade ao estresse ambiental. Dessa forma, no reator acidogênico o ambiente é controlado para favorecer o crescimento e a atividade dos formadores de ácidos conjuntamente com a produção

de H_2 , enquanto o reator metanogênico recebe o efluente com metabólitos solúveis e é ajustado para proporcionar condições ideais ao desenvolvimento das arqueias metanogênicas. Essa configuração possibilita a aplicação de valores ótimos de pH distintos em cada fase, contribuindo para a regulação de sobrecargas orgânicas na etapa metanogênica e potencialmente eleva a produção de CH_4 .

A abordagem voltada à recuperação sequencial de H_2 e CH_4 foi explorada por Han (2005) em escala piloto utilizando resíduos alimentares e lodo granular como matéria-prima e inóculo, respectivamente. Os resultados mostraram que o biogás gerado na etapa acidogênica continha 18% de H_2 , enquanto o biogás produzido na etapa metanogênica apresentava 52% de CH_4 . Em ambas as fases, acidogênese e metanogênese, foi observada uma redução superior a 70% na DQO, indicando o êxito da operação em dois estágios (Han *et al.*, 2005).

Fasheun *et al.* (2024) demonstraram que a inclusão de um segundo estágio de digestão anaeróbia após a fermentação de amido de mandioca, tanto *in natura* quanto extrudado, aumentou significativamente a recuperação energética na forma de CH_4 . O sistema sequencial promoveu reduções de 92–93% na DQO. Notavelmente, o potencial energético do segundo estágio isolado foi até 15 vezes superior ao da digestão de estágio único, além de gerar biogás com alto teor de CH_4 (>80%), evidenciando o EPH como uma excelente matéria-prima para a geração de CH_4 (Fasheun, Sant’Ana da Silva, *et al.*, 2024).

A etapa acidogênica pode atuar como um pré-tratamento biológico eficaz para a fase metanogênica da digestão anaeróbia, contribuindo para a remoção ou redução de compostos tóxicos que inibem a atividade de arqueias metanogênicas. Essa função desintoxicante é especialmente relevante quando se utilizam substratos lignocelulósicos, cujos pré-tratamentos geram subprodutos como 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), furfural e ácido fórmico, conhecidos por prejudicarem a produção de CH_4 (Tomasini, Faber e Ferreira-Leitão, 2022). Tais compostos são significativamente menos tolerados por esses microrganismos do que por bactérias produtoras de H_2 (Fagbohunge *et al.*, 2016).

A digestão em dois estágios tem se mostrado vantajosa não apenas pela desintoxicação prévia, mas também pelo aumento na produtividade e no potencial energético, com maior produção de CH_4 (Faber, Meireles e Ferreira-Leitão, 2022; Fasheun, Sant’Ana da Silva, *et al.*, 2024; Toro *et al.*, 2021). Tais ganhos estão associados à capacidade da etapa acidogênica de modificar as características do meio, minimizando a inibição da metanogênese. Além disso, as bactérias tendem a apresentar μ_{max} mais elevado e tempo de duplicação reduzido, crescendo e metabolizando substratos em ritmo superior ao das arqueias, que possuem cinética mais lenta e maior suscetibilidade a oscilações ambientais. O ajuste do pH entre as fases pode ser decisivo,

especialmente para substratos de rápida fermentação, que acidificam o meio em curto prazo (Wang *et al.*, 2021).

Portanto, o processo sequencial não apenas possibilita a geração de dois vetores energético, o H_2 com alto poder calorífico, e o CH_4 , amplamente utilizado como substituto de combustíveis fósseis, como também permite a recuperação mais completa da energia contida na matéria orgânica de resíduos e efluentes. Além disso, essa separação de etapas contribui para minimizar a sobrecarga metabólica para os microrganismos no processo, reduzindo os riscos de colapso do sistema e aumentando a estabilidade operacional. A seguir, discute-se o panorama energético mundial e brasileiro, destacando as oportunidades e desafios para a integração de tecnologias baseadas em bioenergia

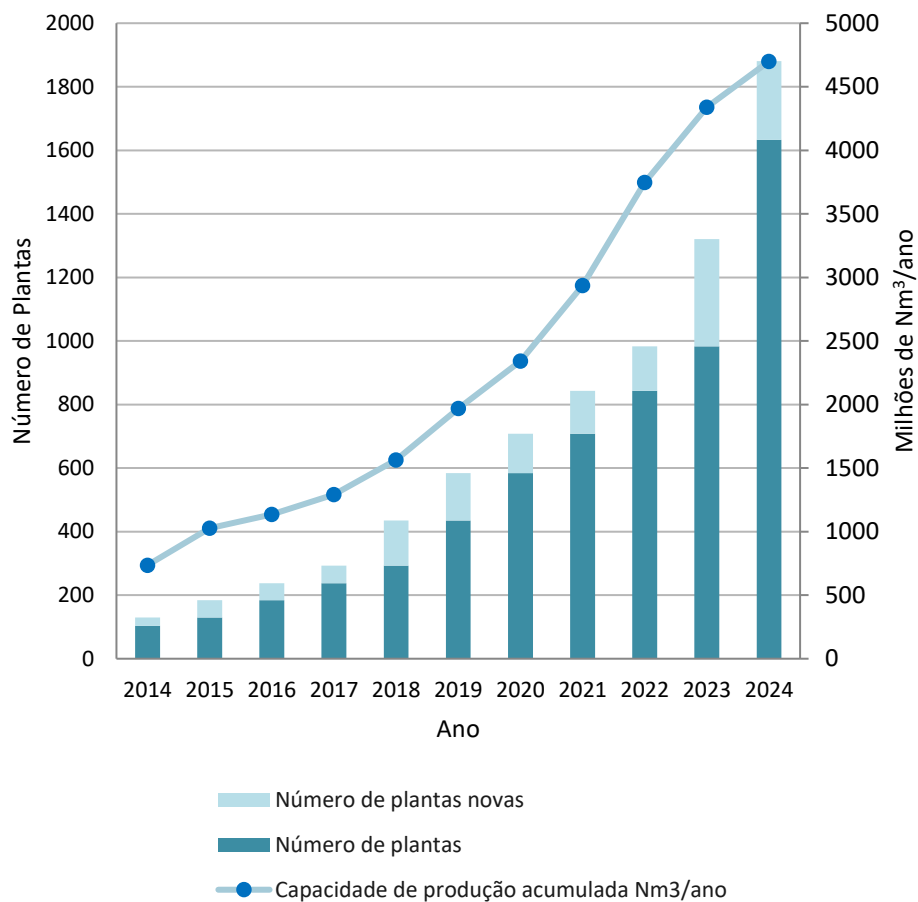
2.3 METANO

A distinção entre biogás e biometano é fundamental para compreender seu uso e regulamentação no setor energético. Ambos os gases são definidos por normativas da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), como a Resolução nº 886/2022, que estabelece suas classificações (ANP, 2022):

- I - biogás: gás bruto obtido da decomposição biológica de resíduos orgânicos;
- II - biometano: gás constituído essencialmente de metano, derivado da purificação do biogás;

O setor de biogás no Brasil continua em expansão, contando com 1.365 plantas cadastradas em 2023, um aumento de 32% em relação a 2022 (Figura 11). A capacidade instalada já supera 4 bilhões de Nm^3 por ano, com os resíduos da agropecuária sendo a principal matéria-prima utilizada (80%), seguida pelos resíduos industriais (20%) e pelos resíduos sólidos urbanos (9%). Em termos de aplicação, a geração de energia elétrica domina o setor, representando 86% do uso, enquanto 9% são destinados à energia térmica, 3% à produção de biometano e 0,4% à energia mecânica (CIBiogás, 2024).

Figura 11 - Evolução do número de plantas de biogás e da capacidade de produção acumulada (Nm³/ano) entre 2014 e 2022. O gráfico mostra o crescimento do número total de plantas (barras roxas), o número de novas plantas instaladas a cada ano (barras verdes) e a capacidade acumulada de produção de biogás (linha vermelha), indicando a expansão contínua do setor ao longo do período.



Fonte: (CIBiogás, 2024)

O biogás é composto por teores consideráveis de metano (40 – 80%) e dióxido de carbono (30 - 50%), além de baixas concentrações de outros gases como nitrogênio (0–3%), vapor de água (0–10%), oxigênio (0–1%), sulfeto de hidrogênio (H₂S) (0–1%), amônia (0–200 mg/m⁻³) e siloxanos (0–40 mg/m⁻³) (Khan *et al.*, 2021; Lóránt e Tardy, 2022; Mignogna *et al.*, 2023). Sua composição depende do substrato sendo digerido e consequentes propriedades delimitam suas possíveis destinações energéticas (Mignogna *et al.*, 2023). Para a sua injeção na rede de gás natural, é essencial remover o dióxido de carbono (CO₂), pois concentrações elevadas reduzem seu valor calorífico (Castellanos-Sánchez *et al.*, 2024; Lóránt e Tardy, 2022).

Além do CO₂, outros contaminantes afetam a qualidade e a aplicabilidade do biogás. O sulfeto de hidrogênio (H₂S), por exemplo, pode corroer componentes metálicos de caldeiras, motores de combustão interna e gasodutos, além de apresentar elevada toxicidade aos operadores das plantas (Ferruzzi *et al.*, 2023). Já os compostos de silício, quando presentes, tendem a se depositar nas paredes do motor, comprometendo o tubo de escape e o conversor

catalítico, especialmente em motores de combustão interna (Nair *et al.*, 2012). A presença de amônia e hidrocarbonetos halogenados também influencia as propriedades de ignição do biogás, além de causar corrosão em motores de cogeração e gasodutos após a combustão (Golmakani *et al.*, 2022).

A remoção desses compostos pode ser realizada por diversos métodos, conhecidos como melhoramento ou *upgrade* do biogás. Entre os processos físico-químicos utilizados, destacam-se: adsorção física por *water scrubbing*; adsorção química com solventes orgânicos ou solventes eutéticos; adsorção por oscilação de pressão; separação por membranas, incluindo membranas poliméricas, inorgânicas e mistas; separação criogênica; adsorção em superfície sólida; e adsorção com *biochar* (Khan *et al.*, 2021).

Entre os métodos biológicos, destaca-se o *upgrade* quimioautotrófico do biogás, no qual o CO₂ é convertido em CH₄ por microrganismos anaeróbios, como arqueias metanogênicas dos gêneros *Methanospirillum sp.*, *Methanococcus sp.*, *Methanosarcina sp.*, *Methanobacterium sp.*, *Methanoculleus sp.* e *Methanothermobacter sp* (Ács *et al.*, 2019). Essa conversão pode ocorrer de duas formas: *in situ*, quando o CO₂ e o H₂ gerados na digestão anaeróbia são convertidos em CH₄ diretamente no reator, e *ex situ*, quando uma fonte externa de CO₂ e H₂ é adicionada ao processo. Além disso, o melhoramento fotoautotrófico do biogás pode ser realizado por meio da captura de CO₂ e H₂S utilizando microalgas e cianobactérias procarióticas, promovendo uma abordagem sustentável para a purificação do biogás (Ács *et al.*, 2019).

Devido as suas características semelhantes às do gás natural, o biometano se apresenta como uma alternativa viável para diversas aplicações na rede de distribuição. No Brasil, a composição do biogás deve conter, no mínimo, 90% de metano antes de ser injetado nas redes de gás natural (ANP, 2022). Já na literatura, considera-se biometano o gás cuja composição possui pelo menos 95% de metano (IEA, 2022; Mignogna *et al.*, 2023). E neste contexto, uma das principais aplicações do biometano é como combustível para transporte automotivo (Pavičić *et al.*, 2022).

Além do setor de transportes, o biometano também desempenha um papel estratégico na indústria e em aplicações municipais. Equipamentos como caldeiras a gás e sistemas de cogeração de calor e eletricidade (CHP) já operam com gás natural e podem ser facilmente adaptados para o uso de biometano, facilitando a transição energética (Robson *et al.*, 2017). Veículos movidos a gás natural comprimido (GNC) e tecnologias associadas oferecem um caminho de menor resistência para a descarbonização da matriz energética, substituindo o gás fóssil por uma fonte renovável. Essa vantagem torna o biometano uma solução promissora para

a matriz de transportes brasileira, consolidando-se como um combustível sustentável e de baixo carbono.

O setor de biometano no Brasil registrou um crescimento significativo em 2023, com 50 plantas cadastradas, representando um aumento de 16% em relação a 2022. A produção também apresentou avanço expressivo, atingindo 114 mil Nm³, volume 19% superior ao produzido no ano anterior. Esse aumento reflete o potencial do biometano como fonte de energia limpa e renovável, contribuindo para a diversificação da matriz energética e a redução das emissões de gases de efeito estufa (Abiogás, 2024).

Em 2024, foi sancionada a Lei 14.993/2024, conhecida como Lei do Combustível do Futuro, um marco para o setor sucroenergético e a matriz energética brasileira (Agência Senado, 2024). Destaca-se, a criação do Programa Nacional de Descarbonização do Produtor e Importador de Gás Natural e de Incentivo ao Biometano, que visa fomentar a pesquisa, produção, comercialização e uso do biometano e do biogás na matriz energética nacional, promovendo a descarbonização do setor de gás natural. O Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) definirá metas anuais para a redução de emissões a partir de 2026, com um índice inicial de 1%, podendo chegar a 10%. Empresas que não cumprirem essas metas estarão sujeitas a multas, enquanto pequenos produtores e importadores serão isentos da obrigação (Agência Senado, 2024; Fernandes e Costa, 2024).

Neste cenário, o desenvolvimento de motores a metano para ônibus e caminhões já é uma realidade, com fabricantes como a Scania oferecendo modelos equipados com motores de 9 e 13 litros, que proporcionam desempenho comparável aos motores a diesel e autonomia de até 1.200 km (Scania s.d.). No setor sucroenergético, a Cocal, em parceria com a MWM, substituiu motores a diesel por motores 100% a gás em 20 caminhões e motobombas, utilizando biometano produzido a partir de resíduos da cana, especificamente vinhaça e torta de filtro (OTM, 2024). Esse gás renovável, distribuído via carretas ou gasoduto, permitiu à empresa reduzir o consumo de diesel e evitar a emissão de 1.900 toneladas de CO₂ na última safra (Autoindústria, 2024). Da mesma forma, iniciativas sustentáveis estão sendo implementadas na gestão de resíduos urbanos, como a nova frota da prefeitura de São Paulo e da concessionária de coleta de resíduo, composta por 27 carretas movidas a biometano para atuar na destinação final dos resíduos nas regiões Norte e Oeste da cidade. Além disso, o Volkswagen Constellation 26.280, movido a biometano e com capacidade para operar também com GNV ou GNL, será testado neste ano, destacando-se como uma alternativa eficiente para reduzir em até 90% as emissões de CO₂ e em aplicações como a coleta de resíduo (Rosa, 2024).

Por fim, o biometano se destaca não apenas por seu baixo impacto ambiental, mas também por sua viabilidade econômica. Como sua infraestrutura de distribuição e utilização já está estabelecida em diversas regiões do mundo, o custo total de implementação do sistema energético baseado em biometano é reduzido, tornando-o uma alternativa competitiva e sustentável para o futuro da energia global.

2.4 FATORES QUE INFLUENCIAM A DIGESTÃO ANAERÓBIA

O desempenho e a estabilidade da digestão anaeróbia estão diretamente ligados a fatores físico-químicos e microbiológicos que modulam o metabolismo dos consórcios microbianos. A seguir, serão apresentados os principais parâmetros operacionais e bioquímicos que influenciam esse processo, como temperatura, formação de ácidos e variações de pH, pressão parcial, relação C/N e estratégias de cofermentação, destacando seus efeitos sobre a atividade microbiana e a produção de biogás.

2.4.1 Temperatura

A temperatura tem grande impacto na fermentação para produção de H_2 , que também é um fator importante para desenvolver a eficiência da produção de H_2 . A produção de H_2 por microrganismos na fermentação pode ocorrer sob condições mesofílicas (20 - 45 °C), termofílicas (50 - 60 °C) e extremas termofílicas (65 – 80 °C) (Cremonez *et al.*, 2021; Kumar e Samadder, 2020). O principal grupo de bactérias produtoras de H_2 sob condições mesofílicas inclui *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Bacillus* e *Caldicellulosiruptor* (Eder *et al.*, 2020; Volpi *et al.*, 2021). Bactérias do gênero *Clostridium* produzem H_2 tanto em condições mesofílicas quanto termofílicas. Espécies dos gêneros *Thermoanaerobacter* e *Caldanaerobius* também são comuns na produção de H_2 sob condições termofílicas (Dessi *et al.*, 2018; Niz *et al.*, 2019). A literatura também descreve psicrófilos (abaixo de 20 °C) como microrganismos produtores de H_2 , incluindo bactérias dos gêneros *Gammaproteobacteria*, *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Carnobacterium* e *Trichococcus* (Alvarado-Cuevas *et al.*, 2014; Alvarez-Guzmán *et al.*, 2016; Debowski *et al.*, 2014).

O controle térmico no processo fermentativo exerce influência decisiva sobre o metabolismo microbiano, a biodegradabilidade dos substratos e a atividade das hidrogenases. O aumento da temperatura pode favorecer o acúmulo de H_2 ao inibir microrganismos e aumenta a transferência de massa gás-líquido (Ahmad *et al.*, 2024). No entanto, em condições extremamente termofílicas (temperaturas superiores a 65 °C), foi observada a inibição dos

organismos produtores de H_2 , especialmente em sistemas com lodo ativado como inóculo, devido à desnaturação de proteínas celulares e a consequente inativação de enzimas essenciais para o crescimento microbiano (Dessi *et al.*, 2018). De modo geral, a faixa de temperatura mais aplicada na acidogênese situa-se entre 30 e 60 °C, sendo evidenciado que intervalos de 35–40 °C e 50–60 °C favorecem a produção de H_2 sem comprometer o crescimento celular (Elbeshbishy *et al.*, 2017).

A escolha da faixa de temperatura ideal também depende da origem e da composição do substrato utilizado. Diferentes matérias-primas apresentam características físico-químicas específicas, que impactam tanto a taxa de degradação quanto a eficiência da produção de biogás em condições térmicas específicas (Ahmad *et al.*, 2024). Em efluentes complexos, como a vinhaça, composta de moléculas complexas e recalcitrantes (Comparato *et al.*, 2024; Reis *et al.*, 2020), diversos estudos têm sido conduzidos para determinar a faixa de temperatura ideal para maximizar a produção de H_2 , com destaque para o uso de condições termofílicas, que também se justifica pela elevada temperatura que esta é gerada (Sillero, Solera e Perez, 2023; Toledo-cervantes *et al.*, 2020). Resultados satisfatórios em termofilia também foram observados em fermentações envolvendo outras matérias-primas, como o soro de leite (Almeida *et al.*, 2022) e resíduos com alto teor de celulose (Rambabu *et al.*, 2019). Neste último caso, microrganismos anaeróbios termofílicos como *Clostridium thermocellum* demonstram elevada capacidade de hidrólise e melhor taxa de crescimento sob condições de temperatura elevadas, resultando em maior eficiência na produção de H_2 (Rambabu *et al.*, 2019).

Em condições termofílicas, microrganismos fermentativos apresentam taxas de hidrólise superiores às observadas em processos mesofílicos, além de favorecerem uma maior produção de ácidos graxos voláteis (Chen *et al.*, 2022). Adicionalmente, microrganismos termofílicos apresentam alta tolerância a variações de pH e a condições de estresse, mantendo elevadas taxas e rendimentos na produção de H_2 (Haque *et al.*, 2022). Contudo, a fermentação mesofílica continua sendo amplamente empregada na produção de H_2 , devido às suas vantagens relacionadas ao menor consumo energético e à maior estabilidade operacional. Além disso, as diferentes afinidades térmicas entre as bactérias produtoras de H_2 podem influenciar tanto as rotas metabólicas quanto as taxas de produção durante a fermentação (Chen *et al.*, 2022; Faber, Meireles e Ferreira-Leitão, 2022; Sá, de *et al.*, 2020).

Altas temperaturas podem restringir a quantidade de microrganismos, uma vez que a rápida degradação do substrato e a consequente formação de ácidos orgânicos afetam ou mesmo inibem o crescimento de organismos metanogênicos. O aumento expressivo da temperatura está associado a uma elevação significativa na taxa de mortalidade das arqueias metanogênicas em

comparação às condições mesofílicas (Sukphun *et al.*, 2023). Diante desse cenário, o uso de sistemas de digestão anaeróbia em dois estágios tem se mostrado uma estratégia promissora. Nessa abordagem, empregam-se condições termofílicas (em torno de 50 -55 °C) durante a fase de hidrólise e acidificação do material, seguidas por uma etapa mesofílica (cerca de 35 °C) na fase de produção de metano, promovendo maior estabilidade e diversidade de arqueias metanogênicas (Cremonez *et al.*, 2021; Mignogna *et al.*, 2023; Sukphun *et al.*, 2023).

2.4.2 Geração de ácidos e alterações no pH

O controle de parâmetros operacionais, como o pH e a concentração de ácidos orgânicos, é essencial para otimizar a produção de H₂ e CH₄ em sistemas de digestão anaeróbia. Durante a hidrólise das matérias-primas, ácidos como o fórmico, acético e levulínico são liberados, enquanto a fase acidogênica gera subprodutos adicionais, como os ácidos acético, butírico, propiônico e lático, todos potenciais inibidores da fermentação. Quando o pH do meio cai abaixo dos valores de pK_a desses ácidos, acético (4,75), butírico (4,80), propiônico (4,88) e lático (3,86), ocorre a dissociação intracelular dessas moléculas. Esse processo leva ao acúmulo de prótons no citoplasma, promovendo acidificação intracelular, que pode ativar enzimas associadas à solventogênese, uma rota metabólica que compete com a produção de H₂ (Basak *et al.*, 2020; Elbeshbishy *et al.*, 2017; Patakova *et al.*, 2019). Além disso, os ânions resultantes elevam a osmolaridade citoplasmática, aumentando a pressão de turgor (pressão contra a parede celular) e induzindo estresse celular. O bombeamento de prótons para o meio extracelular, como mecanismo de defesa, também compromete a disponibilidade de ATP intracelular, prejudicando o metabolismo microbiano (Elbeshbishy *et al.*, 2017; O-Thong *et al.*, 2008; Sá, de *et al.*, 2020).

Apesar disso, algumas espécies, como *Ethanoligenens harbinense* e *Clostridium acidisoli*, demonstraram capacidade de crescimento e produção de H₂ mesmo sob condições de pH extremamente baixas (pH < 3), conforme relatado por Mota *et al.*, 2018. Ainda assim, considerando a fonte de carbono e as características das bactérias dominantes na produção de H₂, a faixa de pH ideal para a fermentação situa-se geralmente entre 5 e 7 (Tian *et al.*, 2019; Zagrodnik, Duber e Seifert, 2022). Vale ressaltar que o pH inicial é mais importante para os fatores que afetam o início da produção, enquanto o pH operacional afeta as vias metabólicas que serão predominantes (Rocha, Sakamoto e Varesche, 2023).

O ajuste da concentração de substrato deve ser avaliado para cada sistema, como a quantidade de microrganismos presentes no inóculo (Mattiello-Francisco *et al.*, 2024). Uma

carga orgânica excessiva pode levar ao acúmulo de ácidos orgânicos, promovendo a rápida redução do pH do meio, o que inibe o metabolismo microbiano e prejudica a produção de H_2 (Canto-Robertos *et al.*, 2023). As fermentações em batelada apresentam vantagens, pois permitem interromper o processo no momento de maior produção de gás, antes que a redução do pH cause a inibição microbiana e o consequente consumo do gás produzido. Em sistemas contínuos, existem estratégias como a alimentação controlada dos reatores com matéria-prima previamente ajustada em pH. Além disso, a cofermentação com substratos tamponantes pode contribuir para a estabilização do pH durante a digestão, reduzindo o risco de inibição por substrato e por produto e favorecendo a eficiência do sistema (Menezes, de *et al.*, 2023).

Quando o processo de digestão anaeróbia é conduzido integralmente com o objetivo da produção de CH_4 , o acúmulo, especialmente dos ácidos propiônico e butírico, é reconhecido como um dos principais gargalos que limitam a eficiência do sistema (Lv *et al.*, 2023). Esses ácidos não são diretamente utilizados pelas arqueias metanogênicas, que empregam, preferencialmente, ácido acético ou H_2 e CO_2 como substratos para a produção de CH_4 . Assim, o propionato e o butirato precisam ser oxidados previamente, por meio de reações acetogênicas, em ácido acético e H_2 . No entanto, essas reações de oxidação são termodinamicamente desfavoráveis em condições padrão (Tabela 2; Reação 14 e 15, respectivamente) e somente se tornam exergônicas quando os produtos da reação (ácido acético e H_2) são mantidos em concentrações muito baixas (Lv *et al.*, 2023).

Diversos métodos foram propostos para diminuir o acúmulo do propionato e do butirato durante a digestão anaeróbia, como a adição de carvão ativado granular ou do *biochar*, com o objetivo de estimular a transferência direta de elétrons entre espécies (DIET) além do enriquecimento de populações de homoacetogênicos (Bu *et al.*, 2021). No entanto, essas abordagens mostraram-se insuficientes para evitar, de forma contínua e estável, a acumulação dos ácidos orgânicos, especialmente quando o sistema foi submetido a condições ambientais adversas ou ao aumento de carga orgânica. Assim, o desenvolvimento de soluções mais eficazes e definitivas para o controle do acúmulo de ácidos continua sendo um desafio relevante. Nesse cenário, a separação da digestão anaeróbia em dois estágios desponta como uma técnica promissora para superar o desequilíbrio entre as fases acidogênica e metanogênica.

2.4.3 Pressão parcial

A pressão parcial exerce um papel determinante na produção de H_2 . Em sistemas fechados, o aumento da pressão favorece a ressolubilização do gás no meio líquido devido a uma limitação na transferência de massa entre as fases líquida e gasosa, visto que a taxa de produção de gás supera sua taxa de transferência para a fase gasosa (Junior *et al.*, 2020; Pauss *et al.*, 1990). Entre os efeitos do acúmulo de H_2 no meio estão os desvios nas rotas metabólicas, em que o H_2 é consumido para a síntese de acetato. Uma alta pressão parcial implica maiores concentrações de H_2 e CO_2 dissolvido no meio fermentativo, isto leva a um aumento de população de microrganismos realizando homoacetogênese por meio da via Wood-Ljungdahl (Ferraz-Junior *et al.*, 2020)

Os homoacetogênicos são responsáveis pelo consumo de até 45% do H_2 produzido na fermentação, sendo este fenômeno um dos mais desafiadores a serem controlados. Isto porque os microrganismos que realizam homoacetogênese crescem em uma ampla gama de temperatura (4 – 80 °C) e persistem após o pré-tratamento do inóculo (Augusto *et al.*, 2024). Entre esses estão as bactérias do gênero *Clostridium* que realizam a homoacetogênese e a produção de H_2 . Além disso, esta condição de acúmulo de H_2 no meio afeta o metabolismo bacteriano ao influenciar o balanço de NADH/NAD⁺ e a direção das reações redox, ativando a via redutora da fermentação, conhecida como solventogênese ou fermentação ABE (Patakova *et al.*, 2019). O excesso de NADH e baixo pH favorecem a redução dos ácidos acético e butírico, gerados na fase acidogênica, em seus correspondentes aldeídos e álcoois como acetona, butanol e etanol (Branska *et al.*, 2021) .

A elevada pressão parcial durante a fase de adaptativa dos microrganismos pode interromper o consumo de substratos (Chen, Yin e Wang, 2021). Esse comportamento pode ser explicado pelo Princípio de Le Chatelier, que estabelece que "todo sistema em equilíbrio reage a um aumento de pressão deslocando a reação no sentido oposto ao que intensifica essa pressão" (Chen, Yin e Wang, 2021; Ferraz Junior *et al.*, 2022). Durante a fermentação, à medida que a pressão parcial aumenta nos biorreatores, o equilíbrio redox intracelular entre NADH/NAD⁺ fica afetado, no qual há acúmulo de NADH dentro da célula causando a diminuição do consumo de substrato e a síntese de H_2 (Canto-Robertos *et al.*, 2023; Wang e Wan, 2009).

Entre as estratégias adotadas para minimizar a inibição da síntese de H_2 , existem as técnicas de aspersão por gás inerte (Massanet-nicolau *et al.*, 2015), do aumento da transferência gás-líquido no reator por meio de agitação (Chezeau e Vial, 2019) e de gerar um vácuo no sistema fermentativo (Rajhi *et al.*, 2016). Além disso, a fermentação em baixa pressão vem

recebendo destaque. Diversos estudos relatam que a fermentação sob pressões entre 0,2 e 0,6 atm (Faber, Meireles e Ferreira-Leitão, 2022; Fasheun *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2006; Mandal, Nath e Das, 2006) melhora a produção de H_2 , evidenciando que operar em condições de pressão reduzida é uma abordagem eficaz (Castelló *et al.*, 2020).

No entanto, ainda não há uma análise detalhada do custo-benefício dessa estratégia de fermentação em baixa pressão. Reduzir a pressão do sistema pode ser oneroso, tornando essencial o ajuste adequado das condições operacionais para viabilizar a aplicação dessa técnica (Castelló *et al.*, 2020). A determinação de uma pressão limite e a escolha de um reator que permita alívios contínuos de gás em níveis controlados podem minimizar esses desafios e gerar ganhos significativos para o processo (Fasheun, Silva, da, *et al.*, 2024; Tomasini, Faber e Ferreira-Leitão, 2022).

2.4.4 Relação carbono/nitrogênio (C/N)

A relação carbono/nitrogênio (C/N) é um fator determinante na fermentação, influenciando diretamente o crescimento celular e a produção de hidrogênio. No entanto, seu valor ideal varia conforme as características da matéria-prima e dos substratos contidos, do inóculo e das condições de fermentação (Karim *et al.*, 2021). A deficiência de nitrogênio, ou seja, elevada relação C/N, compromete a proliferação microbiana, limita a disponibilidade de nitrogênio, retardando a digestão do substrato, reduz a síntese de H_2 (Karim *et al.*, 2021; Pérez-Rangel *et al.*, 2020). Por outro lado, o excesso de nitrogênio (baixa relação C/N) favorece o crescimento excessivo da biomassa, o que deletério à produção de H_2 , pode modificar o pH intracelular, gerar amônia em excesso e aumentar a toxicidade para microrganismos (Ananthi *et al.*, 2024; Karim *et al.*, 2021; Pérez-Rangel *et al.*, 2020).

Apesar desses desafios, o nitrogênio é essencial para a síntese celular, sendo necessário na formação de ácidos nucleicos, paredes celulares e proteínas. Quando presente em proporções adequadas, pode reduzir a fase adaptativa dos microrganismos e favorecer a eficiência do processo fermentativo (Reyna-Gómez *et al.*, 2019). Na literatura, há consenso sobre os requisitos de nitrogênio para a produção de metano a partir de matérias-primas lignocelulósicas, com uma relação C/N ideal na faixa de 20 a 30 (Pérez-Rangel *et al.*, 2020). No entanto, não há um consenso claro sobre as necessidades de nitrogênio para a produção de hidrogênio

Tabela 3 - Resultados comparativos de estudos que identificam as relações carbono/nitrogênio em seus trabalhos com produção de hidrogênio utilizando resíduos agroindustriais ou meios sintéticos

Matéria-prima/Substrato	DQO (g/L)	inóculo	pH	Temperatura (°C)	C/N	Modo de operação	Tipo de Reator	H ₂ (mL/L)	Y _{p/s}	Referência
Meio sintético/Sacarose	20	Lodo anaeróbio	6,8	35	47	Batelada	Frasco selado	1439,2 mL/L	4,8 mol/mol _{sacarose}	(Lin e Lay, 2004)
Meio sintetizado mimetizando efluente (não determinado)	10	Lodo anaeróbio	5	55	30	Batelada	Frasco selado	25 mL.h ⁻¹ .g ⁻¹	-	(Xie <i>et al.</i> , 2008)
Pó de trigo/amido	20	Lodo anaeróbio <i>Thermoanaerobacterium</i>	7	37	200	Batelada	Frasco selado	3600 mL/L	281ml/g _{amido}	(Argun <i>et al.</i> , 2008)
Efluente do óleo de palma (POME)	20	<i>thermosaccharolyticum</i> PSU-2	6.2	60	35	Batelada	Frasco selado	3420 mL/L	2.53 mol/mol _{hexose}	(O-Thong <i>et al.</i> , 2008)
Meio sintético/Sacarose	2	Inóculo formulado	5	Temperatura ambiente	140	Contínuo	UASB	111.42 mL.h ⁻¹ .L ⁻¹	3,5 mol/mol _{sacarose}	(Felpeto-Santero <i>et al.</i> , 2015)
Meio sintético/Glicose	5	Lodo anaeróbio	3,7	30	200	Contínuo	AFBR	0,7 L.h ⁻¹ .L ⁻¹	0,76 mol/mol _{glicose}	(Carosia <i>et al.</i> , 2017)
Palha de trigo	2% TS	<i>Enterococcus</i>	6,5	37	17,5	Batelada	Frasco selado	504 mL/L	38 mL/g _{palha}	(Pérez-Rangel <i>et al.</i> , 2020)
Meio sintético/Glicerol	7	Lodo anaeróbio	5,5	35	128	Batelada	Reator com alívio de pressão	258 mL/L	0,14 mol/mol _{glicerol}	(Faber, Meireles e Ferreira-Leitão, 2022)
Vinhaça de tequila	186	Consórcio formulado*	5,8	35	135	Contínuo	CSTR	283.6 mL.h ⁻¹ .L ⁻¹	81.8 mL/g _{VS}	(García-Depraect <i>et al.</i> , 2023)
Bagaço de cana/pentoses da hemicelulose	18	Lodo anaeróbio	6	55	100	Batelada	Frasco selado	1900 mL/L	1,9 mol/mol _{pentose}	(Mattiello-Francisco <i>et al.</i> , 2024)

A ausência de nutrientes pode ter um efeito positivo, neutro ou negativo na produção de H_2 , dependendo do substrato. Substratos simples ou puros, como sacarose, glicose, glicerol e amido, parecem exigir baixos teores de nitrogênio, com relações C/N variando de 128 a 200 (Tabela 3). No entanto, alguns estudos revelaram o oposto, relataram relações C/N menores, como 47 (Lin e Lay, 2004). Já matérias-primas complexas, como palha de trigo (biomassa lignocelulósica) e efluente da prensagem de óleo de palma (POME), apresentam relações C/N entre 17 e 35 e requerem maior suplementação de nitrogênio.

A fonte de nitrogênio é outro fator que influencia significativamente a produção de H_2 . Meios contendo nitrogênio orgânico, como a peptona, tendem a promover maior produção de hidrogênio em comparação àqueles suplementados com fontes inorgânicas, como o cloreto de amônio (NH_4Cl) (O-Thong *et al.*, 2008). Esse efeito é atribuído à capacidade da peptona de fornecer aminoácidos essenciais, que atuam como fatores de crescimento para as bactérias envolvidas no processo fermentativo.

Além do nitrogênio, outros componentes podem favorecer a produção de H_2 . Por isso, diversos estudos investigam o uso de resíduos orgânicos como fonte de nutrientes para aprimorar o processo fermentativo, frequentemente por meio da cofermentação. Esse cenário reforça a importância de estratégias como a cofermentação de matérias-primas complexas, como a vinhaça, para otimizar a conversão de seus substratos em H_2 de maneira eficiente e sustentável.

2.5 COFERMENTAÇÃO

A fermentação de resíduos ou efluentes orgânicos pode ser limitada pelas características da matéria-prima, como o desequilíbrio nutricional ou a presença de compostos tóxicos que inibem o processo microbiológico (Sillero, Solera e Perez, 2022). Nesse contexto, a cofermentação de diferentes resíduos e efluentes surge como uma estratégia promissora, pois permite a complementação das propriedades dos substratos individuais, potencializando a eficiência na produção de H_2 . Além disso, essa abordagem possibilita o aproveitamento conjunto de diversos resíduos, contribuindo simultaneamente para a mitigação de impactos ambientais e a valorização de efluentes orgânicos. Entre os benefícios adicionais da cofermentação, assim como a codigestão, destacam-se: a capacidade de tratar cargas orgânicas mais elevadas com maior facilidade de biodegradação, a diluição de compostos inibitórios, o

aprimoramento da capacidade tampão da mistura e o aumento do rendimento de biogás (Almeida *et al.*, 2022; Menezes, de *et al.*, 2023).

Essa estratégia tem sido destacada como uma alternativa promissora para mitigar a recalcitrância da vinhaça, considerando que esse efluente contém compostos orgânicos complexos, como fenóis, sulfatos e melanoidinas, capazes de comprometer a estabilidade do processo fermentativo e reduzir sua eficiência energética operacional (Fuess, 2024; Kiani *et al.*, 2022; Reis *et al.*, 2020). Embora a codigestão da vinhaça já tenha sido amplamente investigada, estudos mais recentes têm se concentrado no aprofundamento da cofermentação, explorando seu potencial para otimizar a conversão bioenergética desse efluente.

A cofermentação se configura como uma estratégia eficaz para a valorização energética de resíduos e efluentes agroindustriais, promovendo ganhos significativos na produção de H₂, maior estabilidade operacional e aumento da eficiência dos processos fermentativos. Além dos benefícios técnicos, essa abordagem contribui para a mitigação dos impactos ambientais associados ao descarte inadequado desse efluente, alinhando-se aos princípios de sustentabilidade e economia circular.

2.6 CONTEXTO ENERGÉTICO

A matriz energética brasileira, em 2023, destacou-se pela elevada participação de fontes renováveis, alcançando 49,1% da oferta de energia interna, em contraste com os 47,4% registrados em 2022 (Figura 12) (EPE, 2024a). O setor de transportes, em particular, manteve-se como o principal consumidor de energia sendo os derivados do petróleo as fontes majoritárias de energia. No entanto, o consumo de biocombustíveis apresentou aumento significativo, com o etanol crescendo 6,3% e o biodiesel, 19,2%, em relação ao ano anterior (EPE, 2024).

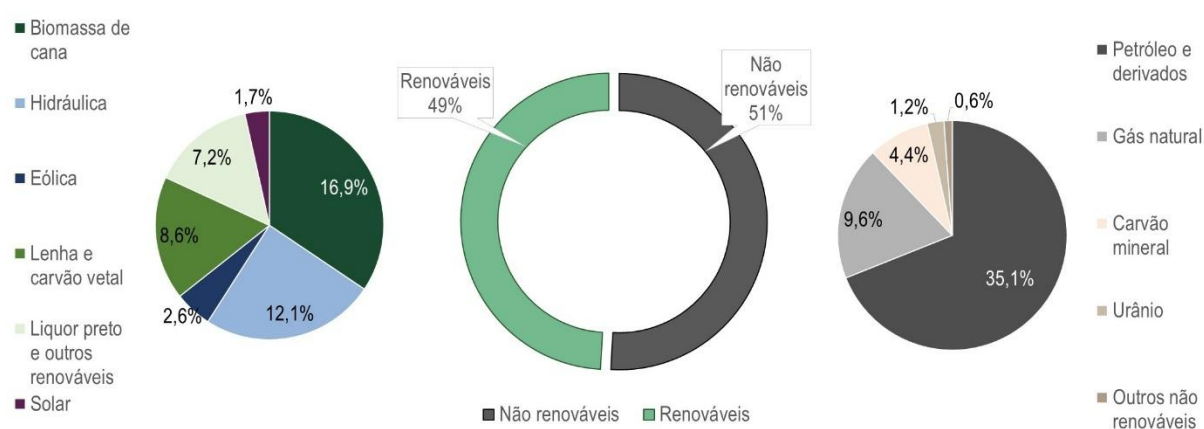
O Brasil possui grande expertise no setor de biocombustíveis, sendo o segundo maior produtor mundial, representando mais de 21% da produção global, atrás apenas dos Estados Unidos, que lideram com 38% (Energy Institute, 2023). O potencial de crescimento na oferta de biocombustíveis é de 4,1% - 6,6% na demanda entre 2022 e 2032, impulsionando o mercado internacional e beneficiando o país (Energy Institute, 2023).

Neste contexto, a produção de biometano pode atingir 19,2 bilhões de Nm³ até 2032, correspondente a 34,9 bilhões de Nm³ de biogás, considerando o aproveitamento integral de vinhaça, torta de filtro, palhas e pontas. Esse volume permitiria a exportação de energia elétrica equivalente a 2,1 GW médio a partir do biometano gerado especificamente pela vinhaça e torta

de filtro (EPE, 2022). Além disso, o biometano derivado da vinhaça e torta de filtro teria potencial para atender cerca de 20% da demanda de diesel do setor agropecuário. Caso fossem também aproveitados palhas e pontas, esse segmento poderia alcançar a autossuficiência energética (EPE, 2022).

O uso da biomassa, especialmente a derivada da cana-de-açúcar, foi um dos principais destaques na composição da matriz energética de 2023, 13% superior comparado a 2022, elevando sua representação de 46,7% para 52,9%. Esse incremento está relacionado ao aumento da produção de açúcar e etanol no setor sucroenergético, além do crescimento no uso do bagaço de cana na indústria, que registrou um aumento de 26,1% no período. Esse desempenho posiciona o Brasil acima da média mundial, onde a contribuição de fontes renováveis na matriz energética permanece significativamente menor (14,8%) (EPE, 2024b).

Figura 12 - Participação das fontes renováveis e não renováveis na matriz energética brasileira em 2023. Os gráficos mostram a distribuição percentual das fontes renováveis (como biomassa de cana, hidráulica, eólica e solar) e das fontes não renováveis (como petróleo e derivados, gás natural e carvão mineral), indicando que 49% da matriz energética é composta por fontes renováveis, enquanto 51% é proveniente de fontes não renováveis.



Fonte: (EPE, 2024a)

No segmento elétrico, a participação de fontes renováveis no Brasil alcançou 89,2% da matriz em 2023, superando os 87,9% de 2022. Essa evolução deveu-se à manutenção da oferta de energia hidráulica, combinada com o crescimento expressivo da geração eólica (17,4%) e solar, além do aumento de 3,8% no uso de biomassa. Em contrapartida, houve reduções significativas na geração a partir de gás natural (-7,9%) e derivados de petróleo (-19,4%) (EPE, 2024b). Tal cenário mostra os avanços brasileiros na transição energética por meio da incorporação de novas tecnologias e fontes mais limpas e diversificadas em sua matriz

energética. No entanto, desafios permanecem, especialmente na necessidade de integração entre os diferentes setores e na promoção de maior eficiência no uso dos recursos energéticos.

Globalmente, as energias renováveis representam cerca de 29% da geração elétrica total (setor energético e elétrico) (IRENA, 2024). De acordo com a agência internacional de energia (*International Energy Agency* – IEA) se as tendências atuais persistirem, o aquecimento global ultrapassará 2°C já no final do século XXI (IEA, 2025). Para alinhar-se às metas do Acordo de Paris e ao cenário de limitação do aquecimento global a 1,5 °C, as projeções indicam que a participação de fontes renováveis deve aumentar para 70% até 2030 e mais de 90% até 2050 na matriz elétrica mundial (IEA, 2025; IRENA, 2024). Além da solar e eólica, outras fontes, como biomassa, hidráulica, hidrogênio verde, biogás e biometano irão desempenhar papéis essenciais.

O cenário climático atual exige ações imediatas para mitigar os impactos do aquecimento global. A transição para energias renováveis é necessária para reduzir as emissões de carbono e atingir as metas do Acordo de Paris. O Brasil possui condições de assumir um papel de liderança na transição energética, aproveitando a sua vasta biodiversidade, produção agrícola e consequente geração de resíduos com potencial em inovações tecnológicas. Essa atuação pode promover o desenvolvimento de mercados para combustíveis sustentáveis e contribuir para a garantia da segurança energética nacional e global.

3 JUSTIFICATIVA

Considerando a necessidade urgente de descarbonização da economia e de promoção da bioeconomia, o aproveitamento de resíduos agroindustriais para geração de bioenergia emerge como uma solução estratégica. O Brasil, com sua vasta extensão territorial e diversidade agrícola, apresenta vantagens comparativas e competitivas únicas para se consolidar como líder global na economia de baixo carbono. O desenvolvimento de rotas sustentáveis para a produção de energia renovável é fundamental para o cumprimento das metas climáticas globais estabelecidas pela COP29 e alinhadas a todos os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU.

A produção biológica de H_2 e CH_4 a partir da vinhaça e do hidrolisado hemicelulósico da palha representa uma oportunidade concreta para transformar resíduos e efluentes em fontes de alta densidade energética. A vinhaça, efluente da produção de etanol, e a fração hemicelulósica da biomassa, rica em açúcares de cinco carbonos, são matérias-primas abundantes e subutilizadas, cujos aproveitamentos energéticos podem impulsionar o desenvolvimento tecnológico, econômico e ambiental do país. Enquanto o H_2 é apontado como vetor energético essencial para a transição de baixo carbono, o CH_4 se consolida como alternativa para a bioenergia, com aplicações industriais e residenciais.

Embora a produção atual de H_2 ainda dependa majoritariamente de fontes fósseis (IEA, 2024), a via biológica oferece um processo de menor demanda energética e grande potencial de integração com cadeias agroindustriais já existentes, agregando valor e diversificando produtos. Além disso, a utilização de consórcios microbianos provenientes de ambientes naturais pode ser adaptada e permite superar os desafios técnicos associados à fermentação da vinhaça e pentoses, promovendo maior eficiência nos processos biotecnológicos.

Portanto, o desenvolvimento de tecnologias voltadas à produção biológica e sustentável de H_2 e CH_4 a partir de resíduos e efluentes agroindustriais contribui para ampliar o conhecimento científico e tecnológico nacional no processamento de matérias-primas complexas, associado à geração de energia renovável. Essa evolução reforça a posição do Brasil no cenário energético global, ao mesmo tempo em que impulsiona a inovação e a integração de processos em sistemas de biorrefinaria, maximizando o uso de recursos e reduzindo impactos ambientais.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de hidrogênio e metano de forma sequencial, via fermentação e digestão anaeróbia, utilizando vinhaça e hidrolisado hemicelulósico da palha de cana-de-açúcar, avaliando a viabilidade energética e bioquímica do processo em comparação à digestão direta, e investigar a cofermentação dessas matérias-primas a fim de potencializar a produção de H_2 a partir da vinhaça.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a produção de H_2 a partir da vinhaça, investigando os efeitos de pH, temperatura, concentração inicial de matéria orgânica e pressão parcial de H_2 sobre a eficiência fermentativa.

2. Avaliar a produção de H_2 a partir do hidrolisado hemicelulósico em diferentes concentrações iniciais de carboidratos e o impacto da pressão parcial de H_2 no desempenho fermentativo.

3. Analisar a produção de H_2 na cofermentação entre vinhaça e hidrolisado hemicelulósico, comparando os rendimentos com as fermentações individuais e avaliar a influência da relação C/N sobre a produção de H_2 .

4. Avaliar a produção de CH_4 em processo sequencial (digestão anaeróbia em duas etapas) utilizando os efluentes gerados nas etapas 1, 2 e 3.

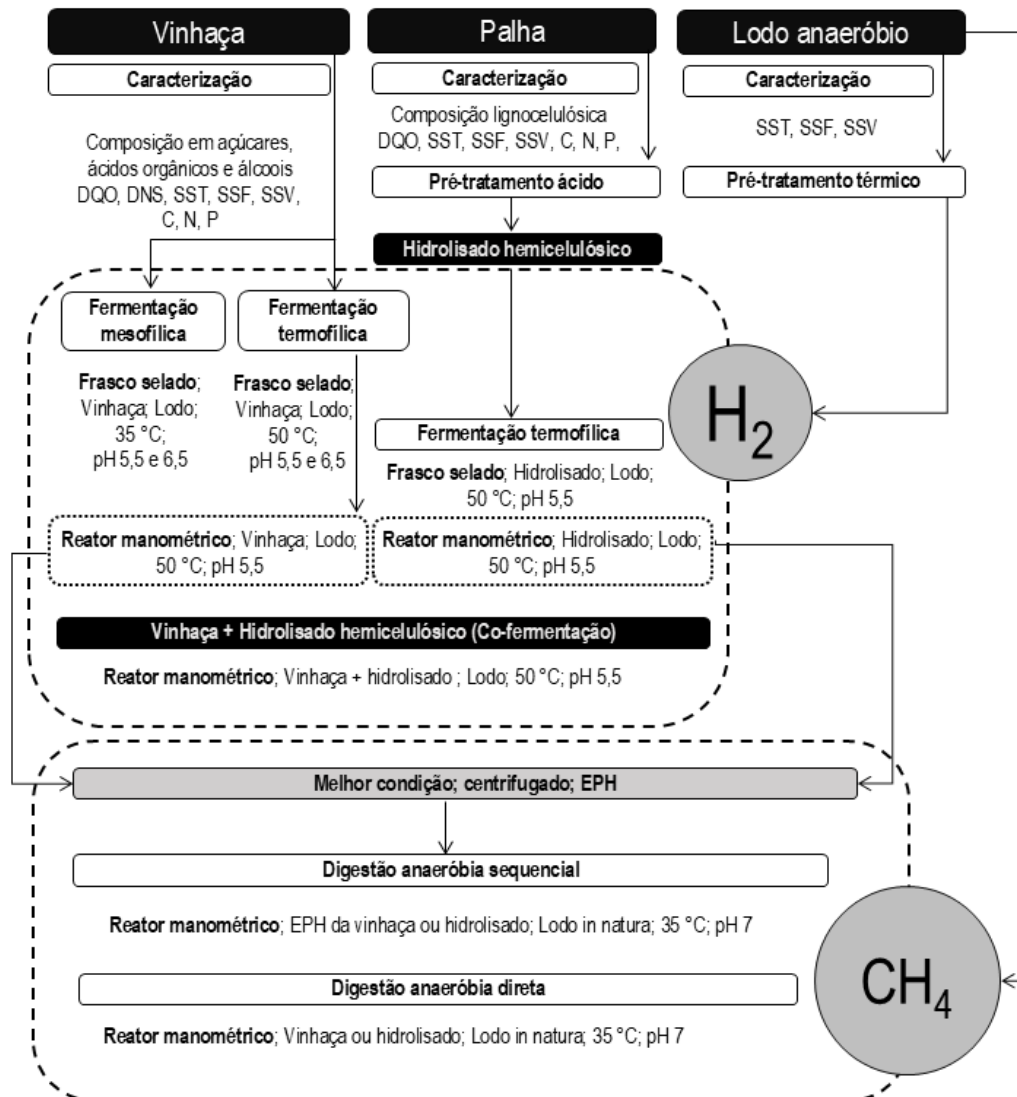
5. Avaliar a produção de CH_4 por digestão anaeróbia direta utilizando vinhaça como matéria-prima.

6. Avaliar a produção de CH_4 por digestão anaeróbia direta utilizando hidrolisado hemicelulósico como matéria-prima.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

O diagrama de blocos apresentado na Figura 13 ilustra a sequência das etapas conduzidas neste estudo. A vinhaça utilizada foi cedida pela Usina Batatais (SP), enquanto as amostras de palha de cana-de-açúcar foram fornecidas pela empresa GranBio. Na etapa inicial, ambos os materiais foram caracterizados quanto aos principais parâmetros físico-químicos. A palha passou por um pré-tratamento com ácido diluído para obtenção do hidrolisado hemicelulósico. Na segunda etapa, realizou-se a produção de hidrogênio (H_2), testando diferentes temperaturas e faixas de pH para a vinhaça. Já a fermentação do hidrolisado foi conduzida sob as condições que apresentaram melhor desempenho com a vinhaça. Essas mesmas condições foram posteriormente aplicadas na cofermentação das duas matérias-primas, avaliando-se três diferentes relações C/N. Na terceira etapa, foi realizada a produção de metano (CH_4), tanto de forma sequencial — utilizando o efluente da produção de H_2 (EPH) da vinhaça, do hidrolisado e da cofermentação destas matérias-primas — quanto de forma direta, por meio de digestão anaeróbia em estágio único. A digestão direta teve como objetivo comparar os resultados obtidos com o sistema em dois estágios.

Figura 13 - Diagrama de blocos simplificado das etapas dos experimentos do estudo



5.1 CARACTERIZAÇÃO DA VINHAÇA

A vinhaça foi cedida pela Usina Batatais com projeção de moagem para a safra 2025/26 de aproximadamente 3,7 milhões de toneladas de cana. A vinhaça foi caracterizada conforme as metodologias do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, ASTM, ABNT e os seguintes parâmetros foram monitorados: DQO (g/L), SST (g/L), SSF (g/L), SSV (g/L) (APHA, 2017), pH, nitrogênio (% m/m), carbono (% m/m) (ASTM D5291:2016), potássio (mg/kg) e fósforo (mg/kg) (ABNT NBR 15553:2015). A quantificação dos ácidos orgânicos e álcoois foi realizada por CLAE por meio de metodologias padronizadas (Sá *et al.*, 2011). A vinhaça também foi hidrolisada seguindo a metodologia descrita por Sluiter e colaboradores (2012) para liberar carboidratos conjugados, que foram analisados por metodologia de açúcares redutores, conforme descrito por (Vasconcelos, Pinto e Aragão, 2013).

5.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR *IN NATURA*

A composição química da palha *in natura* triturada em moinho de facas foi determinada pelo método de hidrólise ácida descrito pelo NREL (*National Renewable Energy Laboratory*), conforme Sluiter *et al.* (2005, 2012). Foram quantificados os teores de cinzas, extrativos, carboidratos estruturais, e lignina solúvel e insolúvel.

5.2.1 Determinação dos extrativos na biomassa cartuchos

Para a determinação dos extrativos foram utilizados cartuchos de celulose previamente secos em estufa a 40°C para remover a umidade. Após a secagem, os cartuchos foram pesados, e cada um recebeu 1 grama de amostra em massa seca. O experimento foi conduzido em seis replicatas e estes cartuchos foram inseridos no sistema extrator Soxhlet. A primeira extração foi realizada com 120 mL de água destilada por 24 horas, seguida por uma segunda extração com 120 mL de etanol durante 8 horas. Após as extrações, os cartuchos foram secos em estufa a 105 °C durante a noite e, em seguida, pesados. O teor de extrativos foi calculado pela diferença entre a massa inicial da amostra e a massa após a extração. Três replicatas foram secas em estufa a 40 °C até atingirem uma umidade inferior a 10%, para serem usadas na determinação do teor de carboidratos estruturais e lignina. A umidade da palha foi medida utilizando uma balança Mettler Toledo HE53 Moisture Analyzer.

5.2.1.1 Determinação da lignina e carboidratos estruturais e hidrólise ácida e carboidratos estruturais

Para o experimento, 0,3 grama de palha livre de extrativos foi colocado em tubos de vidro resistentes à pressão, realizando o procedimento em triplicata. Cada tubo recebeu 3 mL de solução de ácido sulfúrico a 72% (m/m), e a amostra foi homogeneizada por uma hora em banho-maria a 30°C. Após esse período, 84 mL de água ultrapura foram adicionados a cada tubo para diluir o ácido sulfúrico (H_2SO_4) a uma concentração final de 4% (v/v). Os tubos foram autoclavados a 121 °C e 1 bar de pressão por uma hora. Simultaneamente, um padrão de recuperação de açúcares (PRA) com concentração estabelecida de açúcares foi autoclavado em triplicata com a mesma concentração de H_2SO_4 das amostras, visando avaliar a degradação dos açúcares das frações lignocelulósicas causada pelo ácido durante o procedimento. Após a autoclave, os tubos foram resfriados em banho de gelo e filtrados em cadinhos de Gooch com auxílio de uma bomba de vácuo. A fração sólida foi lavada com água destilada até atingir pH 6,5, sendo utilizada para a determinação do teor de lignina e cinzas insolúveis em ácido. A fração líquida da filtração inicial foi neutralizada com carbonato de cálcio (CaCO_3) até alcançar pH entre 5 e 6, e então analisada por CLAE para determinar a concentração de açúcares e por espectrofotometria para a determinação da lignina solúvel.

5.2.1.2 Determinação da lignina solúvel em ácido

Este procedimento foi realizado por meio da medida de absorbância no espectrofotômetro UV-Visível Thermo Scientific Evolution com comprimento de onda de 240 nm. O hidrolisado da etapa 5.2.1.1 foi diluído até proporcionar a leitura entre as absorbâncias de 0,7 a 1,0.

5.2.1.3 Determinação da lignina e cinzas insolúveis em ácido

A biomassa insolúvel, após a filtração em cadinho de Gooch, foi submetida a uma secagem em estufa a 105 °C, seguida de resfriamento em dessecador e pesagem. Em seguida, foi colocada em mufla a 575 °C para calcinação por 24 horas, seguida de resfriamento e nova pesagem. O teor de cinzas insolúveis foi calculado pela diferença entre a massa do cadinho após a estufa e após a mufla. O teor de lignina em ácido foi determinado por meio da diferença gravimétrica.

5.3 PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR

A empresa GranBio gentilmente forneceu a palha de cana-de-açúcar para este estudo. O pré-tratamento da palha foi conduzido usando H_2SO_4 diluído a uma concentração de 1,6% (m/m) na proporção de 1 parte de biomassa para 4 partes de ácido, conforme descrito por Moutta (2009) e Moutta et al. (2012). Neste experimento, o procedimento foi realizado em um frasco schott de 1 litro, usando 40 gramas de palha seca, 160 mL de H_2SO_4 , e autoclavado a 130°C por 30 minutos. Após o resfriamento, a amostra foi prensada manualmente e o líquido extraído foi neutralizado com NaOH 5 mol/L. Este líquido foi caracterizado por CLAE e usado como matéria-prima para a produção de hidrogênio e metano. A eficácia do pré-tratamento foi determinada utilizando a equação 1, com um fator de hidrólise de 0,88.

$$\text{Eficiência} = [\text{g xilose obtida} / (\text{g xilana} / \text{fator de hidrólise})] \quad (\text{Equação 1})$$

$$\text{Log } R0 = \log \{ t \exp [(T - 100) / 14,75] \} \quad (\text{Equação 2})$$

$R0$ = Fator de severidade

T = temperatura em que foi realizado o pré-tratamento (°C)

t = tempo de residência do material no reator (minutos)

$$\text{FCS} = \log (R0) - \text{pH (final)} \quad (\text{Equação 3})$$

FSC = Fator de severidade combinada

5.4 CARACTERIZAÇÃO POR CLAE DOS COMPONENTES DA BIOMASSA E DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO

O cromatógrafo utilizado nesta etapa do trabalho foi o Ultimate 3000 HPLC (ThermoScientific). O ensaio de caracterização química da biomassa *in natura* com a análise dos carboidratos celobiose, glicose, xilose e arabinose, assim como a análise dos carboidratos do hidrolisado ácido hemicelulósico (glicose, xilose e arabinose) foram realizados utilizando uma coluna Aminex HPX – P (Bio-Rad, EUA), uma pré-coluna Carbo-P (Bio-Rad, EUA) e um sistema de remoção de cinzas (deashing system, Bio-Rad, EUA). As análises foram realizadas

em modo isocrático a 80 °C, utilizando como solução móvel água ultrapura no fluxo de 0,6 mL/min. Os carboidratos foram identificados com uso do detector de índice de refração (RID).

5.4.1 Condições cromatográficas

O hidrolisado hemicelulósico também foi analisado pela coluna Aminex HPX-87H a fim de mensurar a concentração dos carboidratos (glicose, xilose e arabinose), ácidos (acético, butírico), HMF e furfural. A coluna foi acoplada a uma pré-coluna Carbo-H (Bio- Rad, USA), em um fluxo de 0,6 mL/min utilizando a fase móvel H₂SO₄ 0,05 mol/L sob a temperatura de 55 °C. A identificação dos açúcares foi realizada utilizando-se detector de índice de refração (RID). Para a detecção dos ácidos, HMF e furfural utilizou-se o detector UV-Vis com o comprimento de onda de 210 nm (DE SÁ et al., 2011b). Os resultados foram obtidos por meio do software Chromaleon (Thermo Scientific) ao comparar os sinais de resposta de cada amostra com os da curva analítica contendo faixas de concentrações dos compostos previamente conhecidos: 0,28 a 19,43 mmol/L de glicose, 0,33 a 23,31 mmol/L de xilose e arabinose, 0,18 a 2,92 mmol/L de celobiose, 0,83 a 58,28 mmol/L de ácido acético, 0,58 a 39,72 mmol/L de ácido butírico, 1,08 a 43,40 mmol/L de ácido fórmico, 0,05 a 3,33 mmol/L de HMF e 0,10 a 7,29 mmol/L de furfural.

5.5 ORIGEM E PRÉ-TRATAMENTO DO INÓCULO

Neste trabalho o lodo anaeróbio de estação de tratamento de esgoto foi utilizado como inóculo. O material foi coletado do digestor anaeróbio de uma estação de tratamento da cidade do Rio de Janeiro gerado a partir do lodo da etapa secundária da estação. A determinação de sólidos suspensos voláteis (SSV) foi avaliada e constitui uma medida indireta da quantidade de microrganismos presentes no lodo (APHA, 2017). Um pré-tratamento térmico a 65 °C durante 30 minutos sob agitação foi realizado a fim de promover a inibição dos microrganismos metanogênicos (Faber, 2021). Estes são responsáveis pelo consumo de H₂ para produção de CH₄ durante a digestão anaeróbia. Este inóculo foi resfriado até atingir a temperatura de 35 °C e assim foi utilizado na produção de H₂.

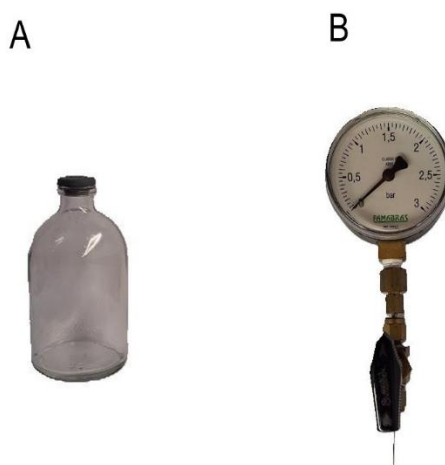
5.6 PRODUÇÃO DE H₂

5.6.1 Fermentação em reatores selados sem liberação de pressão

Os experimentos de fermentação foram conduzidos em batelada, utilizando reatores de 100 mL (frascos de sacrifício) equipados com tampas de borracha para evitar contato com o ar,

selados com tampa de alumínio e sem válvulas para alívio de pressão (Figura 14A). A pressão de cada reator foi medida separadamente, apenas ao final de cada período de fermentação, com um manômetro (Figura 14B). O volume de trabalho dos reatores foi de 45 mL, contendo lodo anaeróbio previamente tratado termicamente, com concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) de 10 g/L.

Figura 14 - Reator selado utilizado para os ensaio de fermentação (A); Manômetro utilizado para medir a pressão dos reatores selados ao final dos experimentos (B)



Fonte: Arquivo pessoal da autora

As fermentações foram realizadas em diferentes condições para avaliar o comportamento metabólico e a produção de biogás. Para a fermentação da vinhaça, os experimentos foram conduzidos a 35 e 50 °C, com pH 5,5 e 6,5, durante 72 horas, utilizando concentração de matéria orgânica medida como demanda química de oxigênio (DQO) de 15 g_{DQO}/L (DQO:SSV 1,5:1) e 25 g_{DQO}/L (DQO:SSV 2,5:1). Os frascos foram purgados com N₂ por 45 segundos para garantir um ambiente anaeróbio, incubados em shaker em rotação de 160 rpm.

A fermentação com hidrolisado hemicelulósico (HH), foi testada em três concentrações iniciais de carboidratos (pHH1 = 1 g/L, pHH5 = 5 g/L e pHH10 = 10 g/L) sob condições termofílicas (50 °C), pH 5,5 durante 72 horas. O pH do hidrolisado foi ajustado para 5 antes de e adicionado ao inóculo. Os frascos foram purgados com N₂ por 45 segundos para garantir um ambiente anaeróbio e rotação de 160 rpm.

O comportamento metabólico destes ensaios foi avaliado considerando o consumo de substrato, a produção de ácidos, a produção e o rendimento de H₂, além dos efeitos inibitórios causados pela pressão parcial. O biogás foi analisado utilizando um micromatógrafo gasoso

(micro-CG), enquanto a fração líquida foi centrifugada e encaminhada para análise DQO e CLAE para determinação de substratos e metabólitos gerados.

5.6.2 Fermentação em reatores com válvula de liberação de gás

Reatores com capacidade de 300 mL, projetados com manômetros e válvula de liberação de gás, foram operados em modo batelada com volume de trabalho de 135 mL (Figura 15). A pressão foi monitorada durante o experimento usando um manômetro do reator para garantir que não excedesse 0,6 bar, evitando assim a efeitos deletérios à fermentação, causados pela pressão parcial e permitindo a liberação controlada de gás quando necessário. Lodo anaeróbio tratado termicamente (10 g_{VSS}/L) foi usado nesses ensaios, e triplicatas foram monitoradas para cada condição: Vinhaça (VII - 25 g_{DQO}/L), HH10 (HH com 10 g/L de carboidratos) e HH20 (HH com 20 g/L de carboidratos). O pH do hidrolisado foi ajustado para 5 antes de e adicionado ao inóculo. A inoculação foi realizada a 50 °C e pH 5,5 por 72 horas. Todos os frascos foram purgados com N₂ por 1 minuto para garantir um ambiente anaeróbio, e a agitação foi mantida a 160 rpm. O biogás foi analisado utilizando um micromatógrafo gasoso (micro-CG), enquanto a fração líquida foi centrifugada e encaminhada para análise DQO e CLAE para determinação de substratos e metabólitos gerados. O efluente da fermentação foi centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e utilizado como matéria-prima para produção de CH₄ em uma digestão anaeróbia de dois estágios.

Figura 15 – Reator com manômetro acoplado e válvula para a liberação de gás utilizado neste trabalho



Fonte: Arquivo pessoal da autora

3.6.3 Fermentação com vinhaça e hidrolisado

A fermentação com vinhaça e hidrolisado hemicelulósico (HH) foi realizada em diferentes proporções de vinhaça:HH denominadas VH1, VH2 e VH3, conforme mostrado na Tabela 4. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, em batelada, utilizando reatores de 300 mL projetados com manômetro e válvula de alívio de gás e volume de trabalho de 135 mL, aplicando lodo anaeróbio tratado termicamente (10 g_{VSS}/L), 50 °C, pH 5,5 durante 72 horas. Os reatores foram purgados com N₂ por 1 minuto para garantir um ambiente anaeróbio sob 160 rpm de agitação.

Tabela 4 - Composição do meio de fermentação em reatores manométricos com liberação de gás utilizando vinhaça de cana-de-açúcar e hidrolisado de hemicelulose (HH) da palha de cana

Sistema	VH1	VH2	VH3
DQOt Vinhaça (g/L) ^a	25	10	7
DQOt HH (g/L) ^a	2	7	7
Vinhaça:HH ^b	12,5:1	1,43:1	1:1
DQOs (g/L) ^c	18,78 ± 0,20	12,85 ± 0,62	9,17 ± 0,49
Carbono (%) (m/m)	4,302	1,232	0,783
Nitrogênio (%) (m/m)	0,182	0,034	0,015
C/N	24	36	52
FAN (mg/L) ^d	652,70 ± 15,00	513,00 ± 7,63	391,80 ± 10,50
Carboidratos (g/L)	2,89 ± 0	4,69 ± 0,02	5,04 ± 0,45

^aDQOt: Demanda química de oxigênio (A quantidade de DQO utilizada foi calculada com base nos valores de DQO equivalente obtidos a partir da caracterização das matérias-primas (Tabela 5 e 6); ^bA relação foi calculada com base na DQOt da vinhaça e DQO do HH em (%); ^c DQOs: demanda química de oxigênio experimental do meio centrifugado; ^dFAN: Nitrogênio amino livre

5.7 PRODUÇÃO DE CH₄

5.7.1 Produção de CH₄ sequencial

Nesta etapa do trabalho, foi utilizado como matéria-prima o efluente da produção de hidrogênio (EPH) proveniente do meio contendo vinhaça ou HH (etapa 5.6.2) e vinhaça com HH (etapa 5.6.3), que apresentaram os melhores resultados em produção e rendimento de H₂. O objetivo desta fase do trabalho foi avaliar o potencial de produção de metano a partir do material residual da produção de H₂. A digestão anaeróbia foi realizada em reatores com

capacidade de 300 mL, projetados com manômetros e válvula de liberação de gás (Figura 15), foram operados em modo batelada com volume de trabalho de 135 mL. A pressão foi monitorada durante o experimento usando um manômetro do reator para garantir que não excedesse 0,6 bar. O meio reacional foi composto de lodo anaeróbio *in natura* (com a presença das arqueias metanogênicas) e EPH com a mesma relação DQO:SSV inicial da melhor condição de produção de H₂. O pH do sistema foi ajustado para 7,0 e os frascos purgados com N₂ a fim de garantir a anaerobiose. Assim, foram incubados em uma estufa à 35 °C durante 35 dias.

5.7.2 Produção de metano em um único estágio

A produção direta de metano, ou seja, sem a separação das fases fermentativa e metanogênica da digestão anaeróbia também foi estudada de forma comparativa. Este ensaio foi realizado utilizando HH (10 g/L de carboidratos), vinhaça (25 g_{DQO}/L) como matérias-primas, na mesma proporção DQO:SSV da produção em dois estágios. O pH do hidrolisado foi ajustado para 5 antes de ser adicionado ao inóculo. Além disso, foram analisados os efeitos dos potenciais inibidores na produção de CH₄. Estes ensaios foram comparados em termos de produção (mL/L), produtividade (mL/L.h) e rendimento (mLCH₄/g_{DQO}) com a produção sequencial de CH₄. Os experimentos foram conduzidos com os mesmos parâmetros da etapa 5.7.1.

5.7.3 Quantificação e cálculos de biogás

A pressão do reator selado foi medida exclusivamente no final do período de incubação usando um manômetro (Figura 14B). Para o reator equipado com uma válvula, a pressão foi monitorada continuamente durante todo o experimento usando um manômetro conectado ao reator (Figura 15). A determinação e quantificação do H₂, CO₂ e CH₄ foi feita por cromatografia em fase gasosa (CG) utilizando as colunas HP-PLOT U (3 m x 0,320 mm x 30 µm) sob temperatura de 90 °C e HP-PLOT Molecular sieve 5V (10 m x 0,32 mm x 12 µm) sob a temperatura de 100 °C. A temperatura do injetor foi de 90 °C e a temperatura de entrada da amostra de 110 °C. Hélio e nitrogênio foram utilizados como gases de arraste nas colunas HP-PLOT U e HP-PLOT Molecular sieve 5A, respectivamente.

O volume de gás normalizado foi calculado usando a equação de expansão isotérmica e o princípio de conservação de energia interna para gases ideais, conforme descrito na Equação (4). Nesta equação, P_{atm} representa a pressão atmosférica, P_{man} denota a pressão manométrica,

V_{HS} corresponde ao volume do espaço livre e V_{biogas} se refere ao volume de biogás (H_2 , CO_2 ou CH_4) à pressão atmosférica.

$$(P_{atm} + P_{man}) * V_{HS} = P_{atm} * V_{biogas} \quad (\text{Equação 4})$$

Os rendimentos de H_2 e CH_4 (NmL/g_{DQO}) (Y) foram calculados utilizando a Equação (5) por meio da razão entre V_{CH_4} e o consumo inicial de matéria orgânica, considerando valores experimentais.

$$Y_{H_2} \text{ ou } Y_{CH_4} = V_{HS}/DQO_{consumida} \quad (\text{Equação 5})$$

A equação de Gompertz modificada (Equação 3) foi empregada para estimar os parâmetros cinéticos da produção de H_2 e CH_4 (Barrera-Quintero *et al.*, 2017).

$$H(t) = H_{max} \exp^{-\exp \left[\frac{R_{max} \cdot e}{H_{max}} (\lambda_0 - t) + 1 \right]} \quad (\text{Equação 6})$$

na qual H é a produção de biogás (mL/L); H_{max} é o volume máximo acumulado (mL/L); R_{max} é a taxa máxima de produção de biogás em mL/(L.h) ou mL/(L.d); t é o tempo de incubação (horas ou dias); λ é a fase adaptativa (h ou d); e é a constante de Euler (2,71828).

Adicionalmente, o potencial energético do biogás (H_2 e CH_4) foi determinado utilizando a Equação (7)

$$E = HHV * Y * \rho \quad (\text{Equação 7})$$

Nesta equação, E (kJ/g_{DQO}) representa o potencial energético do biogás, HHV (kJ/g) é o maior valor calorífico dos componentes do biogás (55,5 kJ/g para CH_4 e 142 kJ/g para H_2) (Heywood, 1998), Y (NmL/g_{DQO}) denota o rendimento do componente do biogás e ρ (g/mL) representa a densidade do respectivo componente do biogás.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS

6.1.1 Caracterização da vinhaça

A vinhaça de cana-de-açúcar é amplamente investigada como matéria-prima para a produção de H_2 e CH_4 por fermentação, e as suas características composicionais estão descritas na Tabela 5. Da mesma forma, sua composição é bastante analisada em diversos estudos, porém apresenta variações devido à heterogeneidade desse efluente, principalmente referente ao processo de fermentação aplicado durante a produção do bioetanol (Almeida e Colombo, 2021; Fuess *et al.*, 2023a; Piffer *et al.*, 2022; Rego *et al.*, 2020).

Uma das características físicas desse efluente é a presença de material particulado (Figura 16). Logo, a quantificação da matéria orgânica foi realizada tanto na vinhaça *in natura* (DQO com sólidos) quanto na vinhaça centrifugada, revelando que 38% da matéria orgânica está associada à fração particulada. A avaliação do impacto destes particulados na produção de H_2 será discutida na seção 6.2.1.

Figura 16 – Representação dos sólidos presentes na vinhaça



Fonte: Arquivo pessoal da autora

Além disso, a maior parte da vinhaça é composta por compostos orgânicos, conforme indicado pela concentração de sólidos suspensos voláteis ($12,82 \pm 0,54$ g/L), que representam 94% dos sólidos totais (Tabela 5).

Tabela 5 - Caracterização da vinhaça de cana-de-açúcar usada como matéria-prima neste estudo

Parâmetro	Unidade	Média	Desvio
DQO-com sólidos ^a	g/L	37,7	± 1,7
DQO-vinhaça centrifugada	g/L	23,2	± 0,7
Sólidos totais	g/L	13,67	± 0,7
Sólidos voláteis	g/L	12,82	± 0,54
Carboidratos	g/L	1,55	± 0,01
Carboidratos após a hidrólise ^c	g/L	3,79	± 0,23
Glicerol	g/L	1,35	± 0,4
Ácido láctico	g/L	2,48	± 0,21
Ácido acético	g/L	1,53	± 0,08
Ácido propiônico	g/L	2,48	± 0,09
Etanol	g/L	0,79	± 0,07
Carbono	% (m/m)	11,38	± 0,25
Nitrogênio	% (m/m)	0,48	± 0,02
Hidrogênio	% (m/m)	11,31	± 1,00
Fósforo	mg/kg	55,76	± 2,94
C/N			24
pH	-		4,45

DQO: Demanda química de oxigênio; ^a DQO da vinhaça *in natura*; ^bDQO do sobrenadante da vinhaça centrifugada, sem particulados. Todos os compostos quantificados foram feitos a partir da vinhaça *in natura*; ^cA quantificação foi realizada após a vinhaça *in natura* ser submetida à hidrólise ácida seguindo o protocolo de Sluiter et al.2012. Os valores são a média e o desvio padrão da análise de três amostras (n = 3) de vinhaça *in natura*.

Os carboidratos solúveis ($1,55 \pm 0,01$ g/L) e os açúcares quantificados após hidrólise ácida ($3,78 \pm 0,23$ g/L) correspondem a açúcares residuais da fermentação alcoólica (Tabela 5). Para simplificar a discussão sobre o consumo de açúcar e o rendimento de H₂, esses açúcares serão considerados como glicose partindo da concentração do açúcar na forma monomérica. A hidrólise da vinhaça *in natura* revelou que 41% dos carboidratos estão conjugados em oligossacarídeos ou a outras moléculas. Uma variedade de carboidratos está presente na vinhaça, incluindo açúcares conjugados com aminoácidos (Couto, P. T. *et al.*, 2020). Esses compostos, conhecidos como melanoidinas, são recalcitrantes, de coloração escura, e se formam durante a reação de *Maillard* em efluentes termicamente tratados, como a vinhaça de cana-de-açúcar (Comparato *et al.*, 2024).

Já o glicerol ($1,35 \pm 0,04$ g/L) é produzido como um subproduto do metabolismo da levedura sob estresse osmótico. O ácido láctico ($2,48 \pm 0,21$ g/L) está presente devido à contaminação bacteriana, que ocorre durante a fermentação para a produção de etanol (Fuess, Garcia e Zaiat, 2018; Gonzalez, Campbell e Wong, 2010; Silva *et al.*, 2015). Esses são os

principais compostos orgânicos solúveis quantificados que podem ser utilizados como substratos na produção de H₂.

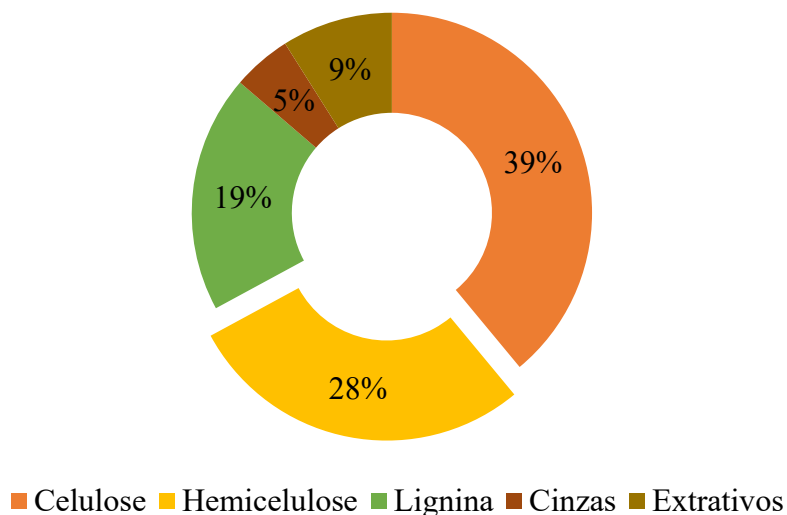
Na realidade, a vinhaça é considerada altamente ácida devido ao seu alto teor de ácidos orgânicos (Bernardes *et al.*, 2019; Rego *et al.*, 2020). Os ácidos, acético ($1,53 \pm 0,08$ g/L) e propiônico ($2,48 \pm 0,09$ g/L) determinados neste estudo (Tabela 5), são produtos da contaminação bacteriana na produção de etanol, mas são potenciais substratos para os microrganismos no processo de digestão anaeróbia para a produção de CH₄ (Fuess, 2024). Compostos não identificados, como proteínas, lipídeos e muitas vezes incluindo agentes corantes como melanoidinas, compostos fenólicos e subprodutos do metabolismo microbiano (Almeida e Colombo, 2021; Comparato *et al.*, 2024; Fuess, 2024) também estão presentes neste efluente, correspondendo a 70% do DQO total (Figura 18).

Foram quantificados elementos inorgânicos, incluindo o fósforo, que desempenha um papel essencial na produção de H₂ devido ao seu valor nutricional e à sua capacidade de tamponamento (Ananthi *et al.*, 2024). A razão carbono/nitrogênio (C/N) de 24 indica excesso de nitrogênio ($0,48 \pm 0,02\%$) em relação a carbono ($11,38 \pm 0,25\%$) (Cremonez *et al.*, 2021; Sillero, Solera e Perez, 2022). De uma perspectiva quantitativa, considerando as fontes de substrato e os aspectos nutricionais, como a relação C/N, a vinhaça se destaca como uma matéria-prima promissora para a fermentação. Deste modo, serão avaliados ajustes como temperatura, pH, centrifugação do material, alívio da pressão interna no reator e cofermentação com o hidrolisado hemicelulósico, visando alcançar taxas satisfatórias de produção de H₂.

6.1.2 Caracterização da palha de cana-de-açúcar *in natura*

A análise da palha de cana-de-açúcar utilizada neste estudo teve como objetivo avaliar a composição desse resíduo, assim como o seu potencial para a extração de hemicelulose, visando a produção de H₂ e CH₄. Assim, foi caracterizada e os teores de cada fração está apresentado na Figura 17, sendo especificamente $38,60 \pm 1,95$ % de celulose, $27,88 \pm 1,43$ % de hemicelulose, $19,00 \pm 0,68$ % de lignina, $4,71 \pm 0,82$ % de cinzas e $8,87 \pm 0,78$ % de extrativos. A palha pode apresentar teores variados de hemiceluloses, entre 27 - 31%, de celulose entre 29-44% e de lignina entre 19-34%, de extrativos entre 7-21% e de cinzas entre 2-11% (Almeida e Colombo, 2021; Menandro *et al.*, 2017; Tomasini, 2020). Essas variações são referentes à espécie vegetal utilizada, as condições de plantio, como fertilidade do solo, irrigação, condições climáticas, localização, ciclos de cultivo, o método de colheita, mas essas informações raramente estão disponíveis na literatura (Bizzo *et al.*, 2014; Menandro *et al.*, 2017).

Figura 17 - Composição química do lote único de palha de cana-de-açúcar, gentilmente fornecida pela empresa GranBio, e caracterizada conforme os protocolos “Determination of Extractives in Biomass” (Sluiter *et al.*, 2005) e “Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass” (Sluiter *et al.*, 2012).



Em síntese, a palha excedente do campo é utilizada para aumentar a quantidade de biomassa disponível para cogeração, e o conhecimento das suas características é fundamental para determinar o potencial energético desta biomassa. Com aspectos físico-químicos distintos aos do bagaço, a ocorrência de depósitos e corrosão em caldeiras ocasionados pelo uso da palha são frequentes nas usinas. Isto ocorre devido ao teor de cinzas e à sua composição química, que possui elementos na sua estrutura que foram absorvidos durante o desenvolvimento da cana, disponibilizados no solo por meio de fertilizantes, resultando em impurezas minerais (Camargo *et al.*, 2020). A título de exemplo, o silício (Si) é absorvido pela cana-de-açúcar em forma de ácido monossilícico (H_4SiO_4) presente no solo, transportado das raízes até o sistema de transpiração foliar pelo xilema. Estima-se que cerca de 80% do silício absorvido pela planta esteja concentrado na palha (Haynes, 2017; Santos, 2017). Além disso, estão presentes outros elementos e compostos na palha como óxido de potássio (K_2O), óxido de cálcio (CaO), fósforo (P), alumínio (Al), sódio (Na), ferro (Fe), cloro (Cl) e enxofre (S) (Barros *et al.*, 2022; Kumar, Upadhyay e Mishra, 2022). Estes minerais reduzem a eficiência da pirólise causando corrosão e contaminação em processos termoquímicos nas caldeiras, mostrando que a palha possui uma eficiência energética 64% menor comparado ao bagaço (Camargo *et al.*, 2020).

Dessa forma, a busca por novas alternativas para o uso da palha de cana-de-açúcar representa um campo promissor a ser explorado, visando tanto o tratamento desse resíduo quanto a geração de energia eficiente e limpa no setor sucroenergético.

6.1.3 Caracterização do hidrolisado hemicelulósico

O pré-tratamento com ácido diluído é amplamente utilizado na indústria e em estudos envolvendo a fração hemicelulósica, pois promove a liberação dos açúcares na forma monomérica, alcançando uma eficiência de recuperação de carboidratos entre 70% e 90% (Baksi *et al.*, 2023). Os compostos que caracterizam o hidrolisado hemicelulósico obtido após o pré-tratamento são apresentados na Tabela 6.

Logo, a solubilização de hemicelulose da palha apresentou: $35,42 \pm 0,20$ g/L de xilose, $6,03 \pm 0,23$ g/L de arabinose e $2,63 \pm 0,05$ g/L de glicose, não sendo identificado formação de HMF e furfural na análise deste hidrolisado. De acordo com a literatura, a concentração de ácido utilizado no pré-tratamento é diretamente proporcional à solubilização da xilana. No entanto, também está diretamente relacionado à formação de produtos da degradação de açúcares, o 5-hidroximetilfurfural e furfural (Baksi *et al.*, 2023). Neste estudo, o pré-tratamento com H_2SO_4 foi realizado em concentração de 2,9% (m/v), apresentando fator de severidade combinada (FSC) de 1,21, tido como de baixa severidade não havendo formação de pseudo-lignina (Kumar *et al.*, 2012). Desse modo, proporcionou alta recuperação de açúcares da hemicelulose sem a formação de compostos de degradação como os furânicos, gerando um hidrolisado de grande potencial fermentescível sem necessidade de detoxificação.

Tabela 6 - Caracterização do hidrolisado hemicelulósico da palha de cana-de-açúcar obtido após pré-tratamento com ácido diluído ($\text{H}_2\text{SO}_4 = 2,9$ % (m/v)) na proporção 1:4 (palha:ácido); 130°C por 30 min).

Parâmetro		Média		Desvio
DQO	mg/L	64,04	±	1,17
Glicose	g/L	2,63	±	0,05
Xilose	g/L	35,42	±	0,20
Arabinose	g/L	6,03	±	0,23
Ácido acético	g/L	5,60	±	0,14
Ácido fórmico	g/L	n.d	±	n.d
HMF	g/L	n.d	±	n.d
Furfural	g/L	n.d	±	n.d
Carbono	% (m/m)	41,67	±	0,76
Nitrogênio	% (m/m)	0,36	±	0,03
Hidrogênio	% (m/m)	10,69	±	0,18
Fósforo	mg/kg	48,94	±	0,95
C/N	-			116
pH	-			1,15

DQO: Demanda química de oxigênio

A desacetilação das hemiceluloses ocorre por meio da reação de hidrólise promovida pelos de íons hidrônio H_3O^+ da dissociação do ácido sulfúrico nos grupos acetil da glucoarabinoxilana (Carvalho, J. L. N. *et al.*, 2017; Mirmohamadsadeghi *et al.*, 2021). Neste contexto, foi liberado $5,60 \pm 0,14$ g/L de ácido acético, e os íons acetato podem interferir no processo fermentativo e de digestão anaeróbia, interferência que será discutida com mais detalhes na Seção 6.2.3.

A análise elementar do hidrolisado em relação ao teor de C, H, N e P mostrou que este contém elevadas proporções de carbono ($41,67 \pm 0,76\%$), hidrogênio ($10,69 \pm 0,18\%$) e baixo teor de nitrogênio ($0,36 \pm 0,03\%$) e fósforo ($48,94 \pm 0,95$ mg/kg). Esses resultados são bastante semelhantes aos encontrados na literatura em relação a palha de cana (KUMAR; UPADHYAY; MISHRA, 2022). A relação C/N do hidrolisado de 116 representa um material rico em carboidratos/carbono, uma questão relevante para cofermentação com vinhaça, matéria-prima com baixa concentração de açúcares (Tabela 5).

6.2 PRODUÇÃO DE H_2

6.2.1 Avaliação comparativa da produção de H_2 em condição mesofílica e termofílica em diferentes valores pH utilizando a vinhaça como matéria-prima

O impacto da temperatura e do pH na produção de H_2 a partir da vinhaça foi avaliado sob condições mesofílicas ($35\text{ }^\circ\text{C}$) e termofílicas ($50\text{ }^\circ\text{C}$), com pH fixado em 5,5 e 6,5 ao longo de 72 horas (Tabela 7). Além disso, um ensaio comparativo foi realizado utilizando apenas o sobrenadante da vinhaça, a fim de avaliar os efeitos do material particulado proveniente deste efluente no processo fermentativo. A produção máxima de H_2 foi alcançada em 24 horas sob condições termofílicas e pH 5,5, atingindo $97,17 \pm 3,33$ NmL/L, um valor 81% superior à fermentação mesofílica ($53,49 \pm 6,56$ NmL/L) e 71% maior em comparação com a fermentação a $50\text{ }^\circ\text{C}$ e pH 6,5 ($56,82 \pm 10,11$ NmL/L) no mesmo período. Já a vinhaça submetida à fermentação mesofílica com pH inicial de 6,5 não apresentou produção de H_2 .

Tabela 7 - Produção de H₂ utilizando vinhaça (15 g_{DQO}/L), cujas concentrações de matéria orgânica inicial das fermentações foram medidas por meio da DQO do meio centrifugado, pH e temperatura inicial das fermentações, degradação do substrato e metabólitos produzidos em reatores selados sem alívio de pressão. A pressão foi medida exclusivamente ao final de cada período de incubação e não excedeu 0,6 bar. A produção máxima de H₂ aconteceu no sistema denominado pVI

Sistema/Condições	Tempo (h)	H ₂ (NmL/L)	CO ₂ (NmL/L)	Carboidratos (g/L)	Ácido láctico (g/L)	Ácido acético (g/L)	Ácido butírico (g/L)	Ácido propiônico (g/L)	Etanol (g/L)
Vinhaça <i>in natura</i> 35 °C; pH 5,5; DQOs: 9,54 ± 1,71	0	0	0	0,39 ± 0,04	0,56 ± 0	0,54 ± 0,10	0	0,48 ± 0,03	0
	24	53,49 ± 6,81	157,96 ± 23,33	0,28 ± 0,04	0,05 ± 0	0,37 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0	0
	48	6,56 ± 0,15	124,72 ± 9,12	0,34 ± 0	0	1,78 ± 0,14	0,46 ± 0,04	0,55 ± 0,05	0,41 ± 0,02
	72	0 ± 0	179,74 ± 35,94	0,46 ± 0,02	0	2,22 ± 0,07	0,48 ± 0,19	1,21 ± 0,06	0,43 ± 0,08
Vinhaça <i>in natura</i> 35 °C; 6,5 DQOs: 11,31 ± 0,26	0	0	0 ± 0	0,31 ± 0	0,51 ± 0,04	0,53 ± 0,16	0	0,43 ± 0	0
	24	0	151,37 ± 0,97	0,33 ± 0,02	0,01 ± 0	1,52 ± 0,10	0,17 ± 0,01	0,70 ± 0,10	0
	48	0	92,18 ± 11,67	0,23 ± 0,02	0 ± 0	2,58 ± 0,05	0,50 ± 0,01	1,42 ± 0,14	0,39 ± 0,02
	72	0	214,02 ± 16,54	0,22 ± 0	0 ± 0	2,53 ± 0,04	0,46 ± 0,01	1,43 ± 0,08	0,45 ± 0,05
Vinhaça <i>in natura</i> (pVI) 50 °C; 5,5 DQOs: 11,00 ± 1,71	0	0	0 ± 0	0,40 ± 0,04	0,43 ± 0,04	0,65 ± 0,03	0 ± 0	0,48 ± 0,31	0
	24	97,17 ± 3,33	334,10 ± 18,57	0,47 ± 0,01	0,10 ± 0	0,97 ± 0	0,67 ± 0	0,76 ± 0,06	0
	48	37,78 ± 7,17	391,65 ± 53,56	0,28 ± 0,06	0,09 ± 0	1,39 ± 0,01	0,77 ± 0,02	0,75 ± 0,06	0
	72	0	364,83 ± 14,68	0,28 ± 0,08	0 ± 0	1,92 ± 0,33	0,78 ± 0,08	0,86 ± 0,08	0,16 ± 0,03
Vinhaça <i>in natura</i> 50 °C; 6,5 DQOs: 11,31 ± 0,58	0	0	0 ± 0	0,31 ± 0,07	0,51 ± 0,04	0,56 ± 0,11	0 ± 0	0,43 ± 0,03	0
	24	56,82 ± 10,11	233,93 ± 25,97	0,29 ± 0,09	0,13 ± 0	1,19 ± 0,32	0,39 ± 0,05	0,41 ± 0,13	0
	48	0	215,97 ± 37,84	0,21 ± 0,02	0	1,80 ± 0,20	0,48 ± 0,05	0,55 ± 0,06	0,08 ± 0,01
	72	0	379,35 ± 23,32	0,36 ± 0,01	0	1,76 ± 0,07	0,91 ± 0,07	1,60 ± 0,45	0,33 ± 0,04
Sobrenadante da vinhaça 50 °C; 5,5 DQOs: 9,53 ± 1,71	0	0	0	0,39 ± 0,04	0,56 ± 0	0,61 ± 0,08	0 ± 0	0	0
	24	79,31 ± 9,40	423,26 ± 14,54	0,23 ± 0,01	0,27 ± 0	0,76 ± 0,05	0,47 ± 0,05	0,14 ± 0	0
	48	0	337,93 ± 52,51	0	0,10 ± 0	1,26 ± 0,05	0,36 ± 0,03	0,44 ± 0,04	0
	72	0	192,86 ± 0,64	0	0	0,94 ± 0,04	0,54 ± 0,07	0,96 ± 0,37	0,16 ± 0,03

DQOs: DQO do meio centrifugado; pVI = denominação do sistema com 15 gDQO/L em reator selado que será comparado com os demais resultados utilizando vinhaça e cofermentação em reatores com alívio de pressão

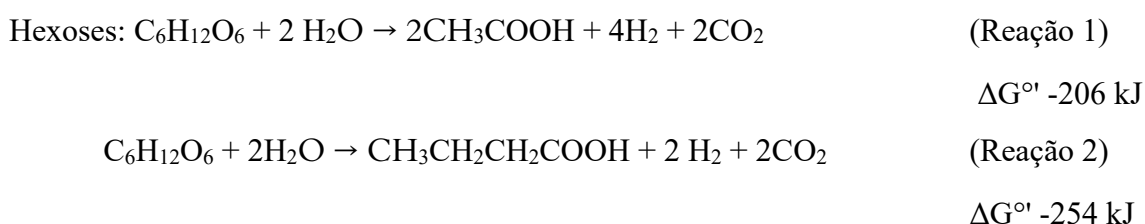
Diversos estudos indicam que a fermentação termofílica da vinhaça melhora as taxas de produção de H_2 , principalmente devido à menor solubilidade do gás em meio líquido em temperaturas elevadas (Ramos *et al.*, 2021; Ramos, Silva e Luis, 2019; Sillero, Solera e Perez, 2023; Toledo-cervantes *et al.*, 2020). Além disso, bactérias termofílicas tendem a ser mais promissoras do que as mesofílicas na fermentação (Ananthi *et al.*, 2024). O lodo de esgoto contém diversas espécies microbianas termo resistentes produtoras de H_2 , como *Thermoanobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Acinetobacter* spp., *Eubacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Enterococcus* spp., *Tissierella* spp., *Bacteroides* ssp. e *Streptococcus* spp. (Abendroth *et al.*, 2018; Carrillo-barragan *et al.*, 2019; Cieciora-Włoch, Borowski e Otlewska, 2020). A combinação entre fermentação termofílica e a presença natural de microrganismos termofílicos produtores de H_2 no lodo de esgoto representa uma abordagem altamente eficaz para a fermentação da vinhaça. Essa estratégia não apenas potencializa a eficiência metabólica das bactérias, mas também maximiza a produção de H_2 a partir desta matéria-prima.

Ramos *et al.* (2021) investigaram a produção sequencial usando vinhaça em processos termofílicos (acidogênese) e mesofílicos (metanogênese), bem como sistemas termofílicos em dois estágios. O estudo demonstrou que a combinação de um reator acidogênico termofílico com um reator metanogênico mesofílico alcançou maior flexibilidade e estabilidade, particularmente sob condições de sobrecarga orgânica (Ramos *et al.*, 2021). A fermentação da vinhaça sob condições termofílicas teve melhor desempenho na produção de H_2 também relatado por Toledo-Cervantes e colaboradores (2020). Seu estudo mostra que o aumento de rendimento de 16% na fermentação termofílica em comparação com a mesofílica usando vinhaça de tequila e a principal via metabólica envolvida foram a degradação de lactato e formato (Toledo-cervantes *et al.*, 2020).

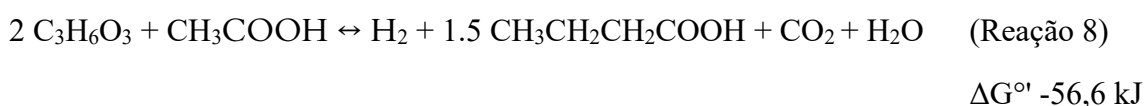
Na fermentação mesofílica e termofílica em pH 5,5, o ácido láctico foi a principal fonte de carbono convertida em H_2 e metabólitos solúveis, como o ácido butírico (Reação 8 – Tabela 2) (Fuess, 2024). Em geral, os carboidratos são a principal fonte de carbono utilizada por microrganismos em processos fermentativos para produção de H_2 (Reações 1 e 2 – Tabela 2), o que contrasta com os resultados obtidos nesta tese. O único sistema que apresentou consumo total de carboidratos foi aquele utilizando apenas o sobrenadante da vinhaça (Tabela 7), indicando que compostos presentes no material particulado desse efluente interferem na captação dos açúcares como fonte de substrato.

Comparato *et al.* (2024) demonstraram que os efeitos das melanoidinas no desempenho da fermentação estão ligados ao consumo de carboidratos livres no meio. Além disso, foi

relatado que estes compostos exibem efeito bactericida contra espécies de microrganismos como *Clostridium spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Enterococcus faecalis* e *Lactobacillus brevis*, algumas bactérias presentes no lodo de esgoto (Diaz-Morales *et al.*, 2022). Portanto, compostos recalcitrantes como as melanoidinas, amplamente relatados por outros autores (Comparato *et al.*, 2024; Fuess, 2024; Fuess, Garcia e Zaiat, 2018; Moraes *et al.*, 2019), não foram quantificados neste estudo mas essa explicação pode estar correlacionada com o fenômeno observado de baixo consumo de substratos e produção de H₂.

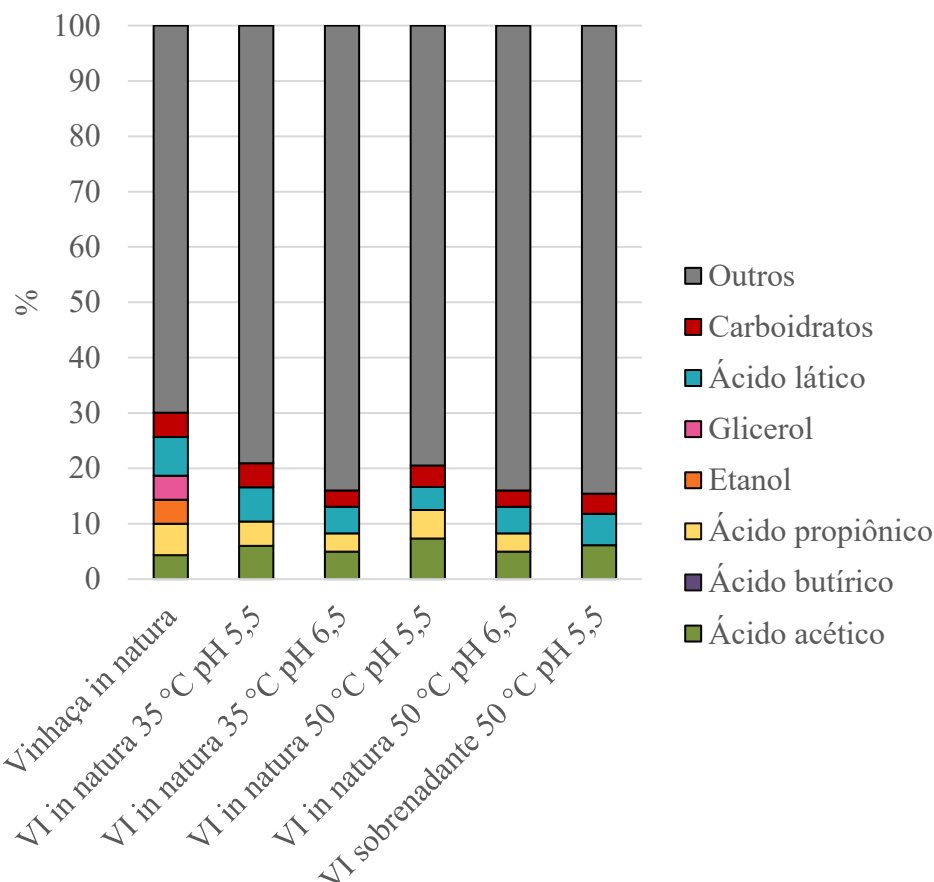


Ácido láctico:

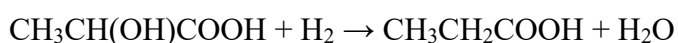


Cerca de 70% da DQO da vinhaça é atribuída a compostos ainda não identificados (Figura 18). Em um estudo de Luz *et al.* (2020), a análise de um extrato da vinhaça obtido com acetato de etila, por espectrometria de massa (LC-MS), revelou a presença de ácidos pinélico e tianásico, ambos ácidos graxos com potencial fitotóxico e antimicrobiano (Divya *et al.*, 2023; Luz *et al.*, 2020; Seukep *et al.*, 2020). Esses compostos, juntamente com as melanoidinas, compõem a fração de concentração desconhecida da vinhaça denominada como “outros” na Figura 18. A identificação desses componentes é desafiadora, uma vez que exige técnicas analíticas ainda não padronizadas, sendo atualmente objeto de estudos em desenvolvimento (Comparato *et al.*, 2024; Luz *et al.*, 2020). A baixa produção de H₂ observada a partir da vinhaça também pode estar associada à presença de compostos citotóxicos, como o ácido pinélico, que induzem morte celular, enquanto as melanoidinas afetam o consumo de carboidratos (Comparato *et al.*, 2024; Divya *et al.*, 2023; Seukep *et al.*, 2020).

Figura 18 – Composição percentual da vinhaça em termos de DQO na vinhaça *in natura* e pontos iniciais das fermentações apresentadas na Tabela 7. (VI) = Vinhaça

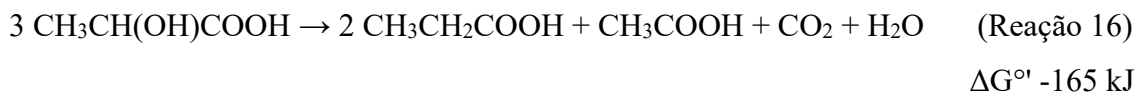


A conversão do lactato e acetato para butirato foi relatada como a principal rota metabólica envolvida na produção de H_2 a partir da vinhaça no processo termofílico em batelada (Toledo-cervantes et al., 2020) (Reação 8), comportamento também observado neste estudo (Tabela 7). Na fermentação termofílica e pH inicial 5,5 (pVI), 30% dos carboidratos da fermentação com vinhaça *in natura* foram consumidos em 72 h, enquanto em pH 6,5 nenhum consumo de açúcar foi observado até o final da fermentação (Tabela 7). No final da fermentação a pH 6,5, a concentração de ácido propiônico ($1,60 \pm 0,45$ g/L) foi 66% maior em comparação com a fermentação a pH 5,5 (pVI) ($0,86 \pm 0,08$ g/L). O propionato pode ser produzido a partir da fermentação do lactato (Reação 13 e 16 - Tabela 2) e representa o pior cenário de fermentação (Fuess *et al.*, 2020; Menezes, de *et al.*, 2023). Isto porque o ácido lático pode ser consumido juntamente com H_2 para a geração de ácido propiônico (Reação 13) e para formação conjunta de acetato (Reação 16), sendo esta última mais favorável termodinamicamente.



(Reação 13)

$$\Delta G^{\circ} -81,20 \text{ kJ}$$



Em todas as condições avaliadas — pH inicial de 5,5 e 6,5, a 35 °C e 50 °C — foi observada atividade homoacetogênica, caracterizada pela produção de acetato a partir de H₂ e CO₂ (reação 17). As fermentações foram conduzidas em reatores selados, sem liberação de gás, o que aumentou a pressão parcial de H₂ no sistema. Essa condição pode ter favorecido a reabsorção de H₂ na fase líquida, devido às limitações na transferência de massa entre as fases líquida e gasosa (Ferraz-Junior *et al.*, 2020; Pauss *et al.*, 1990). O acúmulo de H₂ induziu alterações nas rotas metabólicas, favorecendo seu consumo para a síntese de acetato e etanol (Patakova *et al.*, 2019). Em reatores em batelada e batelada alimentada, microrganismos homoacetogênicos podem consumir entre 11% e 45% do H₂ gerado (Augusto *et al.*, 2024; Saady, 2013). Estratégias para aumentar as taxas e rendimentos de produção de H₂ em processos fermentativos continuam sendo investigadas, com foco em superar os desafios associados à homoacetogênese, como limitações cinéticas e termodinâmicas, além da remoção de gases do *headspace* do reator (Wooshin Park, Seung H. Hyun, Sang-Eun Oh, Bruce E. Logan, 2005).



O acúmulo de acetato (até 1 g/L), juntamente com o aumento das concentrações de outros ácidos orgânicos (butírico e propiônico), pode causar danos celulares (Elbeshbishy *et al.*, 2017). Em pH 5,5, parte dos ácidos acético (pKa 4,75), butírico (pKa 4,80) e propiônico (pKa 4,88) que estão presentes no meio encontra-se na forma não dissociada e pode difundir-se para o interior das células, onde ocorre a dissociação intracelular. Esse processo resulta no acúmulo de prótons no citoplasma, provocando acidificação intracelular, o que pode ativar enzimas associadas à solventogênese, via metabólica que compete com a produção de H₂ (Basak *et al.*, 2020; Elbeshbishy *et al.*, 2017; Patakova *et al.*, 2019). Além disso, os ânions resultantes aumentam a osmolaridade citoplasmática, elevam a pressão de turgor contra a parede celular e induzem estresse celular. O transporte de prótons para o meio extracelular, como mecanismo de defesa, reduz ainda mais a disponibilidade intracelular de ATP, afetando o metabolismo microbiano (Elbeshbishy *et al.*, 2017; O-Thong *et al.*, 2008; Sá, de *et al.*, 2020). Embora o pH inicial de 5,5 tenha apresentado desempenho superior e pequena variação do pH ao final das fermentações, atingindo pH 5,4 na condição mesofílica e 5,9 na termofílica, em

comparação ao sistema iniciado em pH 6,5, a produção de H₂ ainda se manteve baixa nessa condição.

Em contraste, na fermentação em pH 6,5, os ácidos acético, butírico e propiônico estão predominantemente em suas formas dissociadas. Para manter a homeostase do pH intracelular, os microrganismos precisam compensar o influxo de prótons gerado pela dissociação dos ácidos. Esse processo requer energia metabólica, uma vez que o ATP é consumido para exportar ativamente íons H⁺ através da membrana celular, e consequentemente reduz as taxas de crescimento microbiano. O impacto do acúmulo de ácidos orgânicos sobre a integridade celular tem sido amplamente relatado na literatura (Lv *et al.*, 2023; Mirmohamadsadeghi *et al.*, 2021). Efeitos semelhantes também foram observados no presente estudo, uma vez que, na condição de pH inicial 6,5, a produção de H₂ foi baixa ou não quantificável e o pH final, na fermentação conduzida a 35 °C, caiu para 5,5, evidenciando acidificação do meio devido ao acúmulo de ácidos orgânicos; essa queda de pH é coerente com a ausência de produção de H₂, pois favorece rotas metabólicas não produtoras de H₂, como a via propiônica.

Além disso, em fermentações com pH superior a 6, as bactérias redutoras de sulfato (BRS) utilizam o H₂ da acidogênese para reduzir sulfato a sulfeto (Gil-Garcia *et al.*, 2018; Rogeri *et al.*, 2023), fato relevante na fermentação da vinhaça, matéria-prima rica em sulfato devido ao uso de ácido sulfúrico nas usinas de etanol para controle microbiano (Aguiar *et al.*, 2023; Ceccato-Antonini, 2018; Rego *et al.*, 2020). Esse consumo direciona o metabolismo para a sulfetogênese, outro fator que provavelmente impediu a detecção de H₂ na fermentação a pH 6,5 neste estudo.

Deste modo, o pH é um parâmetro crítico na atividade das hidrogenases e vias metabólicas adotadas pelos microrganismos (Ayodele *et al.*, 2023). Embora a atividade das hidrogenases não tenha sido quantificada neste trabalho, estudos anteriores relataram a estabilidade dessa atividade em uma faixa de pH entre 5,0 e 6,5 (Karim *et al.*, 2021; Zagrodnik, Duber e Seifert, 2022). Entre os ensaios realizados, a fermentação a pH 5,5 e 50 °C foi a mais favorável à geração de H₂ (Tabela 7). No entanto, a produção de H₂ permaneceu baixa, principalmente devido à operação em reatores selados. Neste contexto, foi implementado um sistema de alívio controlado de pressão por meio de um reator acoplado com manômetro e válvulas de liberação de gás, buscando melhorar a produção de H₂ e utilizar concentrações iniciais de DQO mais altas.

6.2.2 Avaliação da produção de H₂ utilizando vinhaça em maiores concentrações e alteração para reator manométrico com alívio de pressão

Como a condição termofílica a 50 °C e pH 5,5 foi a mais favorável para a produção de H₂, novos ensaios foram realizados nessas condições, porém utilizando uma vinhaça mais concentrada, com maior teor de matéria orgânica (25 g_{DQO}/L) em frasco selado (Figura 19A) e reator manométrico (Figura 19B). Nessa configuração, o meio apresentou o dobro de ácido láctico ($0,81 \pm 0,12$ g/L) e 1,7 vezes mais carboidratos ($0,66 \pm 0,02$ g/L) em comparação ao ensaio com 15 g_{DQO}/L (pVI) (Tabela 7).

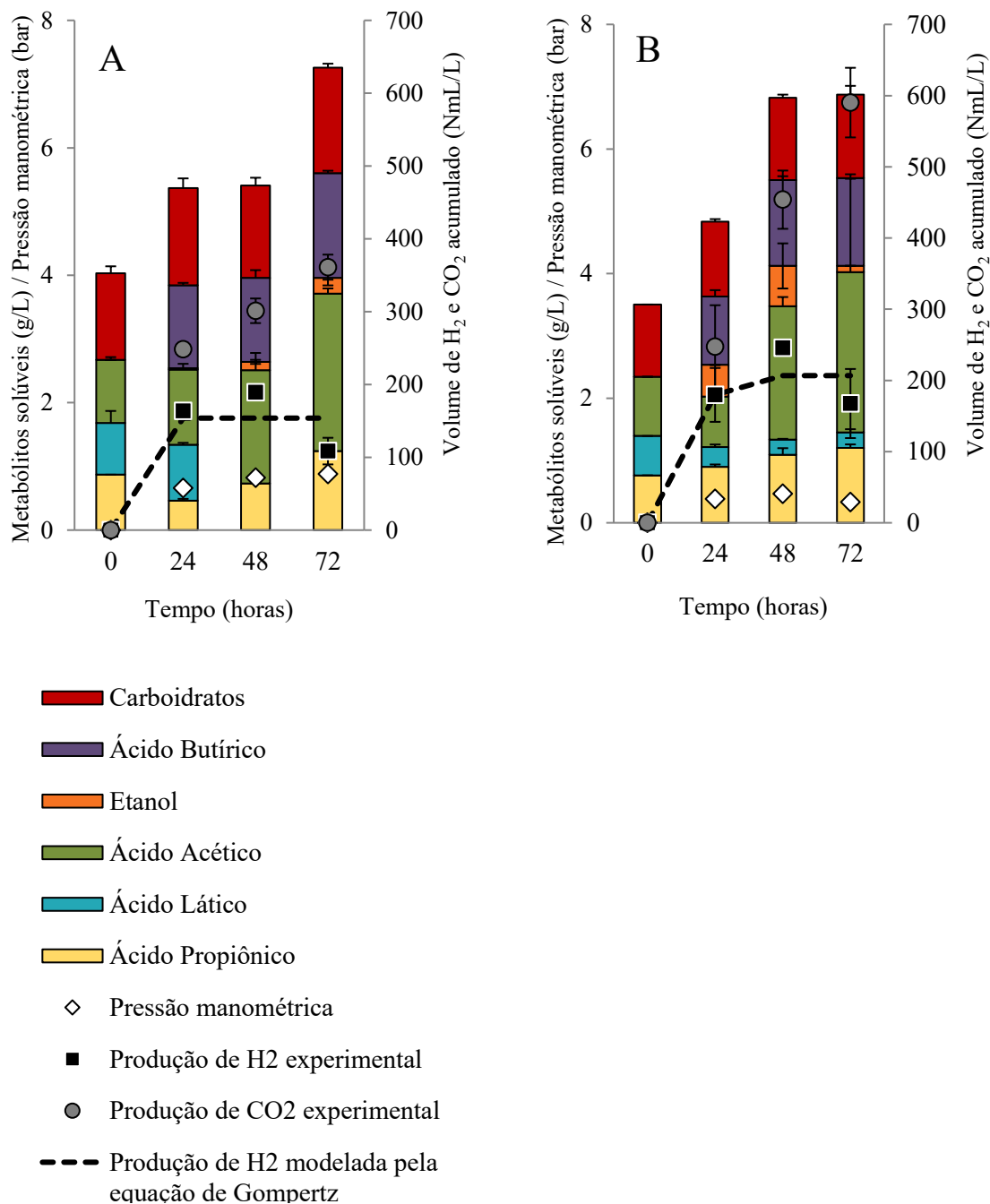
Comparando os sistemas em frasco selado, a produção de H₂ nas primeiras 24 horas do sistema com 25 g_{DQO}/L foi 68% maior ($163,53 \pm 2,62$ NmL/L) em relação ao sistema com 15 g_{DQO}/L (pVI), atingindo o pico de $189,24 \pm 9,26$ mLH₂/L em 48 horas (Figura 19A). Além disso, a produção de ácido butírico, principal metabólito associado à geração de H₂, foi aproximadamente duas vezes superior em 24 h de fermentação ($1,32 \pm 0,12$ g/L - Figura 19A) em comparação à condição com 15 g_{DQO}/L (pVI) (0,67 g/L - Tabela 7). O ácido láctico foi totalmente consumido em 72 horas, enquanto os carboidratos permaneceram no sistema durante esse período (Figura 19).

Em sistemas fechados, o aumento da pressão parcial no reator pode interromper a produção de H₂, favorecendo sua ressolubilização no meio líquido em função da limitação na transferência de massa entre as fases líquida e gasosa, uma vez que a taxa de produção de gás supera sua taxa de liberação para a fase gasosa (Ferraz Junior *et al.*, 2020; Pauss *et al.*, 1990). Esse acúmulo de H₂ no meio causa desvios nas rotas metabólicas, promovendo o consumo de H₂ para a síntese de acetato e etanol (Patakova *et al.*, 2019). Este fenômeno homoacetogênico e solventogênico foi observado no presente estudo, visto que os ensaios iniciais foram conduzidos em reatores selados de 100 mL, sem liberação de pressão, com vinhaça a 15 g_{DQO}/L (pVI) (Tabela 6), enquanto a Figura 19A exibe o perfil da fermentação com vinhaça a 25 g_{DQO}/L também em frasco selado. Neste último caso, a pressão interna dos reatores atingiu 0,9 bar após 48 horas de fermentação.

A alta pressão interna mostrou impactos negativos na produção de H₂, corroborando estudos anteriores que relatam efeito inibitório e de consumo de gás em pressões superiores a 0,6–0,8 bar (Cazier *et al.*, 2015; Fasheun, Silva, da, *et al.*, 2024). Considerando esses efeitos, foi implementado um reator adaptado com manômetro acoplado para monitoramento da pressão interna, além de uma válvula de alívio de gás, permitindo o alívio do gás durante a fermentação para evitar que a pressão ultrapassasse o limite crítico de 0,8 bar.

Deste modo, a Figura 19 mostra o perfil da produção de H_2 e metabólitos solúveis produzidos usando vinhaça na concentração inicial de 25 g_{DQO}/L usando um reator manométrico (VII). A produção de H_2 em 24 h de fermentação foi de $179,64 \pm 37,85$ mL/L, e atingiu a maior produção em 48 horas com uma geração de $245,86 \pm 8,56$ mL/L e 0,47 bar de pressão, aproximadamente 30% maior em comparação ao modo batelada com reator selado ($189,24 \pm 9,26$ NmL/L e 0,82 bar de pressão - Figura 19A). A análise estatística t-Student com um nível de significância de 5% revelou que a produção de H_2 não foi afetada (valor de $p > 0,05$) pela pressão parcial.

Figura 19 - Produção de hidrogênio a partir da vinhaça (25 g DQO/L) a 50 °C e pH 5,5 usando dois tipos de reatores: (A) reator selado (a pressão foi medida exclusivamente ao final de cada hora de incubação) e (B) reator manométrico (pressão avaliada durante a fermentação), denominado como experimento VII. A concentração do substrato e dos metabólitos é apresentada em barras, enquanto a produção experimental de H₂ e CO₂, em volume específico, é representada por marcadores, bem como a pressão interna do sistema. Parâmetros estimados pela modelagem dos dados experimentais de produção de H₂ pela equação de Gompertz: (A) 153,76 NmL/L (Hmax); 132,87 mL/L.h (Rm); 15 h (λ); 0,84 (R²); (B) 203,74 NmL/L (Hmax); 37,92 mL/L.h (Rm); 18 h (λ); 0,91 (R²);



Embora o sistema com reator manométrico (VII - Figura 19B) tenha permitido o alívio de pressão, a produção de H₂ não foi retomada após 48 horas, indicando que outros fatores, como a recalcitrância da vinhaça, podem exercer influência mais determinante sobre o processo do que a própria pressão parcial. A fermentação da vinhaça de cana-de-açúcar ainda enfrenta importantes desafios para alcançar altos volumes acumulados de H₂, principalmente devido às características intrínsecas dessa matéria-prima e à operação em modo batelada.

Observou-se um aumento de quase 40% na produção de CO₂ no sistema com alívio de pressão ($590,22 \pm 48,90$ NmL/L em 72 horas) em comparação ao sistema selado da Figura 19A ($364,83 \pm 14,68$ NmL/L), sugerindo elevada atividade metabólica no reator manométrico VII, ainda que não direcionada à geração de H₂. Esse comportamento é reforçado pela maior concentração de etanol obtida (0,65 g/L em 48 horas, Figura 19B), indicando atividade de vias redutoras, como a solventogênese (Mockaitis *et al.*, 2020).

Independentemente do tempo de fermentação, a produção de H₂ não se mantém ao longo do processo, cessando a partir de 72 horas, momento em que se observa o início do consumo de H₂ e a posterior produção de CH₄ (dados não mostrados). A utilização de um inóculo previamente adaptado ao meio complexo da vinhaça pode contribuir para aumentar a estabilidade da produção de H₂ (Bayu *et al.*, 2022; García-Depraect *et al.*, 2023). Nesse contexto, sistemas em modo contínuos são frequentemente usados para promover a adaptação microbiana, favorecendo o metabolismo dos compostos presentes na vinhaça e, conseqüentemente, elevando a geração de H₂ (García-Depraect *et al.*, 2023).

A Tabela 8 apresenta estudos comparativos sobre a produção de H₂ utilizando vinhaça como matéria-prima. Sillero *et al.* (2024) aplicaram quase o dobro da DQO inicial (49 g_{DQO}/L) em relação à utilizada neste estudo (25 g_{DQO}/L), além de realizarem a adaptação do inóculo em meio rico em carboidratos e suplementado para favorecer o crescimento celular, o que resultou em maiores volumes de H₂ produzido. Em contrapartida, Tena *et al.* (2020) utilizaram a maior DQO entre os estudos analisados (53 g_{DQO}/L), associada a um inóculo adaptado a condições termofílicas e a um meio igualmente enriquecido em nutrientes. No entanto, o uso de substratos-padrão para adaptação do inóculo antes da fermentação tende a ser economicamente inviável, ressaltando a importância da avaliação de alternativas mais acessíveis, como materiais naturalmente ricos em carboidratos. Essa abordagem foi explorada nesta tese, conforme

será discutido na seção 6.2.5, por meio da cofermentação de vinhaça e hidrolisado hemicelulósico (HH).

Tabela 8 - Estudos comparativos na produção de H₂ utilizando vinhaça como matéria-prima por fermentação em modo batelada e pH 5,5.

Matéria-prima	DQO inicial (g/L)	Temperatura (° C)	Tempo	H₂ (mL/L)	Referência
Vinhaça de cana-de-açúcar	11,6	36	42 horas	68	(Pouresmaeil, Nosrati e Ebrahimi, 2019)
Vinhaça de cana-de-açúcar	0,3	25	44 horas	6	(Peixoto <i>et al.</i> , 2012)
Vinhaça de vinho	53	55	8 dias	842	(Tena, Luque e Solera, 2020)
Vinhaça de cana-de-açúcar	49	55	-	458	(Sillero, Solera e Perez, 2023)
Vinhaça de cana-de-açúcar	25	50	48 horas	189	Este estudo (reator selado)
Vinhaça de cana-de-açúcar	25	50	48 horas	246	Este estudo (reator manométrico – VII)

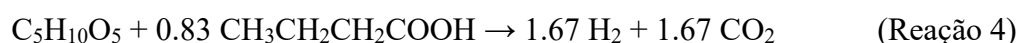
6.2.3 Produção de H₂ utilizando hidrolisado hemicelulósico como matéria-prima avaliando os efeitos de aumento de concentração inicial e pressão parcial nos reatores selados

A fermentação do hidrolisado hemicelulósico (HH) foi conduzida a 50 °C e pH inicial 5,5, parâmetros definidos a partir das condições determinadas nas fermentações com vinhaça. Para o estudo cinético da produção de H₂, foram testadas três concentrações iniciais de carboidratos de HH (1, 5 e 10 g/L), designadas como pHH1 (Figura 20A), pHH5 (Figura 20B) e pHH10 (Figura 20C), respectivamente, referentes a ensaios utilizando frascos selados. As pentoses (Reações 3 e 4 - Tabela 2) e a glicose (Reações 1 e 2 - Tabela 2) presentes no HH foram utilizadas como fontes de carbono para a fermentação, resultando na produção de H₂ e CO₂, juntamente com ácidos acético e butírico (Abdul *et al.*, 2013; Couto, P. T. *et al.*, 2020; Elbeshbishy *et al.*, 2017).

Pentoses



$$\Delta G^{\circ} -218,6 \text{ kJ}$$



$$\Delta G^{\circ} -257,4 \text{ kJ}$$

No sistema pHH1 usando reator selado (Figura 20A), a maior produção de H₂ foi alcançada em 24 horas, $451,76 \pm 14,94$ NmL_{H₂}/L, correspondendo a um aumento de 100% em comparação com o estudo anterior (Tomasini, 2020; Tomasini, Faber e Ferreira-Leitão, 2022), que atingiu $217,48 \pm 10,42$ NmL/L de produção de H₂ em 24 horas usando HH na mesma concentração inicial de carboidratos, mas em condição mesofílica (35 °C). Em temperaturas elevadas, a solubilidade do H₂ no meio líquido diminui, o que, por sua vez, reduz a atividade da homoacetogênese e favorece a maior liberação de H₂ para a fase gasosa. Estudos anteriores indicam que uma razão acetato-butirato (Hac/Hbut) superior a 1 sinaliza a predominância da via do acetato, enquanto valores inferiores a 1 indicam a predominância da via do butirato (Ginkel e Logan, 2005). Na fermentação do pHH1 sob condições termofílicas, a razão Hac/Hbut observada foi de 2,16, sugerindo que o processo favoreceu a rota do ácido acético, uma via associada a maiores rendimentos de H₂ (Reações 1 e 3). No entanto, essa razão não contempla a atividade homoacetogênica, na qual o aumento da concentração de acetato está relacionado ao consumo de H₂. De fato, o consumo de H₂ foi detectado após 24 horas de fermentação (Figura 20A), acompanhado por um aumento na concentração de acetato, especialmente entre 42 e 48 horas. Nesse intervalo, também foi observada a produção de etanol entre 18 e 36 horas, com posterior diminuição. Durante a fermentação, a reação entre acetato e H₂, catalisada pela CoA-transferase para formação de acetil-CoA, pode direcionar a produção de etanol via solventogênese (Reação 20 - Tabela 2).



Dessi et al. (2018) também compararam condições mesofílicas e termofílicas utilizando xilose padrão como substrato e observaram um rendimento de H₂ 17% superior na fermentação conduzida a 55 °C. A presença de bactérias termotolerantes em lodo de esgoto, já descrita na literatura (Abendroth *et al.*, 2018) e discutida nas seções 6.2.1 e 6.1.2, pode explicar essa melhora em termos de produção em condições termofílicas. Neste presente estudo, a glicose contida no pHH1 foi o primeiro carboidrato a ser completamente consumido, em apenas 4 horas de fermentação (0,10 g/L) (Figura 20A). Em seguida, a xilose, principal açúcar do meio ($1,22 \pm 0,12$ g/L), teve seu consumo iniciado efetivamente após 8 horas de fermentação, enquanto a arabinose começou a ser

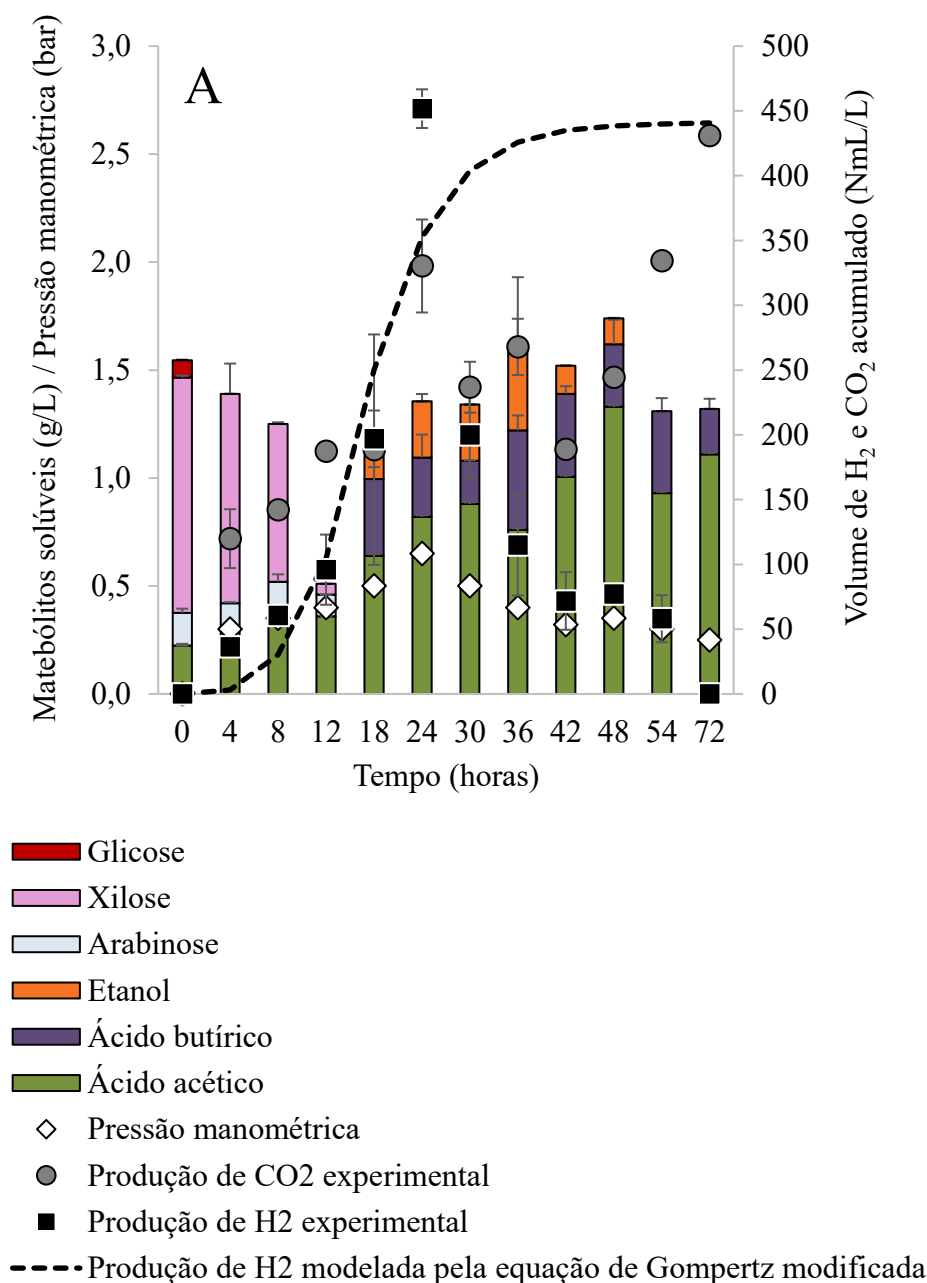
consumida a partir de 12 horas. A arabinose foi completamente metabolizada em 18 horas ($0,15 \pm 0,02$ g/L), e a xilose foi totalmente consumida após 24 horas de fermentação.

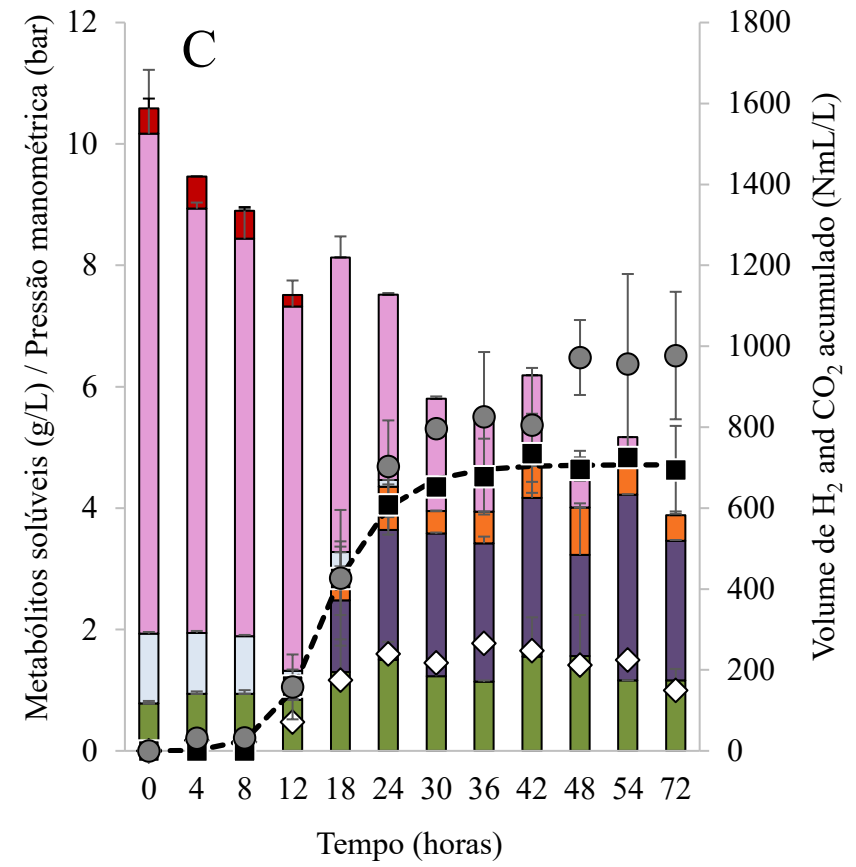
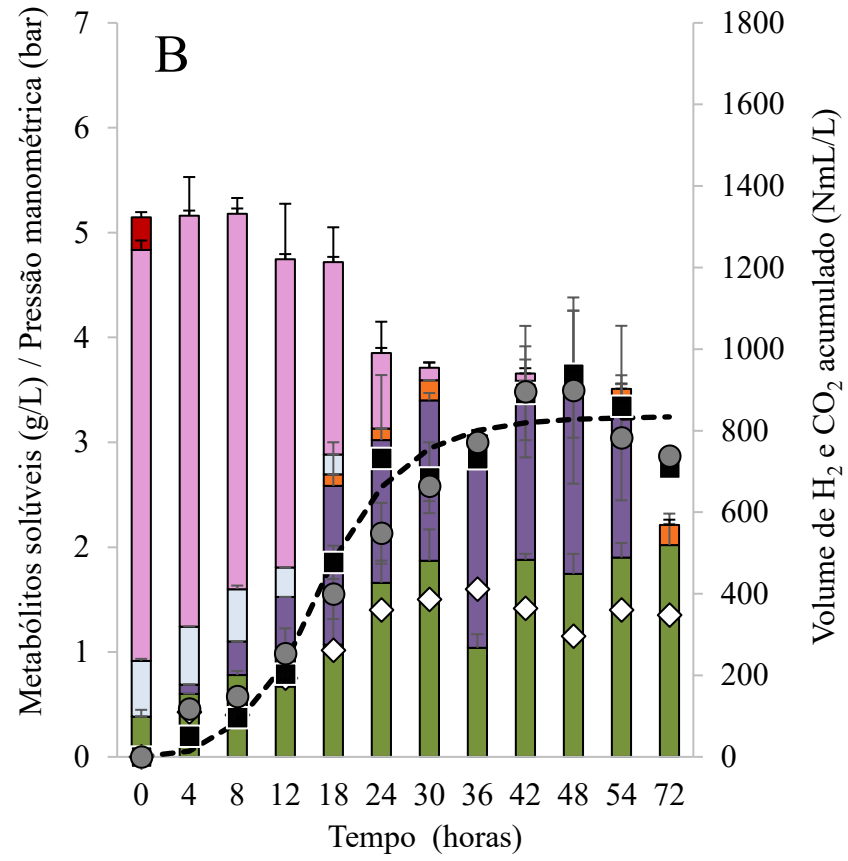
Microrganismos termófilos, como espécies dos gêneros *Caldicellulosiruptor*, *Anaerocellum* e *Thermoanaerobacterium*, destacam-se pela capacidade de metabolizar tanto pentoses quanto hexoses. Espécies de *Clostridium* também demonstram potencial genético para utilizar uma ampla variedade de carboidratos (Durre, 2005). A incorporação desses açúcares na célula ocorre por meio de proteínas de transporte de membrana específicas. Em *Clostridium acetobutylicum*, os mecanismos de transporte diferem entre pentoses e hexoses: enquanto açúcares de cinco carbonos são transportados por transportadores de cassete de ligação de ATP (ABC), carboidratos de seis carbonos são internalizados via sistema de fosfotransferase (PTS) (Tjo e Conway, 2024).

A afinidade do PTS clostridial pela glicose (K_m^1 entre 12 e 34 μM) é comparável à observada em outras bactérias, como *Bacillus*, que possui cerca de 50 transportadores diferentes para carboidratos (Durre, 2005). Embora o PTS seja amplamente estudado para transporte de hexoses, também se sabe que pode atuar no transporte das pentoses, embora o valor de K_m para esse processo ainda seja desconhecido. Em estudos com *Parageobacillus thermoglucosidasius*, Bidart *et al.* mostraram que a deleção da Enzima I do sistema PTS eliminou o crescimento em meios com hexoses, mas não em meios contendo xilose, sugerindo a existência de transportadores alternativos, como os do tipo ABC (Bidart, Gharabli e Welner, 2023). Posteriormente, a deleção da Enzima IIB específica para xilose aboliu também o crescimento nesse substrato, indicando que a difusão facilitada através da Enzima II é crucial para o transporte de xilose, mesmo sem fosforilação (Bidart, Gharabli e Welner, 2023). De forma semelhante, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* é capaz de metabolizar tanto hexoses quanto pentoses, mas exibe repressão do catabolismo de carbono na presença de açúcares mistos, assimilando preferencialmente a glicose (Dev, Jilani e Yazdani, 2022). Nesse contexto, o consumo de xilose só se intensifica quando a concentração de glicose atinge níveis baixos. Assim, em consórcios microbianos, fenômenos como a repressão catabólica podem ser observados, resultando na preferência inicial pela glicose devido à maior afinidade dos transportadores, seguida pelo consumo das pentoses.

¹ K_m : constante de Michaelis–Menten determinada experimentalmente, que corresponde à concentração de substrato necessária para que a velocidade da reação enzimática atinja 50% da velocidade máxima (V_{max}). No modelo de Michaelis–Menten, o K_m indica a afinidade da enzima pelo substrato: valores baixos refletem alta afinidade, enquanto valores elevados indicam afinidade menor.

Figura 20 - Produção de hidrogênio usando hidrolisado de hemicelulose nas concentrações iniciais de carboidrato 1g/L = pHH1 (A), 5g/L = pHH5 (B) e 10 g/L = pHH10 (C) a 50 °C e pH 5,5, em reatores selados sem alívio de pressão. A pressão foi medida exclusivamente ao final de cada hora de incubação. A concentração do substrato e dos metabólitos é apresentada em barras, enquanto a produção experimental de H₂ e CO₂, em volume específico, é representada por marcadores, bem como a pressão interna do sistema. Parâmetros estimados pela modelagem dos dados experimentais de produção de H₂ pela equação de Gompertz: HH1 = 316,25 NmL/L (Hmax); 25,89 mL/L.h (Rm); 7 h (λ); 0,84 (R²); HH5 = 833,94 NmL/L (Hmáx); 44 mL/L.h (Rm); 7 h (λ); 0,96 (R²); HH10 = 706,88 (Hmáx); 49,34 mL/L.h (Rm); 9 h (λ); 0,99 (R²).





O perfil metabólico e a produção de H₂ diferiram significativamente em fermentações conduzidas em maiores concentrações iniciais de substrato, como observado nos sistemas pHH5 (Figura 20B) e pHH10 (Figura 20C). No sistema pHH5, a maior produção de H₂ foi em 48 horas, alcançando $938,36 \pm 155,68$ NmLH₂/L, enquanto no pHH10 o pico de produção ocorreu em 42 horas, com um volume acumulado de $735,41 \pm 97,74$ NmLH₂/L. Após 42 horas de fermentação do pHH10, não foram observados aumentos significativos na produção de H₂ nem consumo relevante do gás em ambos os sistemas. Embora fosse esperado que o aumento da concentração de substrato e da temperatura do processo promovesse uma maior produção de H₂, em função da intensificação da transferência de massa líquido-gás (Karadagli, Marcus e Rittmann, 2019), o reator pHH5 não apresentou diferença significativa no volume acumulado de H₂ ($p > 0,05$) comparado a pHH10, apesar da maior disponibilidade de substrato neste último. A pressão manométrica em ambos os sistemas (pHH5 e pHH10) ultrapassou 1 bar, provocando desvio de rota para a homoacetogênese e solventogênese, assim como a postergação do consumo de substrato devido ao acúmulo de H₂ no sistema.

Em pHH5 houve alta produção de acetato de $2,02 \pm 0,3$ g/L de ácido acético em 72 horas. Contudo, a produção de H₂ não acompanhou proporcionalmente a formação de ácido, sendo consumido pela via homoacetogênica. Alguns autores utilizam a Equação 8 para descrever a quantidade de ácido acético que é gerado a partir da homoacetogênese, em que, [HAc], [HBu], [HPr] e [H₂] indicam a produção (mmol) de ácido aceito, ácido butírico, ácido propiônico e H₂, respectivamente (Zhao *et al.*, 2022).

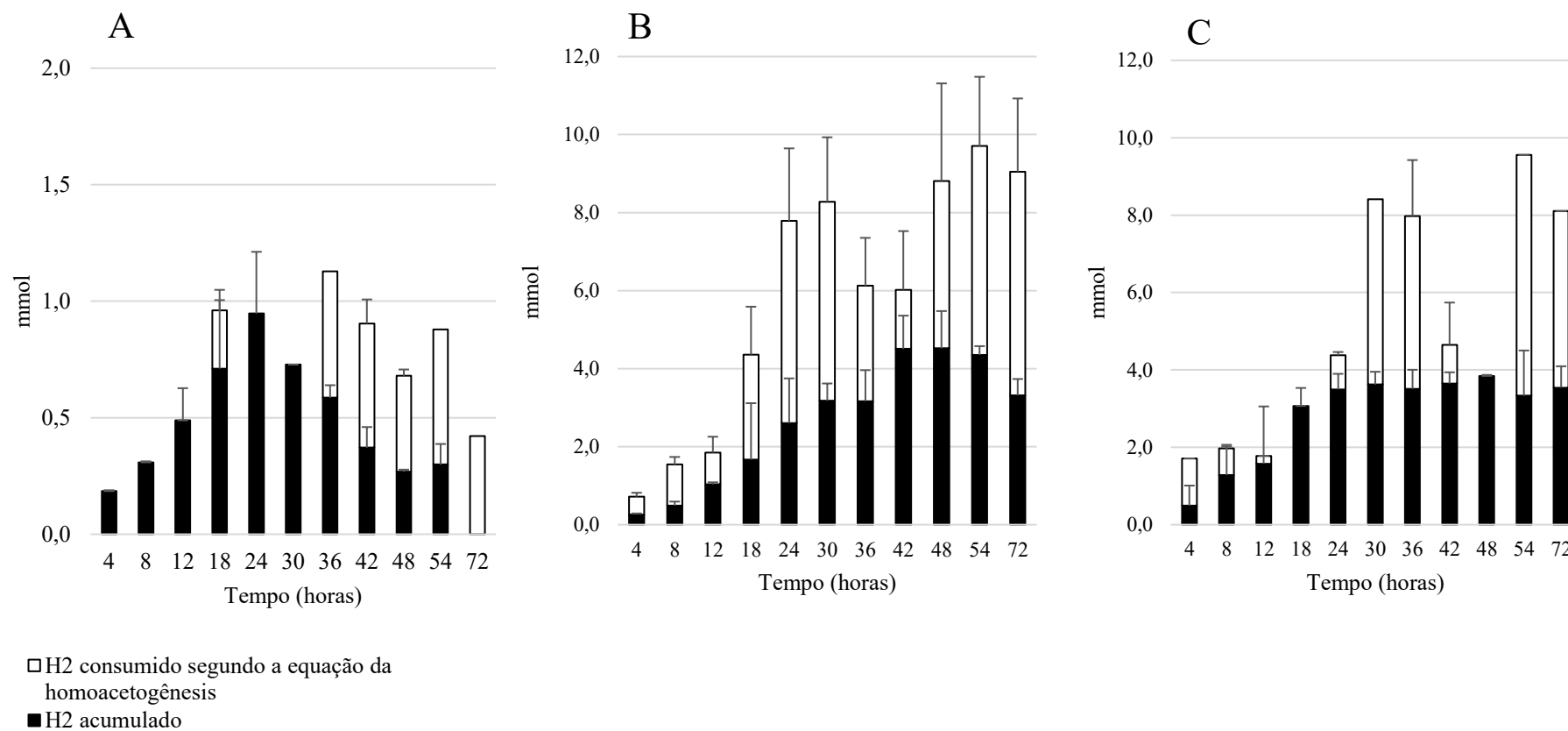
$$H_2 = 4 * \{(2[HAc] + 2[HBu] - [HPr] - [H_2]) / 6\} \quad (\text{Equação 8})$$

Conforme ilustrado na Figura 21, a análise do consumo de H₂ durante a reação de homoacetogênese evidencia diferenças entre os sistemas avaliados. Em pHH1 (Figura 21A), o consumo de H₂ para homoacetogênese torna-se evidente após 24 horas de fermentação, enquanto em pHH5 (Figura 21B) e pHH10 (Figura 21C) essa via metabólica já se encontra ativa desde as primeiras horas do processo. Essa diferença está associada à maior concentração de substrato e ao fato de os reatores estarem selados, condição que, ao aumentar a pressão parcial de H₂ sem alívios, favorece o acúmulo de H₂ dissolvido no meio, promovendo seu consumo pelas bactérias homoacetogênicas.

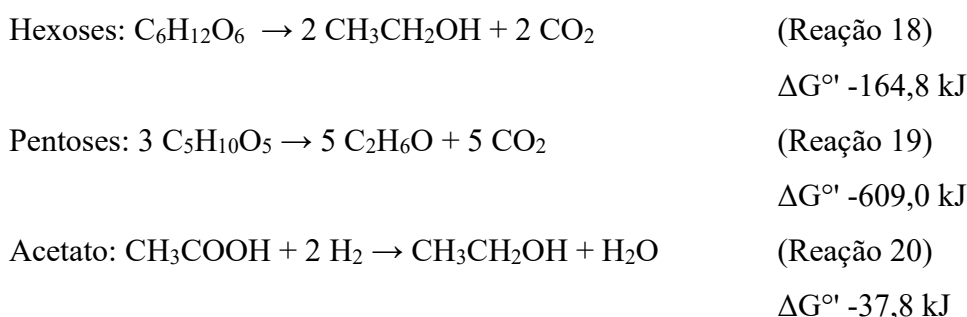
Aproximadamente 20% do H₂ gerado foi consumido pela homoacetogênese nos sistemas estudados. Ressalta-se que microrganismos homoacetogênicos podem consumir até

45% do H_2 produzido durante a fermentação, o que representa um dos principais desafios para a maximização da produção de H_2 (Augusto *et al.*, 2024).

Figura 21 – Correlação entre o hidrogênio produzido (barras pretas) e hidrogênio consumido pela homoacetogênese (barras brancas) de acordo com a equação 8 (Zhao *et al.*, 2022) nas concentrações iniciais de carboidrato 1 g/L = pHH1 (A), 5 g/L = pHH5 (B) e 10 g/L = pHH10 (C) a 50 °C e pH 5,5, em reatores selados sem alívio de pressão. A pressão foi medida exclusivamente ao final de cada hora de incubação.



Além disso, os sistemas pHH5 e pHH10 apresentaram indícios de transição metabólica da produção de H₂ para fermentação ABE (acetona-butanol-etanol). No pHH10, foram detectados $0,43 \pm 0,1$ g/L de etanol em 72 horas, enquanto no pHH5 essa produção foi de $0,19 \pm 0,01$ g/L. Na solventogênese, o H₂ produzido pelas vias acético-butírica, glicólise ou pentose-fosfato é doador de elétrons para a regeneração de NAD⁺, favorecendo a síntese de solventes como o etanol (Reações 18, 19 e 20) (Couto, P. T. *et al.*, 2020). Considerando que a conversão de pentoses em etanol é termodinamicamente mais favorável (Mockaitis *et al.*, 2020; Saady, 2013), sistemas com maior concentração de xilose tendem a apresentar maior produção de etanol, desde que as condições favoreçam essa via metabólica. Este fenômeno foi observado em pHH10 com a produção de 0,78 g/L de etanol em 48 horas (Figura 20C).



Apesar de pHH5 e pHH10 apresentarem volumes específicos de H₂ semelhantes ($p > 0,05$), os rendimentos ficaram abaixo do valor teórico previsto para a via acética (3,33 mol H₂/mol de carboidratos — Reação 3). O sistema pHH5 obteve o melhor desempenho, com um rendimento de 1,32 mol_{H₂}/mol_{carboidratos} em 48 horas, correspondente a uma eficiência de 40%, enquanto o pHH10 alcançou apenas 0,64 mol_{H₂}/mol_{carboidratos}, com eficiência de 19%. Ao final da fermentação, o pHH10 apresentou o ácido butírico como principal metabólito ($2,30 \pm 0,01$ g/L). A produção de H₂ pela via do butirato consome dois NAD⁺ juntamente com a geração de H₂ (Reação 7), o que reduz a quantidade final de H₂ produzido. Em sistemas como o pHH10, a pressão parcial de H₂ acima de 1 bar torna desfavorável termodinamicamente a liberação adicional de H₂ pela hidrogenase. Esse acúmulo dificulta a reoxidação do NADH para NAD⁺, reduzindo a eficiência da via fermentativa e desviando o metabolismo para rotas mais redutoras e menos produtoras de H₂, como a via butírica. A pressão parcial exerce um papel crucial no equilíbrio bioquímico da conversão de substrato em H₂ influenciando diretamente a seleção da via metabólica predominante (Ayodele *et al.*, 2023; Montoya-Rosales *et al.*, 2023). Assim, em relação ao consumo de carboidratos, o sistema pHH5 completou o processo em 48 horas, enquanto o pHH10 necessitou de 72 horas. Ao longo da fermentação, o aumento da pressão

parcial nos biorreatores interfere no equilíbrio redox intracelular entre NADH e NAD⁺, resultando no acúmulo de NADH dentro das células, o que gera um desbalanço redox que compromete o consumo de substrato e reduz a produção de H₂. (Canto-Robertos et al., 2023; Wang e Wan, 2009).

Na literatura, há estudos que investigaram estratégias para mitigar os efeitos da pressão parcial de H₂ por meio da remoção do gás produzido. A aspersão de H₂ do reator elevou o rendimento em 121%, enquanto a prática de manter o *headspace* inerte com nitrogênio resultou em um aumento de 56%, ambos em comparação com reatores não tratados (Massanet-Nicolau et al., 2010). Além disso, a redução da pressão parcial de H₂ pela aplicação de vácuo promoveu um incremento de até oito vezes na produção de hidrogênio em relação ao controle (Rajhi et al., 2016). Sistemas com concentrações iniciais elevadas de substrato foram avaliados por Fashuen et al. (2024) e Faber et al. (2022), que empregaram controle de pressão para evitar exceder 0,8 e 0,25 bar, respectivamente, alcançando maior produção de H₂ ao trabalhar com meios mais concentrados. Mandal et al. (2006) dobraram o rendimento de H₂ (1,9 mol_{H2}/mol_{glicose} para 3,9 mol_{H2}/mol_{glicose}) quando limitaram a pressão dos reatores de 1 atm para 0,5 atm. Vale ressaltar que este rendimento foi obtido com uma cultura pura de *Enterobacter cloacae*. Liu e Wang (2017) também investigaram o efeito de trabalhar com pressão reduzida em um CSTR e observaram um aumento da produtividade em 17 vezes com a redução da pressão de 0,9 atm para 0,2 atm. Além disso, a conversão de glicose atingiu 90% no reator operado a 0,2 atm (Liu e Wang, 2017).

No sistema pHH10, a produção de H₂ permaneceu estável até 72 horas, sem aumento significativo, mesmo com o acúmulo de pressão, que atingiu 1,78 bar em 36 horas — a maior pressão interna registrada. Esses resultados evidenciam os efeitos da saturação de H₂ devido à pressão parcial. Diante disso, adotou-se a estratégia de alteração do modelo de reator, utilizando um sistema equipado com manômetro acoplado e válvula para liberação controlada de gás, e foram avaliados meios contendo concentrações iniciais de carboidratos de 10 e 20 g/L.

6.2.4 Avaliação da produção de H₂ utilizando hidrolisado hemicelulósico em maiores concentrações e em reatores manométricos com alívio de pressão

A Figura 22 apresenta a cinética de produção de H₂, consumo de carboidratos e síntese de metabólitos solúveis nos sistemas HH10 (10 g/L de carboidratos iniciais — Figura 22A) e HH20 (20 g/L de carboidratos iniciais — Figura 22B), conduzidos em reatores manométricos equipados com válvulas para liberação de gás, a fim de manter a pressão manométrica abaixo

de 0,6 bar. No HH10, a produção de H_2 atingiu $1107,97 \pm 74,83$ NmL/L em 24 horas, representando um aumento de 82% em comparação à produção no sistema pHH10 ($608,70 \pm 74,45$ NmL/L - Figura 20C), sem liberação de pressão. Além disso, houve consumo total de carboidratos em 36 horas de fermentação (Figura 22A). Em 30 horas de fermentação, a produção de H_2 no sistema HH10 atingiu $1070,68 \pm 29,42$ NmL/L, estatisticamente igual à registrada em 24 horas ($p > 0,05$). No entanto, a concentração residual de carboidratos, especialmente da xilose, reduziu de $2,33 \pm 0,24$ g/L para $0,72 \pm 0,15$ g/L nesse intervalo. Dessa forma, a fermentação no HH10 em 30 horas foi considerada a condição ideal para a recuperação do efluente do meio fermentativo (EPH-HH10), visando à produção de CH_4 , ao se equilibrar a máxima produção de H_2 com a baixa concentração residual de carboidratos.

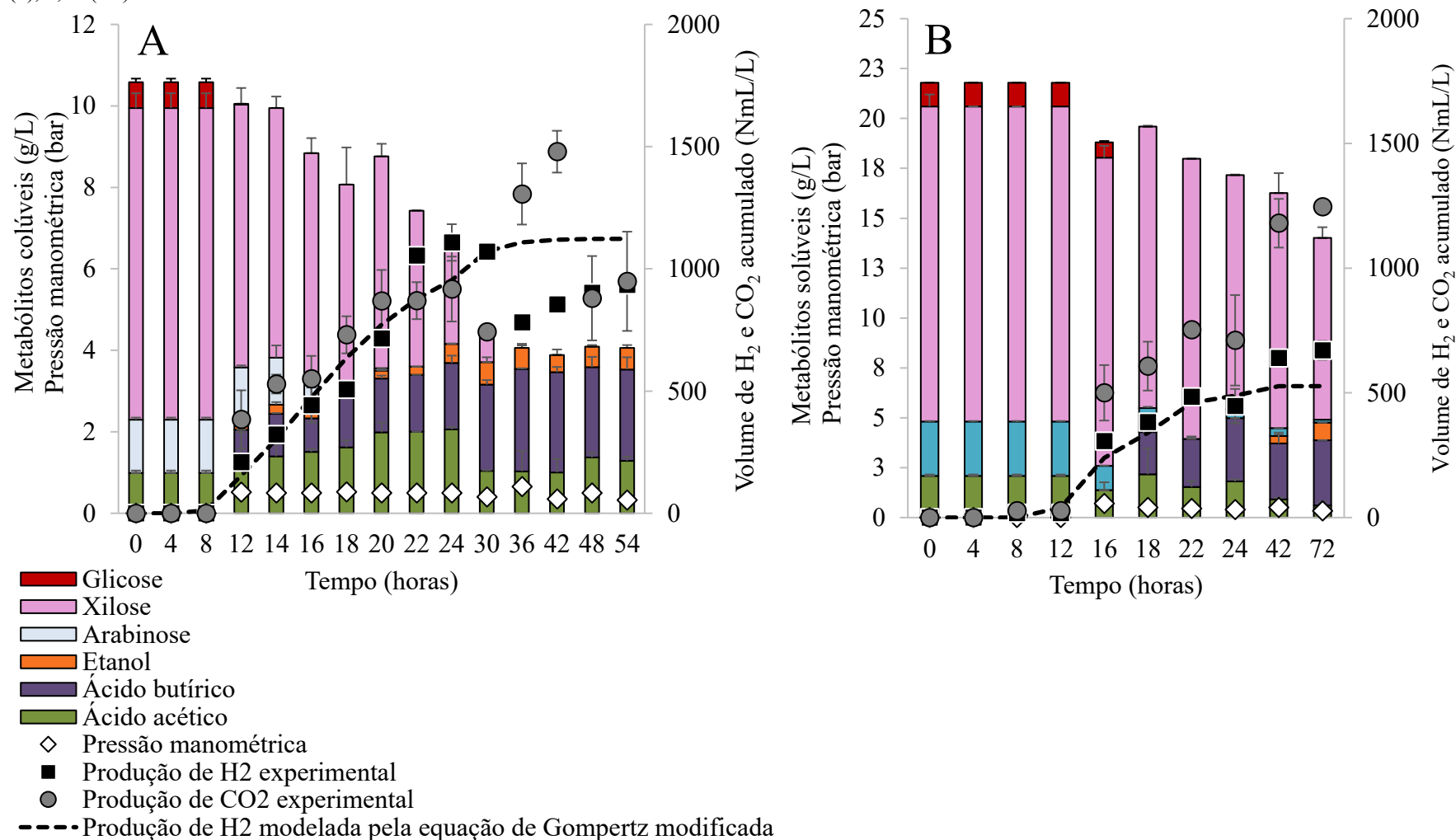
No sistema HH20 (Figura 22B), a produção de H_2 teve início por volta das 18 horas e atingiu a produção máxima em 72 horas, correspondendo a $670,24 \pm 37,26$ NmL/L. Este desempenho inferior revela claros efeitos de inibição, evidenciados pelo consumo de apenas 37% dos carboidratos ao final da fermentação. A elevada concentração inicial de xilose ($15,79 \pm 0,60$ g/L) em comparação ao sistema HH10 ($7,65 \pm 0,36$ g/L) sugere que a inibição por substrato pode ter sido um fator limitante. De fato, diversos estudos já relataram inibição associada a meios ricos em xilose, com variações dependendo do tipo de cultura: 10 g/L em sistemas com culturas mistas (Fangkum e Reungsang, 2011) e 20 g/L em culturas puras (Tomas, Karakashev e Angelidaki, 2011).

Em teoria, maiores concentrações de substrato favorecem o aumento da produção e do rendimento de H_2 , porém isso só se confirma na ausência de outros fatores inibitórios. No caso do HH20, mesmo com controle de pressão para evitar efeitos da pressão parcial, a elevada concentração de carboidratos em relação à biomassa microbiana disponível pode ter comprometido o desempenho do sistema. Além disso, o HH contém ácido acético em sua composição, proveniente da clivagem dos grupos acetil ligados à cadeia principal da xilana, os quais são liberados como acetato durante a desacetilação, favorecida por pré-tratamentos ácidos (Mirmohamadsadeghi *et al.*, 2021). Portanto, a concentração de acetato aumenta proporcionalmente ao aumento de concentração inicial de carboidratos adicionados no meio fermentativo, elevando a osmolaridade do sistema (Sá, de *et al.*, 2020). As concentrações de acetato inicial no HH20 é de $2,09 \pm 0,07$ g/L, em contraste com $0,99 \pm 0,06$ g/L observadas no HH10 (Figura 22A). Dentre os metabólitos avaliados, incluindo etanol, ácido propiônico e ácido butírico, o ácido acético destacou-se como o composto com maior impacto negativo sobre a produção de H_2 . Além disso, a elevada osmolaridade do meio contribuiu para o

prolongamento da fase de adaptação microbiana, que se estendeu por 13 horas, o maior tempo observado entre todos os sistemas avaliados.

Embora não haja consenso sobre a concentração exata de acetato para a inibição da geração de H_2 , vários estudos sugerem que valores próximos a 3 g/L podem comprometer significativamente a produção de H_2 (Chen, Yin e Wang, 2021; Tang *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2016). Van Ginkel e Logan (2005), por exemplo, observaram inibição completa da produção de H_2 em meio contendo 50 mM (aproximadamente 3 g/L) de ácido acético e butírico, operando a 30°C, pH 5,5, com glicose como substrato.

Figura 22 - Produção de hidrogênio usando hidrolisado de hemicelulose nas concentrações iniciais de carboidrato 10 g/L = HH10 (A) e 20 g/L = HH20 a 50 °C e pH 5,5, em reatores manométricos com liberação de gás. A pressão foi medida e liberada durante o experimento em cada hora de análise, garantindo que não excedesse 0,6 bar. A concentração do substrato e dos metabólitos é apresentada em barras, enquanto a produção experimental de H₂ e CO₂, em volume específico, é representada por marcadores, bem como a pressão interna do sistema. Parâmetros estimados pela modelagem dos dados experimentais de produção de H₂ pela equação de Gompertz: HH10P = 1123,18 NmL/L (Hmax); 86,03 mL/L.h (Rm); 10 h (λ); 0,97 (R2); HH20P = 526,88 NmL/L (Hmáx); 57,04 mL/L.h (Rm); 12h (λ); 0,96 (R2); HH10 = 706,88 (Hmáx); 49,34 mL/L.h (Rm); 9h (λ); 0,79 (R2).



A Tabela 9 resume os resultados da produção de H_2 relatado na literatura, a partir da fermentação em sistemas batelada utilizando hidrolisados hemicelulósicos de cana-de-açúcar, milho e arroz como matérias-primas. A produção de H_2 a partir da palha é complexa, mas demonstrou potencial como matéria-prima viável. Os resultados obtidos neste estudo superaram aqueles relatados na literatura em termos de tempo para a produção máxima de H_2 , concentrações de carboidratos e ao tipo de cultura microbiana empregada, seja ela pura ou consórcio microbiano. Contudo, a comparação direta dos rendimentos é equivocada, uma vez que os estudos anteriores utilizaram concentrações de carboidratos significativamente mais baixas.

Tabela 9 - Estudos comparativos na produção de hidrogênio usando frações de hemicelulose de palhas de cana-de-açúcar e arroz em batelada.

Biomassa	Matéria-prima	Inóculo	pH	Concentração inicial (g/L)	Temperatura (°C)	Tempo (h)	H ₂ (NmL/L)	H ₂ Yp/s	Referência
Palha de arroz	Hidrolisado ácido	Consórcio anaeróbio	7	5	28	48h	304	0,64 mol _{H2} /mol _{carboidratos}	Tsai, Du e Yang, 2021
	Hidrolisado hidrotérmico detoxificado	Consórcio anaeróbio	7	5	28	96 h	433	0,90 mol _{H2} /mol _{carboidratos}	Tsai, Du e Yang, 2021
Palha de arroz	Hidrolisado ácido	Lodo anaeróbio	6	n.r	34	96 h	1075	1,03 mol _{H2} /mol _{glicose}	Mechery <i>et al.</i> , 2021
	Hidrolisado alcalino	Lodo anaeróbio	6	n.r	34	96 h	937	0,9 mol _{H2} /mol _{glicose}	Mechery <i>et al.</i> , 2021
Palha de cana	Hidrolisado ácido	Lodo anaeróbio	5,5	5	35	36 h	1095	1,75 mol _{H2} /mol _{carboidratos}	Tomasini et al., 2022
Bagaço de cana	Hidrolisado ácido	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> KKU-ED1	6,5	5	55	-	840	1,12 mol _{H2} /mol _{carboidratos}	Saripan et al., 2013
Palha de cana	Hidrolisado ácido	Lodo anaeróbio	5,5	10	50	24	609	0,54 mol _{H2} /mol _{carboidratos}	Este estudo (sem alívio de pressão)
Palha de cana	Hidrolisado ácido	Lodo anaeróbio	5,5	10	50	24	1107	0,66 mol _{H2} /mol _{carboidratos}	Este estudo (com alívio de pressão)

Portanto, com base nos resultados obtidos, a condição termofílica é adequada para a produção de H_2 por fermentação utilizando HH. Em uma matéria-prima rica em carboidratos, à medida que a concentração do substrato aumentava, foram observadas mudanças de via metabólica em direção à solvogênese e homoacetogênese, parâmetros associados à pressão parcial de H_2 . Alguns pesquisadores relataram esse fenômeno e sugeriram que concentrações iniciais baixas/moderadas de substrato podem resultar em melhor rendimento de H_2 e desempenho de produção (Cota-Navarro *et al.*, 2011; Ginkel e Logan, 2005).

No entanto, a viabilidade econômica da produção biológica de H_2 a partir de resíduos, como vinhaça e palha de cana-de-açúcar, permanece desafiadora, particularmente quando se utiliza meios diluídos que requerem múltiplas bateladas. Esse desafio foi enfrentado empregando reatores manométricos especificamente projetados para permitir a liberação contínua de gás, evitando assim que as pressões excedam 0,6 bar e facilitando o uso de meios mais concentrados. No entanto, o sistema HH20 foi colapsado devido à alta osmolaridade do meio. A alta concentração de ácido na fermentação pode resultar em mudanças na dinâmica populacional microbiana, levando a uma redução ou interrupção na produção de H_2 (Canto-Robertos *et al.*, 2023). Estratégias para superar essa questão incluem o aumento da concentração de microrganismos no meio (Ghimire *et al.*, 2016; Mattiello-Francisco *et al.*, 2024).

Esses resultados confirmam que os sistemas devem ser avaliados individualmente, visto que cada material orgânico apresenta desafios específicos, como a biodegradabilidade do substrato (como observado com HH em concentrações de até 10 g/L) e o aumento da pressão parcial. Além disso, matérias-primas complexas, como o HH20, com altas concentrações de ácido acético, requerem mais investigação sob diferentes proporções de inóculo para otimizar sua utilização. Isso representa uma abordagem promissora para valorizar a fração C5, integrando palha de cana-de-açúcar ao processo de biorrefinaria, uma biomassa que permanece subutilizada na indústria sucroenergética devido às impurezas inerentes à sua composição.

6.2.5 Cofermentação da vinhaça e hidrolisado de hemicelulose de palha de cana-de-açúcar

A Tabela 10 apresenta os resultados da produção de H_2 , do consumo de substrato e da formação de metabólitos durante a cofermentação (VH) de vinhaça (VI) e hidrolisado (HH), comparados aos processos de fermentação realizados separadamente. A cofermentação VH1 alcançou uma produção de $389,60 \pm 60,61$ NmL/L de H_2 , representando um aumento de 58%

em relação ao VI1 ($245,86 \pm 8,56$ NmL/L), considerando DQO experimental equivalente, com o dobro da concentração de carboidratos e o mesmo período experimental.

Os açúcares derivados do HH melhoraram significativamente a produção de H_2 , como observado na cofermentação VH2 ($709,71 \pm 69,40$ NmL/L), que gerou sete vezes mais H_2 do que a fermentação apenas com vinhaça pVI ($97,17 \pm 3,33$ NmL/L). Embora o ensaio com pHH10 apresentasse o dobro da concentração de carboidratos (Tabela 10), a produção de H_2 foi estatisticamente equivalente à observada em VH2, sugerindo que outros fatores além da disponibilidade de substrato, como os efeitos de pressão parcial (Tópico 6.2.2), influenciaram o desempenho do sistema.

No caso do pHH5, que possuía a mesma concentração de carboidratos que VH2, a composição mais simples de pHH5 (principalmente composto por carboidratos) e a menor carga orgânica ($7,10 \pm 0,20$ g/L) comparado a VH2 ($12,85 \pm 0,62$ g/L), favoreceram a produção de H_2 . Deste modo, comparações diretas desses dois sistemas são injustas visto que a vinhaça possui diferentes compostos interferentes e recalcitrantes (Comparato *et al.*, 2024; Couto, P. T. *et al.*, 2020; Luz *et al.*, 2020). Vale destacar que no sistema pVI a produção de H_2 ocorreu apenas nas primeiras 24 horas; por isso, os dados desse ensaio referem-se a esse intervalo, visto que posteriormente houve apenas consumo de H_2 (Tabela 7).

Em processos fermentativos a relação carbono/nitrogênio (C/N) é um fator crítico que reflete o equilíbrio de nutrientes no meio, influenciando diretamente a síntese celular, o crescimento e o metabolismo microbiano. A relação C/N ideal pode variar conforme o tipo de substrato, o inóculo e as condições específicas de fermentação (Karim *et al.*, 2021). Embora diversos estudos tenham investigado o impacto das concentrações de nitrogênio na produção de H_2 , ainda não se definiu uma relação C/N universalmente ideal, devido à variabilidade inerente aos sistemas de fermentação e aos parâmetros operacionais (Tabela 3 - tópico C/N). Diversos autores sugerem que relações C/N entre 20 e 200 são apropriadas para a produção de H_2 (Karim *et al.*, 2021; Mattiello-Francisco *et al.*, 2024; Menezes, de *et al.*, 2023; Ribeiro *et al.*, 2024; Sillero, Solera e Perez, 2022; Volpi *et al.*, 2024). Relações inferiores a 6 podem ser tóxicas e prejudiciais aos microrganismos anaeróbios, devido à baixa disponibilidade de carbono e consequente superprodução de amônia (NH_3) (Shapovalov *et al.*, 2020).

Neste estudo, a proporção vinhaça:hidrolisado (VI:HH) foi definida para avaliar o potencial de digestibilidade da vinhaça, promovido pela adição de monômeros derivados do HH. A vinhaça foi incorporada ao meio em quantidades iguais ou superiores, de modo a respeitar a relação C/N adequada para o desenvolvimento microbiano. As misturas resultantes apresentaram relações C/N de 23,6 (VH1), 36,1 (VH2) e 52,2 (VH3) (Tabela 10).

Tabela 10 - Resultados comparativos da cofermentação (HV) com hidrolisado hemicelulósico e vinhaça; mono-fermentação da vinhaça (VI) e do hidrolisado hemicelulósico (HH) para produção de hidrogênio

	Cofermentação – Vinhaça e hidrolisado em reatores manométricos			Vinhaça em reator manométrico	Vinhaça em reator selado	Hidrolisado em reator selado		Hidrolisado em reator manométrico	
Sistema	VH1	VH2	VH3	VI1	pVI	pHH5	pHH10	HH10	HH20
DQOs (g/L)	18,78 ± 0,20	12,85 ± 0,62	9,17 ± 0,49	16,40 ± 0,3	11,00 ± 1,71	7,10 ± 0,20	12,30 ± 0,07	12,76 ± 0,15	16,06 ± 0,37
Carboidratos	2,89 ± 0,004	4,69 ± 0,002	5,04 ± 0,20	1,20 ± 0,04	0,40 ± 0,08	4,76	9,81	9,59	19,70
Razão VI:HH ^a	12,5:1	1,43:1	1:1	1:0	1:0	0:1	0:1	0:1	0:1
Carbono (%) (m/m)	4,3	1,23	0,78	7,55	4,52	4,72	9,45	9,45	18,62
Nitrogênio (%) (m/m)	0,18	0,03	0,01	0,32	0,19	0,041	0,082	0,08	0,16
C/N	24	36	52	23	23	115	115	115	116
Tempo de fermentação (h)	48	48	48	48	24	48	72	24	72
Consumo de substrato (%)	72	88	92	62	30	100	100	76	53
Produção de H ₂ (NmL/L)	389,60 ± 60,61	709,71 ± 69,40	649,13 ± 41,50	245,86 ± 8,56	97,17 ± 3,33	938,36 ± 155,68	797,92 ± 135,48	1107,97 ± 74,83	670,24 ± 37,56
Produção de CO ₂ (NmL/L)	751,28 ± 87,95	990,91 ± 96,46	804,11 ± 61,65	453,87 ± 40,92	334,10 ± 18,57	898,34 ± 228,36	1063,69 ± 163,39	917,38 ± 132,79	1246,44 ± 1,33
Ácido acético final (g/L) ^{b,c}	1,88 ± 0,03	0,72 ± 0,09	0,79 ± 0,003	2,14 ± 0,15	0,97 ± 0	1,75 ± 0,19	1,74 ± 0,20	2,06 ± 0,06	0,61 ± 0,19
Produção de ácido acético (g/L) ^c	1,35 ± 0,03	0,40 ± 0,09	0,20 ± 0,06	1,19 ± 0,15	0,32 ± 0,03	1,36 ± 0,18	0,96 ± 0,10	1,07 ± 0,06	*
Produção de ácido butírico (g/L)	2,18 ± 0,08	1,51 ± 0,11	1,66 ± 0,22	1,38 ± 0,06	0,66 ± 0	1,58 ± 0,69	2,42 ± 0,02	1,63 ± 0,18	3,27 ± 0,02
Ácido propiônico final (g/L)	0,75 ± 0,13	0,77 ± 0,02	-	1,09 ± 0,10	0,76 ± 0,06	-	-	-	-
Produção de ácido propiônico (g/L) ^c	0,39 ± 0,10	0,37 ± 0,02	-	0,33 ± 0,10	0,28 ± 0,06	-	-	-	-
Produção de etanol (g/L)	0,66 ± 0,04	0,16 ± 0,03	0,22 ± 0,03	0,65 ± 0,30	-	0,12 ± 0,01	0,78 ± 0	0,50 ± 0,04	0,38 ± 0,07

^aDQOs: Demanda Química de Oxigênio do sobrenadante do meio de fermentação.; ^bA relação foi calculada com base na DQO da vinhaça e do HH; ^cConcentração inicial de ácido acético: 0,53 g/L (VH1), 0,32 g/L (VH2), 0,59 g/L (VH3), 0,95 g/L (VI1), 0,65 g/L (pVI1), 0,39 g/L (pHH5), 0,78 g/L (pHH10), 0,99 g/L (HH10), 2,09 g/L (HH20); ^dConcentração inicial de ácido propiônico: 0,36 g/L (VH1), 0,40 g/L (VH2); *somente consumo.

O perfil metabólico da cofermentação é apresentado na Figura 23, sendo que a Figura 23A corresponde ao ensaio VH1, a Figura 23B ao ensaio VH2 e a Figura 23C ao ensaio VH3. Observa-se que, tanto na cofermentação quanto na fermentação individual das matérias-primas (Figura 19), o ácido láctico foi o primeiro metabólito consumido quando a vinhaça está presente no processo fermentativo. Embora não tenham sido identificados neste estudo, compostos como as melanoidinas, no qual é investigado na vinhaça em estudos da literatura, são relatados como agentes capazes de influenciar o consumo inicial de açúcares, favorecendo o desenvolvimento de microrganismos do gênero *Lactobacillus* (Comparato *et al.*, 2024).

Além disso, outros compostos com efeitos citotóxicos são encontrados nesse efluente, atuando como agente antimicrobiano (Divya *et al.*, 2023; Seukep *et al.*, 2020). Neste cenário, em ensaios com menores concentrações de vinhaça, como na cofermentação VH3, o impacto negativo sobre as células é reduzido, permitindo uma metabolização mais eficiente da glicose (Figura 23C). Como resultado, observou-se um consumo de 92% do substrato em 48 horas, em contraste com os 30% registrados na fermentação da vinhaça (pVI), referente apenas ao consumo de lactato. Além disso, em 72 horas de fermentação houve consumo total de substratos em VH3 (Figura 23C). Embora a produção de H₂ em VH2 e pHH10 tenha sido estatisticamente equivalente ($p > 0,05$), a presença de carboidratos altamente biodegradáveis do HH impulsionou significativamente o consumo de substrato, atingindo 88% em VH2, frente aos 30% observados em pVI.

O meio VH3 foi o único que não apresentou formação de ácido propiônico durante a fermentação, pois resultou da combinação em proporção 1:1 de vinhaça (VI) e hidrolisado hemicelulósico (HH). Como a concentração propiônica em VH3 esteve abaixo do limite de quantificação e o HH não contém propiônico, não houve produção neste sistema. Considerando que o propionato está frequentemente associado à instabilidade e à inibição do processo fermentativo (Fuess et al., 2023b), sua ausência em VH3 contribuiu para um comportamento distinto, refletido em maior biodigestibilidade em comparação aos demais meios. Isso ocorre porque o propionato deixou de atuar como um dos analitos que elevam a osmolaridade e impõem estresse adicional ao sistema fermentativo.

A literatura reforça que a cofermentação de outras matérias-primas com a vinhaça pode potencializar a conversão de substratos em H_2 , especialmente sob baixas cargas orgânicas. Menezes et al. (2023) relataram uma produção de $1.851 \text{ mL } H_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ a partir da cofermentação de glicerol e vinhaça, atribuída ao glicerol como fonte de carbono para crescimento celular. Em estudo semelhante, Ribeiro *et al.* (2024) observaram um aumento de 55% na produção de H_2 ao utilizar melaço como co-material, alcançando $2,8 \text{ L } H_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, e relacionaram esse desempenho à maior assimilação de carboidratos em comparação ao glicerol. Esses resultados destacam o papel de fontes de carbono com alta biodegradabilidade no estímulo ao crescimento microbiano e, consequentemente, à produtividade. No entanto, é importante ressaltar que tais estudos não consideraram as relações C/N sob investigação. Para fins comparativos, a Tabela 11 apresenta uma seleção de estudos sobre a cofermentação da vinhaça e com soro de leite, que também é um efluente gerado em grandes volumes pela indústria de laticínios. Entretanto, não são todos os trabalhos que realizaram a fermentação das matérias-primas isoladamente, o que limita a comparação direta entre as produções de H_2 obtidos na cofermentação e na fermentação.

Tabela 11 – Estudos comparativos de cofermentações de resíduos e efluentes agroindustriais, utilizando lodo anaeróbio como inóculo em condição termofílica de 55°C

Matéria prima	Relação	Concentração inicial	Modo de operação	pH	H₂	Referência
Vinhaça e Torta de filtro	15:1 (TS)	0,20 g _{VS} /mL	Batelada	5,5	95 NmL H ₂ g _{VS} ⁻¹	(Volpi <i>et al.</i> , 2024) (Sillero, Solera e Perez, 2022)
Esterco de aves e vinhaça de vinho	49,5:49,5:1 (DQO)	50 g _{DQO} /L	Batelada	7,5	730 mL/L	(Almeida <i>et al.</i> , 2022)
Soro de queijo e glicerol	1:1 (DQO)	90 g _{DQO} /L·d ⁻¹	Contínuo	4,1	3.9 L·L ⁻¹ ·d ⁻¹	(Menezes, de <i>et al.</i> , 2023)
Vinhaça e glicerol	1:1 (DQO)	120 g _{DQO} /L·d ⁻¹	Contínuo	-	1,8 L·L ⁻¹ d ⁻¹	(Ribeiro <i>et al.</i> , 2024)
Vinhaça e melaço	1:1 (DQO)	30 g _{DQO} /L·d ⁻¹	Contínuo	7,1	2,8 L·L ⁻¹ ·d ⁻¹	
Vinhaça e hidrolisado hemicelulósico	12,5:1 (DQO)	18,78 g_{DQO}/L	Batelada	5,5	389,60 NmL/L	Este trabalho

Segundo Volpi e colaboradores (2023), a silagem da torta de filtro em conjunto com a vinhaça, além de proporcionar um ambiente anaeróbio favorável à fermentação, elevou significativamente o rendimento de H₂ (95 NmL_{H₂}/g_{VS}), em comparação à torta de filtro *in natura* (63 NmL_{H₂}/g_{VS}) (Volpi *et al.*, 2024). Almeida (2022) destacou o uso do soro de leite e glicerol em uma cofermentação. Uma das vantagens apontadas foi a regulação do pH sem a necessidade de adição de reagentes químicos, como bicarbonato, cuja aplicação pode inviabilizar economicamente o processo. A cofermentação com resíduos tamponantes se apresenta, assim, como uma alternativa ambientalmente sustentável e de baixo custo para manter a estabilidade do sistema. Nesses experimentos, os rendimentos obtidos foram três vezes superiores aos observados na mono-fermentação de soro de leite.

Em resumo, os resultados evidenciam que a cofermentação proporciona um aumento expressivo na produção de H₂. O presente estudo reforça que a incorporação de uma matéria-prima rica em carboidratos pode favorecer a adaptação microbiana a meios contendo outros substratos recalcitrantes, como a vinhaça, aumentando a biodigestibilidade do sistema. Isto também valida a opção de valorização simultânea de dois resíduos agroindustriais em um único processo fermentativo.

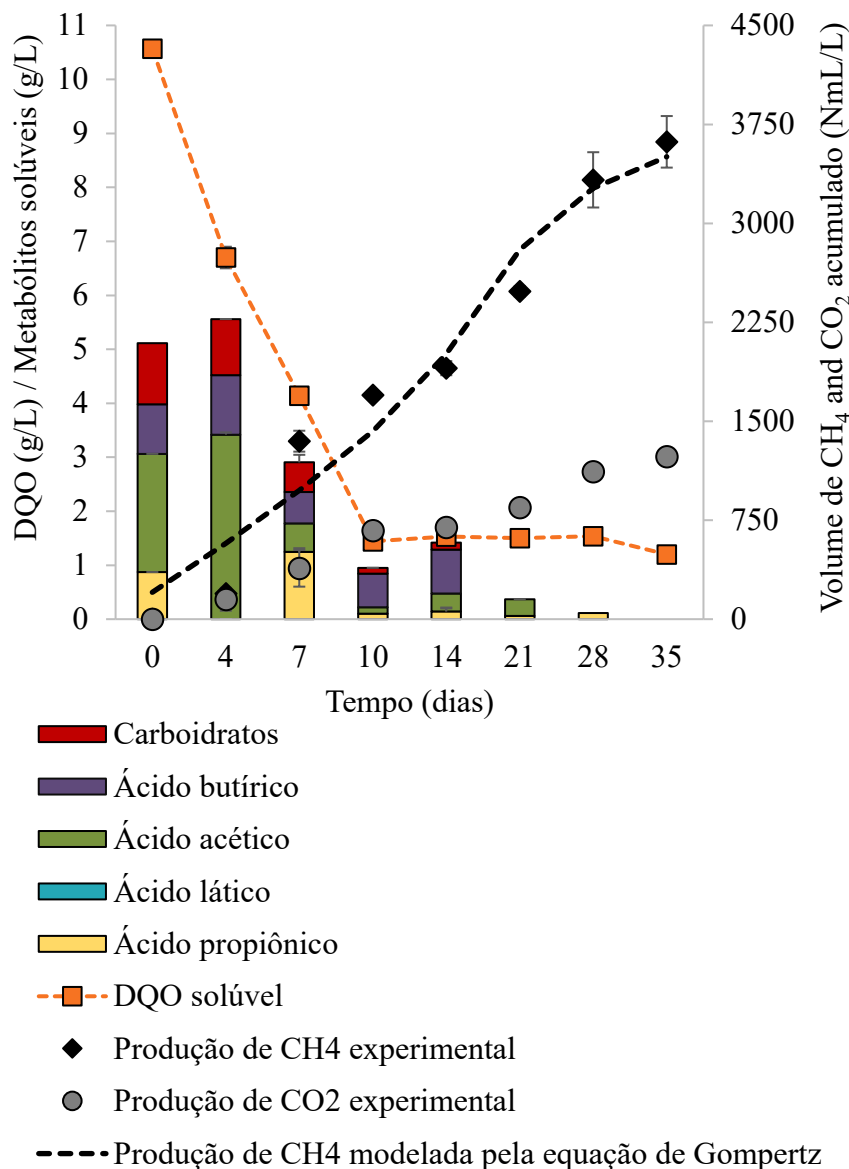
6.3 PRODUÇÃO DE METANO

A fase metanogênica da digestão anaeróbia em dois estágios foi conduzida utilizando três diferentes efluentes gerados a partir da produção de H_2 , sendo estes: o efluente obtido a partir da fermentação da vinhaça (EPH-VI1), da fermentação do hidrolisado (EPH-HH10) e da cofermentação de vinhaça com HH (EPH-VH1). Para fins comparativos, também foi realizada a digestão anaeróbia direta (em um único estágio) da vinhaça, nas concentrações de 15 g_{DQOt}/L e 25 g_{DQOt}/L , e do hidrolisado contendo 10 g/L de carboidratos.

6.3.1 Digestão anaeróbia da vinhaça

A baixa redução da DQO da fase acidogênica trouxe a recuperação de 90% da DQO inicial da fermentação da vinhaça no efluente da batelada (EPH-VI1). A Figura 24 apresenta a composição desse efluente gerado após a fermentação da vinhaça, denominado EPH-VI1, reutilizado na segunda etapa para a produção de metano, além de mostrar a produção volumétrica de CH_4 e CO_2 , experimental e com base na equação de Gompertz, os metabólitos consumidos e produzidos, e a redução da DQO durante o processo.

Figura 24 - Produção de metano usando o efluente da fermentação da vinhaça (EPH-VII) usando reator manométrico, DQO experimental de 10,57 g/L; 35 °C; pH 7. A pressão foi medida durante o período incubação. A concentração do substrato e dos metabólitos é apresentada em barras, enquanto a produção experimental de CH₄ e CO₂, em volume específico, é representada por marcadores, bem como a DQO do sistema. Parâmetros estimados pela modelagem dos dados experimentais de produção de CH₄ pela equação de Gompertz: 3722,71 NmL/L (Hmáx); 151,58 mL/L.h (Rm); 1 d (λ); 0,89 (R²).



Compostos residuais e subprodutos da acidogênese foram recuperados no EPH-VII e as principais fontes de carbono para metanogênese foram os carboidratos, os ácidos láctico, acético e propiônico (Figura 24). A maior produção de CH₄ utilizando o EPH do VII, foi de $3617,79 \pm 195,45$ NmL_{CH₄}/L, com produtividade de 103 NmL/L.d e 89% de redução de DQO após 35 dias de digestão. No entanto, a produção obtida em 28 dias foi estatisticamente equivalente à de 35 dias ($p > 0,05$). Assim, a interrupção do processo em 28 dias resultaria em um volume específico acumulado de $3329,71 \pm 209,49$ NmL_{CH₄}/L,

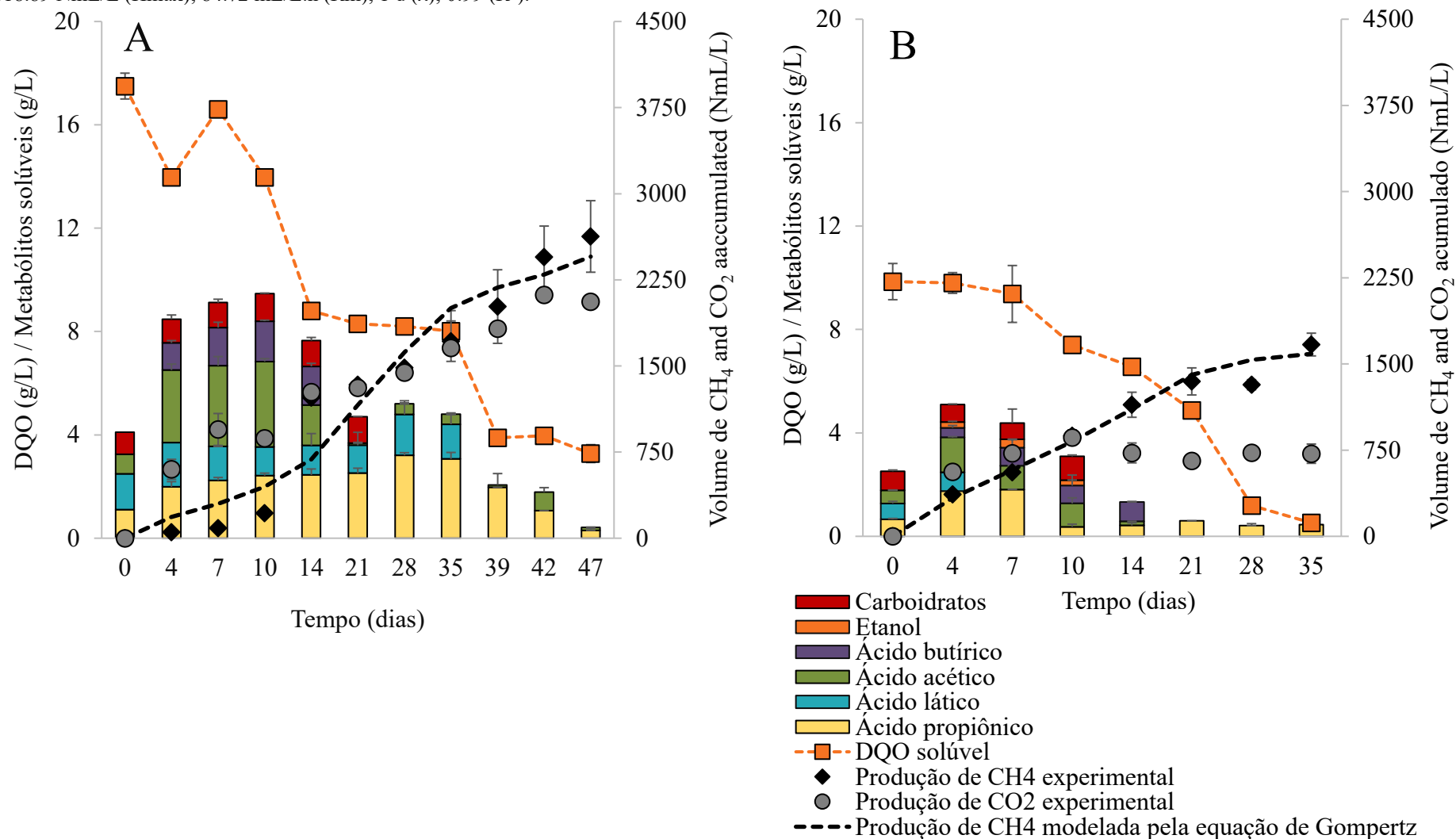
com rendimento de $294,39 \pm 0,84 \text{ NmL}_{\text{CH}_4}/\text{g}_{\text{DQO}}$, produtividade de $119 \text{ NmL}/\text{L.dia}$ e 85% de redução de DQO, representando um ganho em produtividade sem perda significativa na produção de CH_4 .

Nos primeiros quatro dias de digestão, o ácido propiônico proveniente do EPH-VII foi convertido em ácido acético e, posteriormente, em CH_4 e CO_2 , por meio da metanogênese acetoclástica (Rajendran *et al.*, 2020). No sétimo dia, aproximadamente 85% do ácido acético de EPH-VII havia sido consumido, juntamente com a produção de $659,63 \pm 37,51 \text{ NmL}_{\text{CH}_4}/\text{L}$. A fase exponencial de produção de CH_4 estendeu-se por 21 dias e, ao final do processo, a concentração de CH_4 no biogás atingiu 58%, enquanto o pH do sistema se manteve próximo da neutralidade (7,25).

Resultados comparativos foram obtidos por Sillero *et al.* (2023) em uma digestão sequencial utilizando EPH da fermentação a 70°C da vinhaça que atingiu a produção de $3837 \text{ mL}_{\text{CH}_4}/\text{L}$. No entanto, a produção de H_2 na primeira etapa foi de apenas $83 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{L}$. A estratégia de utilizar condições extremofílicas visava maximizar a produção de ácidos para a etapa subsequente, a produção de CH_4 . Embora a produção de CH_4 de Sillero *et al.* (2023) tenha sido semelhante à observada neste ensaio, o presente estudo mostra que quase três vezes mais H_2 ($285,86 \text{ NmL}/\text{L}$) foi obtido na primeira etapa (Figura 19) sob condições de temperatura menos extrema, a 50°C .

A digestão anaeróbia em um estágio, utilizando $25 \text{ g}_{\text{DQO}}/\text{L}$ de vinhaça *in natura*, atingiu a maior produção de CH_4 em 47 dias, com $2627,94 \pm 311,53 \text{ NmL}_{\text{CH}_4}/\text{L}$ (Figura 25A) e 81% de redução de DQO. Houve uma fase adaptativa mais prolongada nesse sistema em comparação ao processo em dois estágios (10 dias – Figura 24), atribuída à elevada DQO. Um ensaio comparativo com DQO experimental equivalente ao do sistema de dois estágios é apresentado na Figura 25B. A maior produção de CH_4 foi alcançada em 35 dias, com $1803 \pm 98,94 \text{ NmL}/\text{L}$ e 87% de redução da DQO.

Figura 25 - Produção de metano usando a vinhaça *in natura* (V11), DQO total de 25 g/L e DQO experimental de 17,5 (A); DQO total 15 g/L e DQO experimental de 9,85 (B); 35 °C; pH 7 em reatores manométricos com liberação de gás. A pressão foi medida durante o período incubação. A concentração do substrato e dos metabólitos é apresentada em barras, enquanto a produção experimental de CH₄ e CO₂, em volume específico, é representada por marcadores, bem como a DQO do sistema. Parâmetros estimados pela modelagem dos dados experimentais de produção de CH₄ pela equação de Gompertz: (A) 2914.45 NmL/L (Hmax); 69.05 mL/L.h (Rm); 4 d (λ); 0.83 (R²); (B) 1618.89 NmL/L (Hmax); 84.72 mL/L.h (Rm); 1 d (λ); 0.99 (R²).



A produção sequencial foi 38% maior que a produção direta com DQOt de 25 g/L e 100% maior que a concentração de DQOt de 15 g/L. A alta concentração de ácido acético no EPH-VII (2,19 g/L) foi um fator importante para a maior produção de CH₄ comparada com a digestão direta, visto que é o substrato direto das acetoclásticas (Mignogna *et al.*, 2023).

A presença de substratos recalcitrantes, fenóis e o sulfato, característicos da composição da vinhaça *in natura* (não quantificados), diminuem a eficiência da digestão direta (Borges *et al.*, 2021). Em condições típicas da metanogênese (pH 7 e 35 °C), o sulfato pode ser reduzido a sulfeto por bactérias redutoras de sulfato (BRS) que utilizam H₂ produzido na acidogênese como doador de elétrons, proporcionando competição das bactérias com as arqueias metanogênicas (Gil-Garcia *et al.*, 2018; Rogeri *et al.*, 2023). Esses fatores demandam um período maior para a adaptação da microbiota e a efetiva metabolização dos compostos complexos presentes no meio para geração de CH₄. Por outro lado, a atividade fermentativa realizada por bactérias acidogênicas, não é significativamente afetada pela presença de sulfeto, mostrando maior tolerância em comparação com arqueias metanogênicas e as próprias BRS (Gil-Garcia *et al.*, 2018). Deste modo, a redução simultânea de parte H₂ gerado na acidogênese e do SO₄²⁻ da matéria-prima, apesar de haver perda na eficiência de produção de H₂ na fermentação, mostra que separar a etapa hidrolítica-acidogênica (fermentação) da etapa metanogênica é uma estratégia de diminuir a complexidade e toxicidade da vinhaça, aumentando a eficiência global do processo de digestão anaeróbia, podendo ser considerada um pré-tratamento para a metanogênese.

A digestão em dois estágios proporciona que a primeira etapa seja usada como detoxificação do meio, o que facilita a geração de compostos menos complexos para o estágio de metanogênese subsequente. Além disso, a produção sequencial resulta em maior produção de gás e com maior teor de CH₄ – 58% comparado a 40% de ambos os sistemas de digestão direta. Deste modo, o potencial energético global do processo sequencial (2,7 kcal/g_{DQO}) é duas vezes maior comparado ao processo direto (1,2 kcal/g_{DQO}).

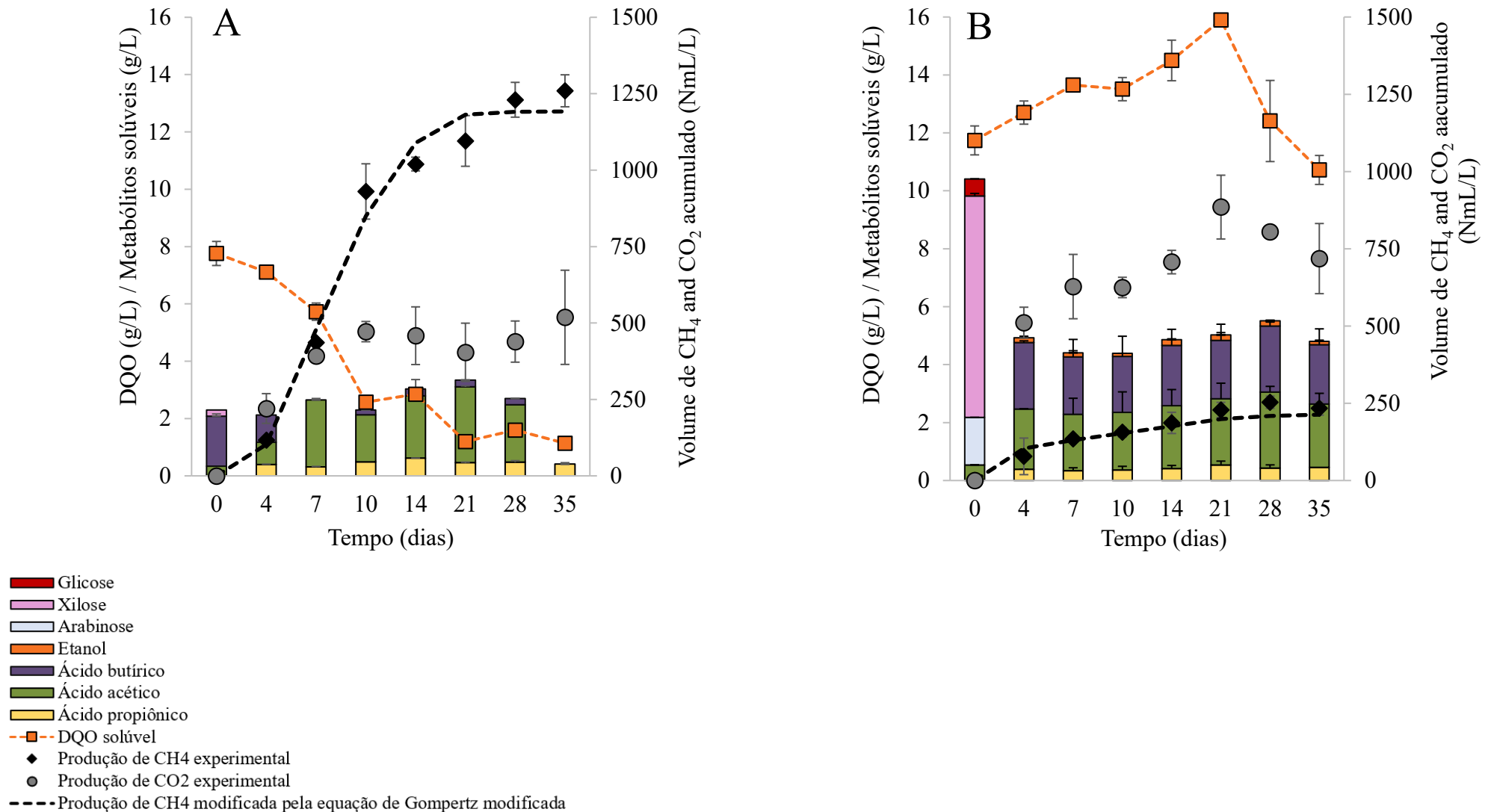
6.3.2 Digestão anaeróbia do hidrolisado hemicelulósico

A redução da DQO durante a acidogênese é de aproximadamente 10–20%, devido ao crescimento celular e geração de polímeros extracelulares. O EPH-HH10, composto por esses bioproductos como ácidos acético e butírico, etanol e açúcar residual (xilose) foi reutilizado na segunda etapa para a produção de CH₄ (Figura 26A).

Durante a metanogênese, foram produzidos $1259,37 \pm 52,30$ NmL/L de CH₄ em 35 dias de digestão anaeróbia, com redução de 85% da DQO, conforme apresentado na Figura 26A. O volume acumulado de CH₄ em 35 dias foi equivalente ao produzido em 21 dias ($1095,55 \pm 82,89$ NmL_{CH₄}/L) ($p < 0,05$), com redução de 75% da DQO. Portanto, a produção de CH₄ poderia ser interrompida aos 21 dias, com uma produtividade de 52,17 NmL/L.d, representando um aumento de 66% em relação à produtividade do processo interrompido aos 35 dias (31,32 NmL/L.d).

A xilose residual da fermentação foi completamente consumida em 4 dias, enquanto o ácido butírico foi gradualmente degradado durante a digestão anaeróbia, ambos sendo convertidos em ácido acético e CH₄. Não foi detectado H₂, pois este foi rapidamente consumido por arqueias metanogênicas hidrogenotróficas para a produção de acetato e CH₄. Os principais metabólitos solúveis responsáveis pela produção de CH₄ foram os ácidos butírico e propiônico, que foram convertidos em ácido acético, substrato direto das arqueias metanogênicas acetoclásticas, e, conseqüentemente, em CH₄. Após 35 dias de digestão, restaram apenas 0,41 g/L de ácido propiônico, o que indica que, caso o processo fosse prolongado por mais 7 dias, esse ácido provavelmente seria convertido em ácido acético. No entanto, nesse ponto, mais de 80% da DQO já havia sido reduzida. O pH do processo manteve-se estável em torno de 7, sem variações significativas, o que favoreceu uma produção satisfatória de CH₄ pelas arqueias metanogênicas.

Figura 26 - Produção de metano usando o efluente da fermentação com hidrolisado (HH10) em DQO experimental 7,76 g/L em processo sequencial (A); produção de metano em um estágio com hidrolisado hemicelulósico com 10 g/L de carboidratos (HH10) e DQO experimental de 11,74 g/L (B); 35 °C; pH 7, em reatores manométricos com liberação de gás. A pressão foi medida durante o período incubação. A concentração dos substratos e dos metabólitos é apresentada em barras, enquanto a produção experimental de CH₄ e CO₂, em volume específico, é representada por marcadores, bem como a DQO do sistema. Parâmetros estimados pela modelagem dos dados experimentais de produção de H₂ pela equação de Gompertz: 1192,08 NmL/L (Hmax); 114,57 mL/L.d (Rm); 3 d (λ); 0,90 (R²). (B) DQO experimental de 11,74 gDQO/L; 35 °C; pH 7. Parâmetros estimados pela modelagem dos dados experimentais de produção de H₂ pela equação de Gompertz: 216,25 NmL/L (Hmax); 10,06 mL/L.d (Rm); 4 d (λ); 0,99 (R²).



A digestão anaeróbia em um estágio único alcançou a produção máxima de CH_4 de $253,40 \pm 19,72 \text{ NmL CH}_4/\text{L}$ ao longo de 28 dias de digestão (Figura 26B). A partir do 4º dia, não foi observado aumento significativo no volume acumulado de gás, devido ao rápido consumo de carboidratos e, conseqüentemente, ao acúmulo acelerado de ácidos como ácido acético, butírico e propiônico. Substratos facilmente fermentáveis, como açúcares monoméricos, podem tornar a acetogênese a etapa limitante do processo, visto que as reações de conversão dos ácidos gerados na acidogênese como o butírico e propiônico à ácido acético não são termodinamicamente favoráveis (Tabela 2). Além disso, as arqueias metanogênicas são altamente sensíveis a flutuações de pH (Cremonez *et al.*, 2021).

Neste estudo, foram gerados aproximadamente três vezes mais ácidos ($5,82 \text{ g/L}$) em comparação ao processo em dois estágios ($1,78 \text{ g/L}$), e esses compostos causaram a redução do pH para 4,8, inibindo a atividade das arqueias metanogênicas. Concentrações mais elevadas de ácidos podem indicar condições de estresse para os microrganismos nos reatores, o que pode inibir as arqueias acetoclásticas em maior grau do que as hidrogenotróficas (Ribeiro *et al.*, 2017).

O HH foi obtido por meio de um pré-tratamento ácido com ácido sulfúrico, o que implica na presença de sulfato nesse material (não quantificado), e no pH 7 da digestão este composto encontra-se praticamente todo dissociado. Como discutido anteriormente, a etapa fermentativa pode ter atuado como uma etapa de “limpeza” do sistema, favorecendo um ambiente mais estável e resultando em maior produção de gás quando comparada ao processo direto. Este processo também tem um potencial energético global superior a digestão direta, $1,6 \text{ kcal/g}_{\text{DQO}}$, oito vezes maior que o processo direto ($0,2 \text{ kcal/g}_{\text{DQO}}$).

6.3.3 Digestão anaeróbia sequencial do efluente da fermentação com vinhaça e hidrolisado hemicelulósico

O ensaio selecionado para dar continuidade à produção sequencial de CH_4 a partir do efluente de cofermentação foi o VH1 (EPH-VH1). Embora não tenha apresentado a maior produção de gás e consumo de substratos (Figura 23 e Tabela 10), esse sistema foi escolhido por ter demonstrado respostas positivas no processo de cofermentação, tais como: relação C/N de 24, Razão VI:HH de 12,5:1, que apresentou aumento de 58% da produção de H_2 ($389,60 \text{ NmL}_{\text{H}_2}/\text{L}$) em relação à fermentação apenas com vinhaça ($245,86 \text{ NmL H}_2/\text{L}$), mantendo a mesma carga orgânica inicial e predominância da vinhaça, enquanto o hidrolisado

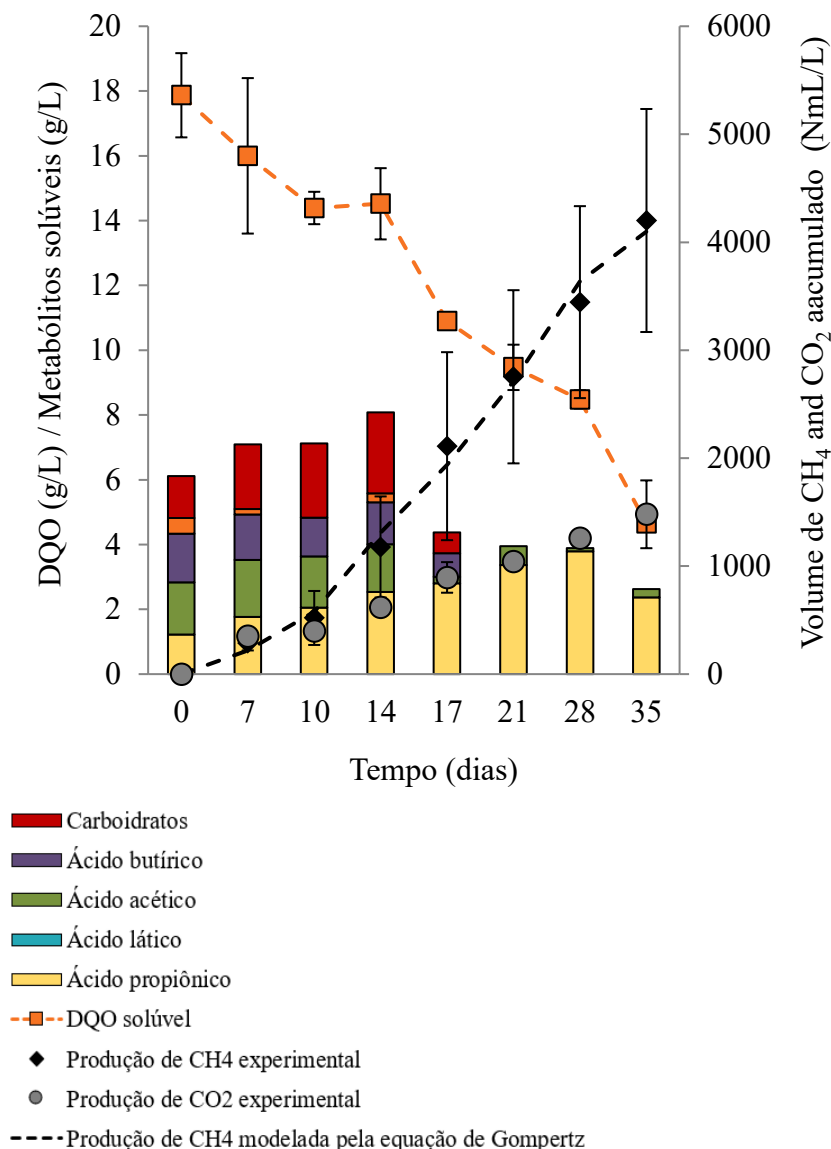
hemicelulósico foi adicionado em menor proporção apenas para favorecer sua biodegradabilidade (Tabela 10).

A digestão do EPH-VH1 alcançou uma produção de $4529,83 \pm 889$ NmL CH₄/L em 35 dias de digestão e 74% de redução da DQO, sendo o sistema com maior geração de CH₄ entre todas as condições avaliadas neste estudo (Figura 27). Conforme discutido, a digestão em duas etapas atua como um pré-tratamento para a etapa metanogênica, reduzindo inibições associadas ao enxofre presente em matérias-primas como HH e vinhaça (Adarme *et al.*, 2019; Elihimas *et al.*, 2025). Esse efeito foi comprovado neste estudo, visto que as abordagens sequenciais, fermentação e posterior digestão, superaram as obtidas em processos diretos.

Na comparação entre os sistemas, a digestão do EPH da mono-fermentação (EPH-VI1) resultou em $3617,79 \pm 195,45$ NmL/L de CH₄, enquanto a EPH-VH1 foi 25% superior, embora sem diferença estatística ($p > 0,05$). É importante destacar que a DQO inicial dos sistemas não foi equivalente, sendo 17,87 g/L para o EPH-VH1 e 10,57 g/L para o EPH-VI1. Assim, tempos mais longos de digestão do EPH-VH1 poderiam potencializar tanto a produção de CH₄ quanto a remoção de DQO. Contudo, para fins comparativos, o ensaio foi interrompido em 35 dias. Apesar disso, a concentração de CH₄ no biogás do EPH-VH1 foi de 65% comparado a 58% na digestão do EPH-VI1 em 35 dias, ou seja, um gás mais enriquecido em CH₄.

Ainda assim, a elevada produção de CH₄ no processo sequencial foi notável quando comparada à digestão apenas da vinhaça *in natura*, que, mesmo com DQO experimental semelhante (17,50 g/L - Figura 25A), atingiu apenas 1715,84 NmL/L e 54% em redução da DQO no mesmo período. Dessa forma, a produção no sistema EPH-VH1 foi aproximadamente 2,6 vezes superior à obtida com a vinhaça isolada.

Figura 27 - Produção de metano usando o efluente da fermentação com vinhaça e hidrolisado (EPH-VH1) em DQO experimental 17,87 g/L em processo sequencial; 35 °C; pH 7, em reatores manométricos com liberação de gás. A pressão foi medida durante o período de incubação. A concentração dos substratos e dos metabólitos é apresentada em barras, enquanto a produção experimental de CH₄ e CO₂, em volume específico, é representada por marcadores, bem como a DQO do sistema. Parâmetros estimados pela modelagem dos dados experimentais de produção de H₂ pela equação de Gompertz: 4447,18 NmL/L (Hmax); 210,58 mL/L.d (Rm); 7 d (λ); 0,99 (R²).



A Tabela 12 apresenta estudos reportados na literatura que comparam a produção de CH₄ por digestão direta, sequencial e de codigestão a partir de diferentes biomassas. No estudo de Adarme *et al.* (2019), foi utilizado extrato de levedura como fonte de nitrogênio, adotando-se baixas concentrações de hidrolisado hemicelulósico (HH ou VI:HH) em razão da presença de compostos inibidores, como HMF e furfural. Borges *et al.*, 2021 e Tibúrcio Neto *et al.*, 2024 trabalharam com sistemas de baixa DQO, estratégia que reduz sobrecargas orgânicas; contudo, meios com baixa recuperação de compostos orgânicos para a degradação podem não apresentar viabilidade econômica. Os estudos que apresentaram rendimento em sólidos voláteis totais

(VS) não foram convertidos para rendimento em DQO devido à ausência de dados suficientes para essa transformação. Vale ressaltar que, nos estudos desta tese, buscou-se trabalhar com meios concentrados, a fim de maximizar o aproveitamento dos resíduos e efluentes associando à produção de biogás, sem a adição de suplementos comerciais, de modo a reduzir os custos e tornar o processo mais próximo da realidade industrial.

A utilização conjunta da vinhaça e do hidrolisado é promissora, pois ambos são resíduos das usinas sucroenergéticas, e seu aproveitamento integrado pode viabilizar o abastecimento da demanda interna de energia deste setor por meio de uma planta de biogás. O potencial energético do EPH-VH1 foi de 2,2 kcal/DQO, e para fins comparativos, a Tabela 13 mostra os principais resultados desta tese quanto à redução da carga orgânica (%), volume acumulado (NmL/L), respectivo tempo (h ou d), produtividade (NmL/L·h ou NmL/L·d) e potencial energético (cal/g_{DQO}). A digestão sequencial em duas etapas, aumenta a eficiência global na geração de biogás em termos de produção de gás, potencial energético e redução de carga orgânica.

Tabela 12 - Estudos comparativos de digestão anaeróbica em um e dois estágios utilizando resíduos agroindustriais.

Digestão anaeróbica em um estágio				Digestão anaeróbica em dois estágios				
Biomassa	Inóculo	Concentração inicial da digestão anaeróbica	CH ₄	Concentração inicial da acidogênese	H ₂	Concentração inicial da metanogênese	CH ₄	Referências
Silagem de capim	Esterco	190 g _{DQO} /L 62 g _{DQO} /L	431 mL/g _{SV} 252 mL/g _{SV}	190 g _{DQO} /L 62 g _{DQO} /L	5.64 mL/g _{SV} 3,38 mL/g _{SV}	190 g _{DQO} /L 62 g _{DQO} /L	467 mL/g _{SV} 413 mL/g _{SV}	Pakarinen, Tahti e Rintala, 2009
Vinhaça	Lodo anaeróbico	35 g _{DQO} /L	260 mL/g _{DQO}	27 g _{DQO} /L	84 mL/g _{DQO}	27 g _{DQO} /L	330 mL/g _{DQO}	Nasr <i>et al.</i> , 2012
Vinhaça de tequila	Lodo anaeróbico	8,2 g _{SV} /L	365.4 mL/g _{SV}	8.2 g _{SV} /L	12 mL/g _{SV}	8,2 g _{SV} /L	252,3 mL/g _{SV}	Toro <i>et al.</i> , 2021
Vinhaça	Esterco animal	-	507 mL/g _{SV}					
Vinhaça e Torta de filtro	Esterco animal	-	614 mL/g _{SV}					
Vinhaça e Liquor desacetilado	Esterco animal	-	917 mL/g _{SV}					(Volpi <i>et al.</i> , 2021)
Vinhaça + torta de filtro + liquor desacetilado	Esterco animal	-	605 mL/g _{SV}					
Vinhaça e melaço	Lodo anaeróbico	6 g _{DQO} /L	298 mL/g _{SV}					Tibúrcio Neto <i>et al.</i> , 2024
Vinhaça e glicerol	Esterco de aves	5 g _{DQO} /L	352 mL/g _{DQO}					Borges <i>et al.</i> , 2021
Vinhaça + HH + extrato de levedura + cinzas	Esterco + Lodo anaeróbico	-	279 mL/g _{DQO} r					Adarme <i>et al.</i> , 2019
Vinhaça 1G + vinhaça 2G + HH	Lodo anaeróbico	-	562 mL/g _{SV}					Freitas <i>et al.</i> , 2023

Vinhaça + extrato de levedura + cinzas	Lodo anaeróbio	-	243 mL/gsv					Nualsri <i>et al.</i> , 2024
Palha de arroz	Lodo anaeróbio	-	-	-	20 mL/g _{DQO}	-	170 mL/g _{DQO}	Cheng, Li e Liu, 2012
Talo de milho	Lodo anaeróbio	-	-	10 g _{SV} /L	13,4 mL/g _{SV}	10 g _{SV} /L	172,6 mL/g _{SV}	Liu <i>et al.</i> , 2013
Soro de leite	Esterco de vaca	-	-	89 g _{SV} /L	19.5 mL/g _{SV}	89 g _{SV} /L	627,6 mL/g _{SV}	Lateef e Beneragama, 2013
Efluente de amido de mandioca	Lodo anaeróbio	-	-	34.5 g _{DQO} /L	81,5 mL/g _{DQO}	9,5 g _{DQO} /L	310,5 mL/g _{DQO}	Khongkliang, Kongjan e O-Thong, 2015
Bagaço de cana-de-açúcar	Esterco de vaca	-	-	9,8 g _{SV} /L	93,4 mL/g _{SV}	5,8 mg _{SV} /L	221,8 mL/g _{SV}	Varanasi, Kumari e Das, 2018
Xarope de cana-de-açúcar	Lodo anaeróbio	-	-	25 g _{DQO} /L	91,7 mL/g _{DQO}	25 g _{DQO} /L	298,3 mL/g _{DQO}	
Xarope de cana-de-açúcar	<i>C. butyricum</i> <i>TISTR1032</i> (Células imobilizadas)	-	-	25 g _{DQO} /L	174 mL/g _{DQO}	25 g _{DQO} /L	273 mL/g _{DQO}	Nualsri, Reungsang e Plangklang, 2016
Xarope de cana-de-açúcar	Lodo anaeróbio	-	-	30 g _{DQO} /L	8,24 mL/g _{DQO}	22 g _{DQO} /L	345 mL/g _{DQO}	
Bagaço de cana-de-açúcar	Lodo anaeróbio + esterco	-	-		170 mL / g _{DQO}		246,44 mL/g _{DQO}	Cheng <i>et al.</i> , 2016
Bagaço de cana-de-açúcar	Lodo anaeróbio	-	-	1,63 g _{SV} /L	68.26 mL/g _{SV}	1,63 g _{SV} /L	304.39 mL/g _{SV}	Adarme <i>et al.</i> , 2017
Bagaço de cana-de-açúcar	Lodo anaeróbio	-	-	10 g _{SV} /L	41.8 mL/g _{SV}	8,3 g _{SV} /L	147 mL/g _{SV}	Deng <i>et al.</i> , 2019
Palha de cana-de-açúcar	Lodo anaeróbio	-	-	39 g _{SV} /L	42.1 mL/g _{SV}	39 g _{SV} /L	334 ml/g _{SV}	Ruiz-Aguila <i>et al.</i> , 2022-

Palha de cana-de-açúcar	Lodo anaeróbio	-	-	2.2 g _{DQO} /L	126 NmL/g _{DQO}	2,2 g _{DQO} /L	107 mL/g _{DQO}	Qelish <i>et al.</i> , 2022
Vinhaça de tequila	Lodo anaeróbio	-	-	2 g _{SV} /L	26.7 mL/g _{SV}	2 g _{SV} /L	71,7 mL/g _{SV}	Serrano-Meza <i>et al.</i> , 2022
Palha (HH)	Lodo anaeróbio	11,74 g_{DQO}/L	14,39 NmL/g_{DQO}	12,76 g_{DQO}/L	83,91 NmL/g_{DQO}	7,76 g_{DQO}/L	162,32 NmL/g_{DQO}	Este estudo
Vinhaça	Lodo anaeróbio	17,50 g_{DQO}/L	98,05 NmL/g_{DQO}	16,40 g_{DQO}/L	14,99 NmL/g_{DQO}	10,57 g_{DQO}/L	342,27 NmL/g_{DQO}	Este estudo
Vinhaça + HH	Lodo anaeróbio	-	-	18,78 g_{DQO}/L	20,75 NmL/g_{DQO}	17,87 g_{DQO}/L	253,49 NmL/g_{DQO}	Este estudo

Tabela 13. Comparação dos principais parâmetros avaliados neste estudo para a produção de hidrogênio e metano a partir de vinhaça, hidrolisado hemicelulósico de palha e da cofermentação de ambos. São apresentados a redução da carga orgânica (%), o volume acumulado (NmL/L), o respectivo tempo (h ou d), a produtividade (NmL/L·h ou NmL/L·d) e o potencial energético (cal/g_{DQO}).

	Sistema	DQOs			Tempo	P (mL/L)			Redução da DQO (%)	Qp	Potencial energético (cal/g _{DQO})
	VII	16,40	±	0,30	48 horas	245,86	±	8,54	-	5	39
H ₂	HH10	12,76	±	0,15	24 horas	1107,97	±	74,83	-	46 (mL/L.h)	213
	VH1	18,78	±	0,20	48 horas	389,6	±	60,61	-	8	54
	DA EPH VII	10,57	±	0,02	28 dias	3329,71	±	209,47	85	119	2695
	DA EPH HH10	7,76	±	0,42	21 dias	1095,55	±	82,89	75	52	1389
CH ₄	DA EPH VH1	17,87	±	1,3	35 dias	4529,83	±	889	74	96 (mL/L.d)	2222
	DA VII	17,50	±	0,50	47 dias	2627,94	±	311,53	81	51	1172
	DA HH10	11,74	±	0,50	28 dias	253,397	±	19,72	-	9	185

7 CONCLUSÕES

Com o objetivo de produzir hidrogênio e metano a partir da vinhaça e do hidrolisado hemicelulósico da palha de cana-de-açúcar, esta tese evidenciou a complexidade dos bioprocessos envolvidos em sistemas biológicos a partir de resíduos e efluentes da agroindústria. Foram empregadas estratégias como a mudança de reatores e a adoção de processos integrados, incluindo cofermentação e digestão anaeróbia em dois estágios, visando melhorar o desempenho e aprofundar o conhecimento científico sobre o processo. Os resultados obtidos levam às seguintes conclusões:

- Foi possível produzir H_2 a partir da vinhaça, e as estratégias adotadas (aumento da concentração inicial, controle da pressão parcial do sistema e cofermentação com hidrolisado hemicelulósico) contribuíram para aumentar o rendimento do processo. A melhor condição foi em termofilia ($50\text{ }^{\circ}\text{C}$) e pH inicial de 5,5 com o uso de reator manométrico com válvula de alívio de pressão interna que apresentou aumento na produção de H_2 de aproximadamente 30% (245,86 NmL/L e 0,47 bar de pressão interna) em comparação ao modo batelada com reator selado (189,24 NmL/L e 0,82 bar de pressão).
- O hidrolisado hemicelulósico é uma matéria-prima de fácil assimilação pelos microrganismos por ter monossacarídeos em sua composição, e em processos termofílicos mostrou a interrupção da produção por efeitos da pressão parcial e desvio de rota para a homoacetogênese. A liberação contínua do gás, evitando que a pressão parcial excedesse 0,6 bar mostrou aumento de 82% na produção de H_2 em sistema de 10 g/L (1107,97 NmL/L e 0,50 bar de pressão interna) comparado ao sistema sem alívio (608,70 NmL/L e 1,60 bar);
- A cofermentação mostrou que os carboidratos do hidrolisado hemicelulósico auxiliaram os microrganismos a se adaptarem ao meio complexo com vinhaça, proporcionando um aumento de 58% na produção de H_2 (389,60 NmL/L) comparado à mono-fermentação com vinhaça (245,86 NmL/L). Neste conjunto de ensaios houve consumo total de substrato, fato que não foi observado nos sistemas apenas com vinhaça. A relação carbono nitrogênio ideal neste processo foi de 24;

- A digestão anaeróbia em dois estágios da vinhaça demonstrou maior eficiência na geração de CH_4 em comparação à digestão em um estágio. O processo sequencial atua como uma etapa de pré-tratamento da matéria-prima, em que compostos mais complexos são degradados durante a fase fermentativa, reduzindo a toxicidade da vinhaça por meio da ação de bactérias hidrolíticas e acidogênicas. Como resultado, a etapa subsequente de metanogênese é favorecida, proporcionando maior produção de CH_4 e biogás com maior concentração de metano;
- A digestão anaeróbia em um estágio do hidrolisado hemicelulósico apresentou limitações devido à elevada concentração inicial de carboidratos. A rápida geração de ácidos orgânicos provocou uma queda acentuada no pH do meio, criando um ambiente desfavorável para a atividade das arqueias metanogênicas. Esse desbalanço metabólico comprometeu a eficiência do processo e limitou a produção de CH_4 ; a produção de metano no processo sequencial foi cinco vezes superior ao processo direto.
- A codigestão do efluente da fermentação com vinhaça com o hidrolisado hemicelulósico (EPH-VHI) apresentou desempenho superior em termos de produção (4530 NmL/L) e concentração de CH_4 (65%) no biogás comparado à digestão sequencial apenas com vinhaça (3330 NmL/L e 58% de CH_4) e hidrolisado hemicelulósico (1096 NmL/L e 36% de CH_4). Essa estratégia promoveu a geração de um biogás mais enriquecido em CH_4 comparada a todas as demais condições avaliadas neste estudo.

8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Identificar as espécies microbianas presentes no lodo anaeróbio em diferentes etapas do processo, tais como: antes e depois do pré-tratamento, antes e depois da produção de H_2 e antes e depois da produção de metano;
- Identificar compostos polimerizados e com potencial citotóxico presentes na vinhaça por meio de técnicas como espectrometria de massas;
- Avaliar a co-digestão da vinhaça com hidrolisado hemicelulósico para a produção direta e sequencial de CH_4 ;
- Avaliar o processo contínuo dos processos estudados nesta tese;
- Aumentar a escala dos processos otimizados.

REFERÊNCIAS

- ABDUL, P. M. *et al.* Biohydrogen production from pentose-rich oil palm empty fruit bunch molasses: A first trial. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 35, p. 15693–15699, 22 nov. 2013.
- ABENDROTH, C. *et al.* Microbial communities involved in biogas production exhibit high resilience to heat shocks. **Bioresource Technology**, v. 249, n. October 2017, p. 1074–1079, 2018.
- ABH2, A. B. DO H. Mapping Study for the Brazilian Hydrogen RD&I Sector. **Report**, 2024.
- ACHARYA, B. K.; MOHANA, S.; MADAMWAR, D. Anaerobic treatment of distillery spent wash - A study on upflow anaerobic fixed film bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4621–4626, jul. 2008.
- ÁCS, N. *et al.* Microbial Community Rearrangements in Power-to-Biomethane Reactors Employing Mesophilic Biogas Digestate. **Energy Research**, v. 7, n. November, p. 1–15, 2019.
- ADARME, O. F. H. *et al.* Methane and hydrogen production from anaerobic digestion of soluble fraction obtained by sugarcane bagasse ozonation. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p. 288–299, 15 dez. 2017.
- ADARME, O. F. H. *et al.* Use of anaerobic co-digestion as an alternative to add value to sugarcane biorefinery wastes. **Bioresource Technology**, v. 287, n. March, p. 121443, 2019.
- AGUIAR, A. *et al.* Sugarcane straw as a potential second generation feedstock for biorefinery and white biotechnology applications. **Biomass and Bioenergy**, v. 144, n. October 2020, p. 105896, 2021.
- AGUIAR, M. M. *et al.* Vinasse bio-valorization for enhancement of *Pleurotus* biomass productivity: chemical characterization and carbohydrate analysis. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, n. 11, p. 10031–10040, 1 jul. 2023.
- AHMAD, A. *et al.* Biohydrogen production through dark fermentation: Recent trends and advances in transition to a circular bioeconomy. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 52, p. 335–357, 2024.
- ALMEIDA, M. A. DE; COLOMBO, R. Production Chain of First-Generation Sugarcane Bioethanol: Characterization and Value-Added Application of Wastes. **Bioenergy Research**, v. 16, n. 0123456789, p. 924–939, 2021.
- ALMEIDA, P. DE S. *et al.* Producing hydrogen from the fermentation of cheese whey and glycerol as cosubstrates in an anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 47, n. 31, p. 14243–14256, 2022.
- ALVARADO-CUEVAS, Z. D. *et al.* Biohydrogen production using psychrophilic bacteria isolated from Antarctica. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, p. 1–7, 2014.

ALVAREZ-GUZMÁN, C. L. *et al.* Biohydrogen production by the psychrophilic G088 strain using single carbohydrates as substrate. p. 1–9, 2016.

ANANTHI, V. *et al.* A review on the impact of various factors on biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 52, p. 33–45, 2 jan. 2024.

ANP, Agência Nacional Do Petróleo, Gás Natural E Biocombustíveis. Resolução ANP nº 886, de 29 de setembro de 2022. Diário Oficial da União. Disponível em: <https://atosoficiais.com.br/anp/resolucao-n-886-2022-estabelece-a-especificacao-e-as-regras-para-aprovacao-do-controle-da-qualidade-do-biometano-oriundo-de-aterros-sanitarios-e-de-estacoes-de-tratamento-de-esgoto-destinado-ao-uso-veicular-e-as-instalacoes-residenciais-industriais-e-comerciais-a-ser-comercializado-no-territorio-nacional?origin=instituica>. Acessado em 07/02/2025.

APHA, A. P. H. A. Standard methods for the examination of water and wastewater. **American Public Health Association**, v. 23, p. 1689–1699, 2017.

APPELS, L. *et al.* Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, n. 6, p. 755–781, 2008.

ARGUN, H. *et al.* Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution : Effects of C / N and C / P ratio on hydrogen yield and formation rate. v. 33, p. 1813–1819, 2008.

ASSIS, N. M.; FERREIRA-LEITÃO, V. S.; SILVA, A. S. A. DA. Prospective comparison between mannan-oligosaccharide (MOS) and other hemicellulose-derived oligosaccharides. **Process Biochemistry**, v. 150, n. October 2024, p. 33–48, 2025.

AUGUSTO, I. M. G. *et al.* H₂ production via dark fermentation of soybean molasses: Elucidating the role of homoacetogenesis and endogenous substrate microorganisms by kinetic and microbial analysis. **Energy**, v. 298, p. 131301, 1 jul. 2024.

AUTOINDUSTRIA, Redação. Caminhões da Cocal ganham motores MWM a biometano. **Site Autoindústria**. Maio, 2024. Acessível em: <https://www.autoindustria.com.br/2024/05/29/caminhoes-da-cocal-ganham-motores-mwm-a-biometano/>. Acessado em: 11/02/2025.

AYODELE, D. T. *et al.* Factors affecting biohydrogen production: Overview and perspectives. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 48, n. 71, p. 27513–27539, 19 ago. 2023.

BAKSI, S. *et al.* Pre-treatment of lignocellulosic biomass: review of various physico-chemical and biological methods influencing the extent of biomass depolymerization. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 20, n. 0123456789, p. 13895–13922, 2023.

BARRERA-QUINTERO, V. *et al.* Gompertz Equation's First and Second Derivatives for Kinetics Analysis of Batch Dark Fermentation on Bio-Hydrogen Production. **European Journal of Engineering Research and Science**, v. 2, n. 11, p. 18, 2017.

BARROS, J. A. S. *et al.* Recovery of waste biomass: pyrolysis and characterization of

sugarcane residues and their bio-oils. **Biofuels**, v. 13, n. 7, p. 843–852, 2022.

BARROS, L. B. M. *et al.* Investigation of electrodialysis configurations for vinasse desalting and potassium recovery. **Separation and Purification Technology**, v. 229, p. 115797, 15 dez. 2019.

BASAK, B. *et al.* Dark fermentative hydrogen production from pretreated lignocellulosic biomass: Effects of inhibitory byproducts and recent trends in mitigation strategies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 133, n. December 2019, 2020.

BAYU, A. I. *et al.* Kinetic study of thermophilic anaerobic digestion of sugarcane vinasse in a single-stage continuous stirred tank reactor. **Results in Engineering**, v. 14, p. 100432, 1 jun. 2022.

BERNARDES, A. N. *et al.* Organic acids and alcohols quantification by HPLC / RID in sugarcane vinasse : analytical method validation and matrix effect assessment. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 101, n. 00, p. 1–12, 2019.

BETTIGA, M. *et al.* Arabinose and xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing a fungal pentose utilization pathway. **Microbial Biotechnology**, v. 12, p. 1–12, 2009.

BHARDWAJ, N.; KUMAR, B.; VERMA, P. A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 6, n. 1, 2019.

BIDART, G. N.; GHARABLI, H.; WELNER, D. H. Functional characterization of the phosphotransferase system in *Parageobacillus thermoglucosidasius*. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2023.

BIZZO, W. A. *et al.* The generation of residual biomass during the production of bio-ethanol from sugarcane, its characterization and its use in energy production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 29, p. 589–603, 2014.

BORGES, A. DO V. *et al.* Co-digesting sugarcane vinasse and distilled glycerol to enhance bioenergy generation in biofuel-producing plants. **Energy Conversion and Management**, v. 250, 15 dez. 2021.

BOURAMTANE, S. *et al.* Porphyrin-xylan-coated silica nanoparticles for anticancer photodynamic therapy. **Carbohydrate Polymers**, v. 213, n. February, p. 168–175, 2019.

BRANSKA, B. *et al.* Changes in efflux pump activity of *Clostridium beijerinckii* throughout ABE fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 2, p. 877–889, 2021.

BRAT, D.; BOLES, E. Isobutanol production from d-xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 13, n. 2, p. 241–244, 2013.

BU, J. *et al.* Biochar boosts dark fermentative H₂ production from sugarcane bagasse by selective enrichment/colonization of functional bacteria and enhancing extracellular electron transfer. **Water Research**, v. 202, 1 set. 2021.

BUSSE-WICHER, M. *et al.* The pattern of xylan acetylation suggests xylan may interact with cellulose microfibrils as a twofold helical screw in the secondary plant cell wall of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v. 79, n. 3, p. 492–506, 2014.

CAMARGO, J. M. O. *et al.* Characterization of sugarcane straw and bagasse from dry cleaning system of sugarcane for cogeneration system. **Renewable Energy**, v. 158, p. 500–508, 2020.

CANTO-ROBERTOS, M. *et al.* Inhibition of hydrogen production by endogenous microorganisms from food waste. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 40, n. 1, p. 137–150, 2023.

CAO, Y. *et al.* Debottlenecking the biological hydrogen production pathway of dark fermentation: insight into the impact of strain improvement. **Microbial Cell Factories**, v. 21, n. 1, p. 1–16, 2022.

CAROSIA, M. F. *et al.* Influence of C/P and C/N ratios and microbial characterization in hydrogen and ethanol production in an anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 15, p. 9600–9610, 2017.

CARRILLO-BARRAGAN, P. *et al.* Enrichment and Characterisation of a Mixed-Source Ethanologenic Community Degrading the Organic Fraction of Municipal Solid Waste Under Minimal Environmental Control. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. April, p. 1–18, 2019.

CARVALHO, D. M. DE *et al.* Isolation and characterization of acetylated glucuronoarabinoxylan from sugarcane bagasse and straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 156, p. 223–234, 20 jan. 2017.

CARVALHO, J. L. N. *et al.* Agronomic and environmental implications of sugarcane straw removal: a major review. **GCB Bioenergy**, v. 9, n. 7, p. 1181–1195, 2017.

CARVALHO, T. C. DE. Redução do volume de vinhaça através do processo de evaporação. **Dissertação de mestrado**, 2010.

CASTELLANOS-SÁNCHEZ, J. E. *et al.* **Biogas purification processes: review and prospects** Biofuels Taylor and Francis Ltd., , 2024.

CASTELLÓ, E. *et al.* Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: Possible causes and solutions. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 119, n. November, 2020.

CASTRO, S. G. Q. DE *et al.* Changes in Soil Pest Populations Caused by Sugarcane Straw Removal in Brazil. **BioEnergy Research**, 2019.

CAZIER, E. A. *et al.* Biomass hydrolysis inhibition at high hydrogen partial pressure in solid-state anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 190, p. 106–113, 2015.

CECCATO-ANTONINI, S. R. Conventional and nonconventional strategies for controlling bacterial contamination in fuel ethanol fermentations. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 6, p. 0, 2018.

CETESB. Norma P4.231: Stillage - Criteria and procedures for agricultural soil application. **Companhia Ambiental do Estado de São Paulo**, v. 3, n. 11, p. 1–15, 2015.

CHEN, H. *et al.* Effects of temperature and total solid content on biohydrogen production from dark fermentation of rice straw: Performance and microbial community characteristics. **Chemosphere**, v. 286, n. June 2021, 2022.

CHEN, Y.; YIN, Y.; WANG, J. **Recent advance in inhibition of dark fermentative hydrogen production** *International Journal of Hydrogen Energy* Elsevier Ltd, , 27 jan. 2021.

CHENG, H. H. *et al.* Biological hydrogen and methane production from bagasse bioethanol fermentation residues using a two-stage bioprocess. **Bioresource Technology**, v. 210, p. 49–55, 2016.

CHENG, X.; LI, Q.; LIU, C. Coproduction of hydrogen and methane via anaerobic fermentation of cornstalk waste in continuous stirred tank reactor integrated with up-flow anaerobic sludge bed. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 327–333, 2012.

CHEZEAU, B.; VIAL, C. Combined effects of digestate viscosity and agitation conditions on the fermentative biohydrogen production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 142, n. November 2018, p. 105–116, 2019.

CHI, X. *et al.* Features of a Staged Acidogenic/Solventogenic Fermentation Process to Improve Butanol Production from Rice Straw. **Energy and Fuels**, v. 33, n. 2, p. 1123–1132, 2019.

CIBIOGÁS. CIBIOGAS: Panorama do Biogás no Brasil em 2023. p. 1–21, 2024.

CIECIURA-WŁOCH, W.; BOROWSKI, S.; OTLEWSKA, A. Biohydrogen production from fruit and vegetable waste, sugar beet pulp and corn silage via dark fermentation. **Renewable Energy**, v. 153, p. 1226–1237, 2020.

CNPEN. Obstáculos no caminho. **Pesquisa Fapesp**, v. 268, n. Acessado em: 18/02/2025, p. 58–63, 2018.

COMPARATO, C. N. *et al.* Melanoidin Content Determines the Primary Pathways in Glucose Dark Fermentation: A Preliminary Assessment of Kinetic and Microbial Aspects. **Fermentation**, v. 10, n. 6, p. 272, 1 jun. 2024.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira. Cana-de-açúcar. **Companhia Nacional de Abastecimento**, v. 4, n. n.4, p. 73, 2018.

CONAB, C. N. DE A. Acompanhamento da Safra Brasileira - Cana-de-açúcar. **Boletim da Safra 2025**, v. 9, n. Terceiro levantamento, p. 60, 2025.

CORAZZA, R. I. Políticas públicas para tecnologias mais limpas: uma análise das contribuições da economia do meio ambiente. **Tese de doutorado**, p. 200, 2001.

CORAZZA, R. IC. Impactos ambientais da vinhaça: controvérsias científicas e lock-in na fertirrigação. **Congresso da Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural**, p. 1–26, 2006.

COSTA, J. R. *et al.* Sugarcane Straw as a Source of Arabinoxylans: Optimization and Economic Viability of a Two-Step Alkaline Extraction. **Foods**, v. 12, n. 12, 2023.

COTA-NAVARRO, C. B. *et al.* Continuous hydrogen and methane production in a two-stage cheese whey fermentation system. **Water Science and Technology**, p. 367–375, 2011.

COUTO, P T *et al.* Modelling sugarcane vinasse processing in an acidogenic reactor to produce hydrogen with an ADM1-based model. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 11, p. 6217–6230, 2020.

COUTO, P. T. *et al.* Modelling sugarcane vinasse processing in an acidogenic reactor to produce hydrogen with an ADM1-based model. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 11, p. 6217–6230, 2020.

CREMONEZ, P. A. *et al.* Two-Stage anaerobic digestion in agroindustrial waste treatment: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 281, n. December 2020, p. 111854, 2021.

DAI, K. *et al.* Production of chemicals in thermophilic mixed culture fermentation: mechanism and strategy. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 0, n. 0, p. 1–30, 2019.

DATTA, R. Enzymatic degradation of cellulose in soil: A review. **Heliyon**, v. 10, n. 1, 15 jan. 2024.

DCA.P., Planta de hidrogênio renovável da Eletrobras em Itumbiara recebe certificação da Câmara de Comercialização de Energia Elétrica. **Eletrobras Furnas**. Nov. 2023. Disponível em: <https://www.furnas.com.br/noticia/103/noticias/3052/planta-de-hidrogenio-renovavel-da-eletobras-em-itumbiara>
re#:~:text=A%20planta%20de%20H2V%20de,cerca%20de%20100%20kg%2Fdia. Acessado em: 10/12/2024

DEBOWSKI, M. *et al.* Possibility of hydrogen production during cheese whey fermentation process by different strains of psychrophilic bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, p. 1972–1978, 2014.

DENG, C. *et al.* Can acid pre-treatment enhance biohydrogen and biomethane production from grass silage in single-stage and two-stage fermentation processes? **Energy Conversion and Management**, v. 195, n. March, p. 738–747, 2019.

DESSI, P. *et al.* Thermophilic versus mesophilic dark fermentation in xylose-fed fluidised bed reactors: Biohydrogen production and active microbial community. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 11, p. 5473–5485, 2018.

DEV, C.; JILANI, S. B.; YAZDANI, S. S. Adaptation on xylose improves glucose–xylose co-utilization and ethanol production in a carbon catabolite repression (CCR) compromised ethanologenic strain. **Microbial Cell Factories**, v. 21, n. 1, p. 154, 1 dez. 2022.

DIAZ-MORALES, N. *et al.* Antimicrobial properties and volatile profile of bread and biscuits melanoidins. **Food Chemistry**, v. 373, n. June 2021, p. 0–5, 2022.

DING, C.; YANG, K. L.; HE, J. Biological and fermentative production of hydrogen. **Handbook of Biofuels Production: Processes and Technologies: Second Edition**, v. Chapter 11, p. 303–333, 1 jan. 2016.

DIVYA, D. *et al.* Bioactivity of *Excoecaria agallocha* leaf extract against *Pseudomonas aeruginosa* infection in *Labeo rohita*. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 35, n. 3, p. 804–822, 2023.

DUARTE, S. DE J. *et al.* Biochar and sugar cane filter cake interaction on physical and hydrological soil properties under tropical field conditions. **Biochar**, v. 2, n. 2, p. 195–210, 2020.

DURRE, P. **Handbook of Clostridia**. 2005.

EBRINGEROVÁ, A. Structural diversity and application potential of hemicelluloses. **Macromolecular Symposia**, v. 232, n. 333, p. 1–12, 2005.

EDER, A. S. *et al.* Comparison of hydrogen and volatile fatty acid production by *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* and *Enterobacter aerogenes* singly, in co-cultures or in the bioaugmentation of microbial consortium from sugarcane vinasse. **Environmental Technology & Innovation**, v. 18, p. 100638, 2020.

ELBESHBISHY, E. *et al.* A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 656–668, 2017.

ELIHIMAS, D. R. M. *et al.* Towards biogas production from vinasse and pentose liquor from sugarcane biorefineries. **Energy Conversion and Management: X**, v. 26, 1 abr. 2025.

ELSAMADONY, M. *et al.* Advances towards understanding long chain fatty acids-induced inhibition and overcoming strategies for efficient anaerobic digestion process. **Water Research**, v. 190, p. 116732, 2021.

EPE, E. DE P. E. Balanço Energético Nacional. **Summary report**, p. 72, 2021.

EPE, E. DE P. E. Oferta de Biocombustíveis Estudos do Plano Decenal de Expansão de Energia 2032. **Caderno de oferta**, 2022.

EPE, E. DE P. E. Balanço energético nacional. **Relatório final**, 2024a.

EPE, E. DE P. E. Relatório Síntese 2024_Ano base 2023. **Relatório EPE (Empresa de Pesquisa Energética)**, p. 1–71, 2024b.

EPE, E. DE P. E. BEN: Relatório Síntese (2025). Ano base 2024. **Ben 2025**, v. 1, n. Matriz energética brasileira., p. 1–74, 2025.

FABER, M. DE O. APROVEITAMENTO BIOTECNOLÓGICO DA GLICERINA RESIDUAL DO BIODIESEL PARA GERAÇÃO DE HIDROGÊNIO, 1,3-PROPANODIOL E METANO. v. 7, p. 6, 2021.

FABER, M. DE O.; MEIRELES, P. L. S. DE; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Process parameters

and energy evaluation of biological hydrogen and methane sequentially produced using residual glycerin from biodiesel. **BioEnergy Research**, v. 16, n. 0123456789, p. 1–21, 2022.

FAGBOHUNGBE, M. O. *et al.* The challenges of anaerobic digestion and the role of biochar in optimizing anaerobic digestion. **Waste Management**, 2016.

FALOYE, F. D.; GUEGUIM KANA, E. B.; SCHMIDT, S. Optimization of hybrid inoculum development techniques for biohydrogen production and preliminary scale up. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 27, p. 11765–11773, 2013.

FANGKUM, A.; REUNGSANG, A. Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate by elephant dung : Effects of initial pH and substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 14, p. 8687–8696, 2011.

FASHEUN, D. O. *et al.* Dark fermentative hydrogen production from cassava starch : A comprehensive evaluation of the effects of starch extrusion and enzymatic hydrolysis. **International Journal of Hydrogen Energy**, n. xxxx, 2023.

FASHEUN, D. O.; SANT'ANA DA SILVA, A.; *et al.* Enhancing methane production from cassava starch: The potential of extrusion pretreatment in Single-Stage and Two-Stage anaerobic digestion. **Fuel**, v. 366, n. December 2023, 2024.

FASHEUN, D. O.; SILVA, A. S. A. DA; *et al.* Dark fermentative hydrogen production from cassava starch: A comprehensive evaluation of the effects of starch extrusion and enzymatic hydrolysis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 52, p. 322–334, 2 jan. 2024.

FELPETO-SANTERO, C. *et al.* Engineering alternative isobutanol production platforms. **AMB Express**, v. 5, n. 1, 2015.

FERRAZ-JUNIOR, A. D. N. *et al.* Biogas sequestration from the headspace of a fermentative system enhances hydrogen production rate and yield. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 19, p. 11011–11023, 2020.

FERRAZ JUNIOR, A. D. N. *et al.* **Advancing anaerobic digestion of sugarcane vinasse: Current development, struggles and future trends on production and end-uses of biogas in Brazil** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Elsevier Ltd, , 1 abr. 2022.

FERREIRA-LEITÃO, V. S. *et al.* The protagonism of biocatalysis in green chemistry and its environmental benefits. **Catalysts**, v. 7, n. 1, 2017.

FERRUZZI, Y. *et al.* Identificação do efeito corrosivo da presença de H₂S no biogás em um motogerador a biogás. **Revista Caribeña de Ciencias Sociales**, v. 12, n. 6, p. 2755–2765, 25 out. 2023.

FONSECA, B. C. *et al.* Ideal conditions of microwave-assisted acid pretreatment of sugarcane straw allow fermentative butyric acid production without detoxification step. **Bioresource Technology**, v. 329, n. January, 2021.

FORCHEZATTO, D.; NEVES, J. Sugarcane straw recovery routes. **Sucre, Sugarcane Renewable Electricity - Project**, n. april, 2020.

FREITAS, G. P. *et al.* Anaerobic Co-Digestion of Vinasse and Pentose Liquor and the Role of Micronutrients in Methane Production within Sugarcane Biorefineries. **Methane**, v. 2, n. 4, p. 426–439, 8 dez. 2023.

FRENCH, A. D.; SANTIAGO CINTRÓN, M. Cellulose polymorphy, crystallite size, and the Segal Crystallinity Index. **Cellulose**, v. 20, n. 1, p. 583–588, 1 fev. 2013.

FUESS, L. T. BIODIGESTÃO ANAERÓBIA TERMOFÍLICA DE VINHAÇA EM SISTEMAS COMBINADOS DO TIPO ACIDOGÊNICO-METANOGÊNICO PARA POTENCIALIZAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DE BIOENERGIA EM BIORREFINARIAS DE CANA-DE-AÇÚCAR DE PRIMEIRA GERAÇÃO Tese apresentada à Escola de Engenharia de São. **Tese de doutorado**, 2017.

FUESS, L. T. *et al.* Biochemical butyrate production via dark fermentation as an energetically efficient alternative management approach for vinasse in sugarcane biorefineries. **Renewable Energy**, v. 158, p. 3–12, 1 out. 2020.

FUESS, L. T. *et al.* Solving the bottlenecks of sugarcane vinasse biodigestion: Impacts of temperature and substrate exchange on sulfate removal during dark fermentation. **Chemical Engineering Journal**, v. 455, n. November 2022, p. 140965, 2023a.

FUESS, L. T. *et al.* Solving the bottlenecks of sugarcane vinasse biodigestion: Impacts of temperature and substrate exchange on sulfate removal during dark fermentation. **Chemical Engineering Journal**, v. 455, n. November 2022, 2023b.

FUESS, L. T. Fermentative biohydrogen production in sugarcane biorefineries: Advances, challenges and prospects. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 49, p. 532–553, 2 jan. 2024.

FUESS, L. T.; GARCIA, M. L.; ZAIAT, M. Seasonal characterization of sugarcane vinasse: Assessing environmental impacts from fertirrigation and the bioenergy recovery potential through biodigestion. **Science of the Total Environment**, v. 634, p. 29–40, 2018.

FUESS, L. T.; ZAIAT, M.; NASCIMENTO, C. A. O. DO. Novel insights on the versatility of biohydrogen production from sugarcane vinasse via thermophilic dark fermentation: Impacts of pH-driven operating strategies on acidogenesis metabolite profiles. **Bioresource Technology**, v. 286, n. April, p. 121379, 2019.

GARCÍA-DEPRAECT, O. *et al.* Effect of nitrogen and iron supplementation on the process performance and microbial community structure of a hydrogen-producing reactor continuously fed with tequila vinasse. **Fuel**, v. 334, n. July 2022, p. 126736, 2023.

GARCIA-OCHOA, F. *et al.* Industrial Crops & Products Multi-feedstock lignocellulosic biorefineries based on biological processes: An overview. **Industrial Crops & Products journal**, v. 172, n. 114062 Contents, 2021.

GHIMIRE, A. *et al.* Effects of operational parameters on dark fermentative hydrogen production from biodegradable complex waste biomass. **Waste Management**, v. 50, p. 55–64, 2016.

GIL-GARCIA, C. *et al.* Performance improvement of a thermophilic sulfate-reducing bioreactor under acidogenic conditions: Effects of diversified operating strategies. **Journal of Environmental Management**, v. 207, p. 303–312, 2018.

GILNA, P. *et al.* Progress in understanding and overcoming biomass recalcitrance: A BioEnergy Science Center (BESC) perspective Mike Himmel. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–7, 2017.

GINKEL, S. W. VAN; LOGAN, B. Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. **Water Research**, v. 39, p. 3819–3826, 2005.

GÍRIO, F. M. *et al.* Hemicelluloses for fuel ethanol : A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010.

GOLMAKANI, A. *et al.* Advances, challenges, and perspectives of biogas cleaning, upgrading, and utilisation. **Fuel**, v. 317, n. February, p. 123085, 2022.

GOMIDE, F. T. F. *et al.* Modification of microcrystalline cellulose structural properties by ball-milling and ionic liquid treatments and their correlation to enzymatic hydrolysis rate and yield. **Cellulose**, v. 8, 2019.

GONZALEZ, R.; CAMPBELL, P.; WONG, M. Production of ethanol from thin stillage by metabolically engineered *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 3, p. 405–411, 2010.

GUNATHILAKE, C. *et al.* A comprehensive review on hydrogen production, storage, and applications. **Chemical Society Reviews**, 2024.

GUO, H. *et al.* Inhibitor formation and detoxification during lignocellulose biorefinery : A review. **Bioresource Technology**, v. 361, n. July, p. 127666, 2022.

HAN, S. *et al.* Pilot-scale two-stage process : a combination of acidogenic hydrogenesis and methanogenesis. **Water Science and Technology**, v. 52, n. November, p. 131–138, 2005.

HAQUE, S. *et al.* Thermophilic biohydrogen production strategy using agro industrial wastes: Current update, challenges, and sustainable solutions. **Chemosphere**, v. 307, n. August, 2022.

HAYNES, R. J. Agriculture , Ecosystems and Environment The nature of biogenic Si and its potential role in Si supply in agricultural soils. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 245, n. March, p. 100–111, 2017.

HEMATPUR, H. *et al.* **Review of underground hydrogen storage: Concepts and challenges** *Advances in Geo-Energy Research* Yandy Scientific Press, , 1 fev. 2023.

HILIGSMANN, S. *et al.* Comparative study of biological hydrogen production by pure strains and consortia of facultative and strict anaerobic bacteria. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 4, p. 3810–3818, fev. 2011.

HUISMAN, M. M. H.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Glucuronoarabinoxylans from maize kernel cell walls are more complex than those from sorghum kernel cell walls.

Carbohydrate Polymers, v. 43, n. 3, p. 269–279, 2000.

IEA, I. E. A. World Energy Outlook 2022 - Key findings. 2022.

IEA, INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. Global Hydrogen Review. **Report**, 2024.

IEA, INTERNATIONAL ENERGY AGENCY World Energy Outlook. **Report**, 2025.

IRENA, I. E. A. World Energy Transitions Outlook 2024: 1.5°C pathway. **IRENA publications**, 2024.

JENSEN, M. B.; OTTOSEN, L. D. M.; KOFOED, M. V. W. H₂ gas-liquid mass transfer : A key element in biological Power-to-Gas methanation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 147, p. 111209, 2021.

JIANG, J. *et al.* Rapid and effective molten oxalic acid dihydrate pretreatment to enhance enzymatic saccharification for biohydrogen production by efficient coextraction of lignin and hemicellulose in wheat straw. **Chemical Engineering Journal**, v. 475, n. July, p. 1–7, 2023.

JUNIOR, A. D. N. F. *et al.* Biogas sequestration from the headspace of a fermentative system enhances hydrogen production rate and yield Ant o. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2020.

KAMDEM, I. *et al.* Enhanced Biogas Production During Anaerobic Digestion of Steam-Pretreated Lignocellulosic Biomass from Williams Cavendish Banana Plants. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, n. 2, p. 175–185, 1 fev. 2018.

KARADAGLI, F.; MARCUS, A. K.; RITTMANN, B. E. Role of hydrogen (H₂) mass transfer in microbiological H₂ -threshold studies. **Biodegradation**, v. 30, n. 2–3, p. 113–125, 2019.

KARIM, A. *et al.* Technical difficulties of mixed culture driven waste biomass-based biohydrogen production: Sustainability of current pretreatment techniques and future prospective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 151, n. July 2020, p. 111519, 2021.

KHAN, M. U. *et al.* Current status of biogas upgrading for direct biomethane use: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 149, n. May, p. 111343, 2021.

KHONGKLIANG, P.; KONGJAN, P.; O-THONG, S. **Hydrogen and Methane Production from Starch Processing Wastewater by Thermophilic Two-Stage Anaerobic Digestion**. 2015. v. 79

KIANI, M. *et al.* Different bioreactor configurations for biogas production from sugarcane vinasse : A comprehensive review. **Biomass and Bioenergy**, v. 161, n. March, p. 106446, 2022.

KUMAR, A.; SAMADDER, S. R. Performance evaluation of anaerobic digestion technology for energy recovery from organic fraction of municipal solid waste: A review. **Energy**, v. 197, p. 117253, 2020.

KUMAR, M.; UPADHYAY, S. N.; MISHRA, P. K. Pyrolysis of Sugarcane (Saccharum

officinatum L.) Leaves and Characterization of Products. **ACS Omega**, v. 7, n. 32, p. 28052–28064, 2022.

KUMAR, R. *et al.* Carbohydrate Derived-Pseudo-Lignin Can Retard Cellulose Biological Conversion. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 3, p. 737–753, 2012.

LATEEF, S. A.; BENERAGAMA, N. Batch anaerobic co-digestion of cow manure and waste milk in two-stage process for hydrogen and methane productions. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2013.

LIMA, V. DE O. *et al.* Anaerobic digestion of vinasse and water treatment plant sludge increases methane production and stability of UASB reactors. **Journal of Environmental Management**, v. 327, p. 116451, 1 fev. 2023.

LIN, C. Y.; LAY, C. H. Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, n. 1, p. 41–45, 2004.

LIU, D. *et al.* Enhanced hydrogen and methane production from sewage sludge by addition of cornstalk in two-stage fermentation process. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, n. 12, p. 6535–6539, 2013.

LIU, DAWEI *et al.* Hydrogen and methane production from household solid waste in the two-stage fermentation process. **WATER RESEARCH**, v. 40, p. 2230–2236, 2006.

LIU, Y.; WANG, Y. Directional enhancement of fermentative coproduction of hydrogen and acetic acid from glucose via control of headspace pressure. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 7, p. 4095–4101, 16 fev. 2017.

LONGATI, A. A. *et al.* Biogas Production from Anaerobic Digestion of Vinasse in Sugarcane Biorefinery: A Techno - economic and Environmental Analysis. **Waste and Biomass Valorization**, n. 0123456789, 2019.

LOPEZ-HIDALGO, A. M. *et al.* Co-production of ethanol-hydrogen by genetically engineered *Escherichia coli* in sustainable biorefineries for lignocellulosic ethanol production. **Chemical Engineering Journal**, v. 406, n. August 2020, p. 126829, 2021.

LÓRÁNT, B.; TARDY, G. M. Current Status of Biological Biogas Upgrading Technologies. v. 66, n. 3, p. 465–481, 2022.

LORENZI, B. R.; ANDRADE, T. H. DE N. Second generation ethanol in Brazil: Policies and socio-technical networks. **Revista Brasileira de Ciencias Sociais**, v. 34, n. 100, p. 1–17, 2019.

LOZANO-MARTÍN, D.; MOREAU, A.; CHAMORRO, C. R. Thermophysical properties of hydrogen mixtures relevant for the development of the hydrogen economy: Review of available experimental data and thermodynamic models. **Renewable Energy**. 1 out. 2022.

LUTERBACHER, YJ. S. *et al.* Nonenzymatic Sugar Production from Biomass Using Biomass-Derived g-Valerolactone. **Science**, v. 343, n. January, p. 277–280, 2014.

LUZ, D. A. *et al.* Sugarcane waste products as source of phytotoxic compounds for agriculture.

International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture, v. 9, n. 4, p. 385–397, 2020.

LV, Z. *et al.* Homoacetogenesis is altering the metabolic pathway of acidogenic microbiome and combating volatile fatty acid accumulation in anaerobic reactors. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 11, n. 4, 1 ago. 2023.

LYND, L. R. *et al.* Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506–577, set. 2002.

MA, J. *et al.* Synthesis and characterization of biofunctional quaternized xylan-Fe₂O₃ core/shell nanocomposites and modification with polylysine and folic acid. **Carbohydrate Polymers**, v. 199, n. July, p. 382–389, 2018.

MAGRINI, F. E. *et al.* Effect of different heat treatments of inoculum on the production of hydrogen and volatile fatty acids by dark fermentation of sugarcane vinasse. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 11, p. 2443–2456, 2021.

MANDAL, B.; NATH, K.; DAS, D. Improvement of biohydrogen production under decreased partial pressure of H₂ by *Enterobacter cloacae*. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 11, p. 831–835, 2006.

MASSANET-NICOLAU, J. *et al.* Production of hydrogen from sewage biosolids in a continuously fed bioreactor: Effect of hydraulic retention time and sparging. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 2, p. 469–478, 2010.

MASSANET-NICOLAU, J. *et al.* Bioresource Technology Utilising biohydrogen to increase methane production, energy yields and process efficiency via two stage anaerobic digestion of grass. **Bioresource technology**, v. 189, p. 379–383, 2015.

MATTIELLO-FRANCISCO, L. *et al.* Hydrogen Production from Sugarcane Bagasse Pentose Liquor Fermentation Using Different Food/Microorganism and Carbon/Nitrogen Ratios under Mesophilic and Thermophilic Conditions. **Fermentation**, v. 10, n. 8, p. 432, 2024.

MAZARELI, R. C. DA S. *et al.* *Bacillus* sp. isolated from banana waste and analysis of metabolic pathways in acidogenic systems in hydrogen production. **Journal of Environmental Management**, v. 247, n. May, p. 178–186, 2019.

MECHERY, J. *et al.* Biohydrogen production from acidic and alkaline hydrolysates of paddy straw using locally isolated facultative bacteria through dark fermentation. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 11, p. 1263–1272, 2021.

MELO-SILVEIRA, R. F. *et al.* In vitro antioxidant, anticoagulant and antimicrobial activity and in inhibition of cancer cell proliferation by xylan extracted from corn cobs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 1, p. 409–426, 2012.

MENANDRO, L. M. S. *et al.* Comprehensive assessment of sugarcane straw: implications for biomass and bioenergy production. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 11, n. 3, p. 488–504, 2017.

MENEZES, C. A. DE *et al.* Relating biomass composition and the distribution of metabolic functions in the co-fermentation of sugarcane vinasse and glycerol. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 48, n. 24, p. 8837–8853, 2023.

MIGNOGNA, D. *et al.* **Production of Biogas and Biomethane as Renewable Energy Sources: A Review** *Applied Sciences (Switzerland)* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 set. 2023.

MIGUEZ, I. S. *et al.* Plant cell wall polysaccharides: Methodologies for compositional, structural, and physicochemical characterization. **Polysaccharide-degrading biocatalysts (Book)**, 2023.

MILESSI, T. S. *et al.* Repeated batches as a strategy for high 2G ethanol production from undetoxified hemicellulose hydrolysate using immobilized cells of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in a fixed-bed reactor. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2020.

MIRMOHAMADSADEGHI, S. *et al.* Pretreatment of lignocelluloses for enhanced biogas production: A review on influencing mechanisms and the importance of microbial diversity. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 135, n. August 2019, p. 110173, 2021.

MOCKAITIS, G. *et al.* Acidic and thermal pre-treatments for anaerobic digestion inoculum to improve hydrogen and volatile fatty acid production using xylose as the substrate. **Renewable Energy**, v. 145, p. 1388–1398, 2020.

MONTOYA-ROSALES, J. DE J. *et al.* Metatranscriptomic Analysis Reveals the Coexpression of Hydrogen-Producing and Homoacetogenesis Genes in Dark Fermentative Reactors Operated at High Substrate Loads. **Environmental Science and Technology**, v. 57, n. 31, p. 11552–11560, 8 ago. 2023.

MONTOYA, A. C. V. Avaliação das características físico-químicas e microbiológicas da produção de hidrogênio e homoacetogênese a partir de resíduos do processamento de café. **Tese de doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento**, n. USP, 2019.

MORAES, B. DE S. *et al.* Enriched microbial consortia for dark fermentation of sugarcane vinasse towards value-added short-chain organic acids and alcohol production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 127, n. 5, p. 594–601, 2019.

MORAES, B. S. *et al.* Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense? **Applied Energy**, v. 113, p. 825–835, 2014.

MORAES, E. C. *et al.* Biotechnology for Biofuels Lignolytic - consortium omics analyses reveal novel genomes and pathways involved in lignin modification and valorization. **Biotechnology for Biofuels**, p. 1–16, 2018.

MOTA, V. T. *et al.* Biohydrogen production at pH below 3.0 : Is it possible ? **Water Research**, v. 128, p. 350–361, 2018.

MOUTTA, R. DE O. *et al.* Comparative Response and Structural Characterization of Sugarcane

Bagasse, Straw and Bagasse-Straw 1:1 Mixtures Subjected to Hydrothermal Pretreatment and Enzymatic Conversion. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 01, n. S12, 2013.

NAIR, N. *et al.* Impact of siloxane impurities on the performance of an engine operating on renewable natural gas. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 51, n. 48, p. 15786–15795, 5 dez. 2012.

NASR, N. *et al.* Comparative assessment of single-stage and two-stage anaerobic digestion for the treatment of thin stillage. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 122–126, 2012.

NEGRÃO, D. R. *et al.* Inorganics in sugarcane bagasse and straw and their impacts for bioenergy and biorefining: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 148, n. September 2020, p. 111268, 2021.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6^o edição, 2014.

NIZ, M. Y. K. *et al.* Extreme thermophilic condition: An alternative for long-term biohydrogen production from sugarcane vinasse. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 41, p. 22876–22887, 2019.

NUALSRI, C. *et al.* Two-Stage and One-Stage Anaerobic Co-digestion of Vinasse and Spent Brewer Yeast Cells for Biohydrogen and Methane Production. **Molecular Biotechnology**, 1 set. 2024.

NUALSRI, C.; REUNGSANG, A.; PLANGKLANG, P. Biochemical hydrogen and methane potential of sugarcane syrup using a two-stage anaerobic fermentation process. **Industrial Crops and Products**, v. 82, p. 88–99, 2016.

O-THONG, S. *et al.* Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 4, p. 1204–1214, fev. 2008.

OLATUNJI, K. O.; AHMED, N. A.; OGUNKUNLE, O. Biotechnology for Biofuels Optimization of biogas yield from lignocellulosic materials with different pretreatment methods : a review. **Biotechnology for Biofuels**, 2021.

ONU, O. DAS N. U. Sem captura e armazenamento de carbono não será possível cumprir Acordo de Paris, diz relatório. **Clima e meio ambiente**, 2021.

OSMAN, A. I. *et al.* Hydrogen production , storage , utilisation and environmental impacts : a review. **Environmental Chemistry Letters**, n. 0123456789, 2021.

ÖZBAY, N. *et al.* Hydrothermal vs. dilute acid pre-treatments: comparison of the biomass properties, distribution of pyrolysis products, and bio-oil characteristics. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, n. 2, p. 739–753, 2023.

PAKARINEN, O. M.; TAHTI, H. P.; RINTALA, J. A. One-stage H₂ and CH₄ and two-stage H₂ D CH₄ production from grass silage and from solid and liquid fractions of NaOH pre-treated grass silage. **Biomass Analysis Technology Team Laboratory Analytical Procedure**,

v. 33, p. 1419–1427, 2009.

PALOP, A.; MAÑAS, P.; CONDÓN, S. Sporulation temperature and heat resistance of bacillus spores: A review. **Journal of Food Safety**, v. 19, n. 1, p. 57–72, 1999.

PARK, Y. B.; COSGROVE, D. J. A revised architecture of primary cell walls based on biomechanical changes induced by substrate-specific endoglucanases. **Plant Physiology**, v. 158, n. 4, p. 1933–1943, 2012.

PATAKOVA, P. *et al.* Acidogenesis, solventogenesis, metabolic stress response and life cycle changes in *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598 at the transcriptomic level *petra*. **Scientific Reports**, v. 9, n. October 2018, p. 1–21, 2019.

PATAKOVA, P. *et al.*, Transcriptomic studies of solventogenic clostridia, *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*. **Biotechnology Advances**, v. 58, n. August 2021, p. 107889, 2022.

PAUSS, A. *et al.* Liquid-to-Gas mass transfer in anaerobic processes: Inevitable transfer limitations of methane and hydrogen in the biomethanation process. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1636–1644, 1990.

PAVIČIĆ, J. *et al.* **Biogas and Biomethane Production and Usage: Technology Development, Advantages and Challenges in Europe** *Energies* MDPI, , 1 abr. 2022.

PEIXOTO, G. *et al.* Hydrogen and Methane Production , Energy Recovery , and Organic Matter Removal from Effluents in a Two-Stage Fermentative Process. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 168, p. 651–671, 2012.

PÉREZ-RANGEL, M. *et al.* Essential Nutrients for Improving the Direct Processing of Raw Lignocellulosic Substrates Through the Dark Fermentation Process. **Bioenergy Research**, v. 13, n. 1, p. 349–357, 1 mar. 2020.

PEREZ, C. L. *et al.* Towards a practical industrial 2G ethanol production process based on immobilized recombinant *S. cerevisiae* : Medium and strain selection for robust integrated fixed-bed reactor operation. v. 185, 2022.

PETROVA, P.; PETLICHKA, S.; PETROV, K. New *Bacillus* spp. with potential for 2,3-butanediol production from biomass. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 130, n. 1, p. 20–28, 2020.

PIFFER, M. A. *et al.* Sulfate and pH-driven metabolic flexibility in sugarcane vinasse dark fermentation stimulates biohydrogen evolution , sulfidogenesis or homoacetogenesis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 47, n. 73, p. 31202–31222, 2022.

PINHEIRO, L. P. *et al.* Improving the Feasibility of 2G Ethanol Production from Lignocellulosic Hydrolysate Using Immobilized Recombinant Yeast : A Technical – Economic Analysis and Life Cycle Assessment. **fermentation**, v. 11, n. 116, p. 1–27, 2025.

POHLAND, F. G.; GHOSH, S. Developments in anaerobic stabilization of organic wastes - the two-phase concept. **Environmental Letters**, v. 1 (4), p. 255–266, 1971.

POURESMAEIL, S.; NOSRATI, M.; EBRAHIMI, S. Operating control for enrichment of hydrogen-producing bacteria from anaerobic sludge and kinetic analysis for vinasse inhibition. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 3, p. 103090, 2019.

QASEEM, M. F.; SHAHEEN, H.; WU, A. M. Cell wall hemicellulose for sustainable industrial utilization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 144, n. September 2020, p. 110996, 2021.

QASEEM, M. F.; WU, A. M. Balanced xylan acetylation is the key regulator of plant growth and development, and cell wall structure and for industrial utilization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 1–21, 2020.

QELISH, M. EL *et al.* Conversion of boreal lake sedimented pulp mill fibre into biogas : a two - stage hydrogen and methane production. **Biomass Conversion and Biorefinery**, n. 0123456789, 2022.

RABELO, S. C.; COSTA, A. C. DA; VAZ ROSSEL, C. E. Industrial waste recovery. **Sugarcane: Agricultural Production, Bioenergy and Ethanol**, p. 365–381, 2015.

RAGSDALE, S. W.; PIERCE, E. Biochimica et Biophysica Acta Acetogenesis and the Wood – Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. **Proteins and Proteomics**, v. 1784, p. 1873–1898, 2008.

RAJENDRAN, K. *et al.* Advancing anaerobic digestion through two-stage processes : Current developments and future trends. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 123, n. February, p. 109746, 2020.

RAJHI, H. *et al.* Vacuum promotes metabolic shifts and increases biogenic hydrogen production in dark fermentation systems. **Frontiers of Environmental Science and Engineering**, v. 10, n. 3, p. 513–521, 2016.

RAMBABU, K. *et al.* Enhanced biohydrogen production from date seeds by *Clostridium thermocellum* ATCC 27405. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 42, p. 22271–22280, 2019.

RAMOS, L. R. *et al.* Anaerobic digestion of vinasse in fluidized bed reactors: Process robustness between two-stage thermophilic-thermophilic and thermophilic-mesophilic systems. **Journal of Cleaner Production**, v. 314, n. June, p. 128066 Contents, 2021.

RAMOS, L. R.; SILVA, E. L.; LUIS, R. W. Thermophilic hydrogen and methane production from sugarcane stillage in two-stage anaerobic fluidized bed reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 8, p. 5239–5251, 2019.

RAMOS, M. D. N. *et al.* Enzymatic catalysis as a tool in biofuels production in Brazil: Current status and perspectives. **Energy for Sustainable Development**, v. 68, p. 103–119, 2022.

RANGANATHAN, S. *et al.* Biohydrogen production from hemicellulose rich softwood hydrolysate. **Chemical Engineering Journal**, v. 506, n. January, 2025.

RASHAMA, C.; IJOMA, G.; MATAMBO, T. Biogas generation from by-products of edible

oil processing: a review of opportunities, challenges and strategies. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 9, n. 4, p. 803–826, 2019.

REGO, G. C. *et al.* Bioconversion of pretreated sugarcane vinasse into hydrogen : new perspectives to solve one of the greatest issues of the sugarcane biorefinery. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 12, p. 5527–5541, 2020.

REICHARDT, N. *et al.* Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. **The ISME Journal**, v. 8, p. 1323–1335, 2014.

REIS, C. E. R. *et al.* Lowering the inhibition of sugarcane vinasse as a culture medium for oleaginous fungi through oxidative pre-treatment aiming at the degradation of toxic compounds. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 95, n. 11, p. 2943–2950, 2020.

RENNIE, E. A.; SCHELLER, H. V. Xylan biosynthesis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 100–107, 2014.

REYNA-GÓMEZ, L. M. *et al.* Effect of carbon/nitrogen ratio, temperature, and inoculum source on hydrogen production from dark codigestion of fruit peels and sewage sludge. **Sustainability (Switzerland)**, v. 11, n. 7, p. 1–13, 2019.

RIBEIRO, A. R. *et al.* Evaluation of the effect of increasing the organic load in the thermophilic co-fermentation of sugarcane industry by-products on hydrogen, ethanol and lactic acid generation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 57, n. November 2023, p. 549–561, 2024.

RIBEIRO, F. R. *et al.* Anaerobic digestion of hemicellulose hydrolysate produced after hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse in UASB reactor. **Science of the Total Environment**, v. 584–585, p. 1108–1113, 15 abr. 2017.

RIGHETTI, E. *et al.* A Multiproduct Biorefinery Approach for the Production of Hydrogen , Methane and Volatile Fatty Acids from Agricultural Waste. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 10, p. 5239–5246, 2020.

ROBSON, J. *et al.* Biomethane as an Energy Source. **Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids: Production of Fuels and Chemicals**, v. Handbook o, p. 155–166, 2017.

ROCHA, D. H. D.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A. Evaluation of significant factors in hydrogen production and volatile fatty acids in co-fermentation of citrus peel waste and processing wastewater. **Fuel**, v. 354, n. July, 2023.

ROGERI, R. C. *et al.* Strategies to control pH in the dark fermentation of sugarcane vinasse : Impacts on sulfate reduction , biohydrogen production and metabolite distribution. **Journal of Environmental Management**, v. 325, n. July 2022, 2023.

ROSA, B. Volks Caminhões e Ônibus lança modelos movidos a biometano e com motor híbrido. **O Globo**. Nov. 2024. Disponível em: <https://oglobo.globo.com/economia/negocios/noticia/2024/11/04/volks-caminhoes-e-onibus->

lanca-modelos-movidos-a-biometano-e-com-motor-hibrido.ghml. acessado em: 11/02/2025

RUIZ-AGUILA, G. M. L. *et al.* Comparative Study of Methane Production in a One-Stage vs Two-Stage Anaerobic Digestion Process from Raw Tomato Plant Waste. **Energies**, v. 15, 2022.

SÁ, L. R. V. *et al.* Simultaneous analysis of carbohydrates and volatile fatty acids by HPLC for monitoring fermentative biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 23, p. 15177–15186, 2011.

SÁ, L. R. V. DE. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia a partir de diferentes fontes de carbono e otimização a partir de pentoses. **Tese de doutorado em Bioquímica**, n. Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, p. 214, 2015.

SÁ, L. R. V. DE *et al.* Biohydrogen production using xylose or xylooligosaccharides derived from sugarcane bagasse obtained by hydrothermal and acid pretreatments. **Renewable Energy**, v. 146, p. 2408–2415, 2020.

SAADY, N. M. C. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation : Unresolved challenge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 30, p. 1–20, 2013.

SALVACHÚA, D. *et al.* Succinic acid production on xylose-enriched biorefinery streams by *Actinobacillus succinogenes* in batch fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2016.

SAMPAIO, I. L. M. *et al.* Electricity Production from Sugarcane Straw Recovered Through Bale System : Assessment of Retrofit Projects. **BioEnergy Research**, 2019.

SAMROT, A. V. *et al.* A Review on Biohydrogen Sources, Production Routes, and Its Application as a Fuel Cell Sustainability (Switzerland). **Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)**, , 1 ago. 2023.

SANTOS, G. A. SILÍCIO NA PRODUÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Tese de doutorado em Fitotecnia**, n. Universidade Federal de Uberlândia, UFU, p. 1–111, 2017.

SANTOS, L. C. DOS *et al.* Production of biogas (methane and hydrogen) from anaerobic digestion of hemicellulosic hydrolysate generated in the oxidative pretreatment of coffee husks. **Bioresource Technology**, v. 263, n. March, p. 601–612, 2018.

SANTOS, P. S. *et al.* Does sugarcane vinasse composition variability affect the bioenergy yield in anaerobic systems ? A dual kinetic-energetic assessment. **Journal of Cleaner Production**, v. 240, p. 118005, 2019.

SANTOS, S. B. DOS *et al.* Sequential hydrogen and methane production using the residual biocatalyst of biodiesel synthesis as raw material. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2021.

SAXENA, R. K. *et al.* Production and Applications of Succinic Acid. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products (Book)**, v. Chapter 27, p. 601–630, 2017.

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, 2010.

SEMACE, Secretaria do Meio Ambiente e Mudança do Clima. Coema aprova primeira planta de Hidrogênio Verde do Ceará. **Site do SEMACE**. Out, 2023. Disponível em: <https://www.semace.ce.gov.br/2023/10/26/coema-aprova-primeira-planta-de-hidrogenio-verde-do-ceara/#:~:text=O%20HUB%20de%20Hidrog%C3%AAnio%20Verde,assinados%20como%20parte%20do%20HUB>. Acessado em: 10/12/2024.

SEMACE, Secretaria do Meio Ambiente e Mudança do Clima. **Coema aprova terceira planta de hidrogênio verde no Ceará**. Ago, 2024. Acessível em: <https://www.ceara.gov.br/2024/08/02/coema-aprova-terceira-planta-de-hidrogenio-verde-no-ceara/>. Acessado em: 10/12/2024.

SEMKIV, M. V. *et al.* Metabolic engineering for high glycerol production by the anaerobic cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 11, p. 4403–4416, 2017.

SERRANO-MEZA, A. *et al.* Hydrogen and Methane Production from Tequila Vinasses in a Novel Hybrid Reactor Containing Biofilm and Suspended Biomass. **BioEnergy Research**, v. 15, p. 1675–1690, 2022.

SEUKEP, A. J. *et al.* In vitro antibacterial and antiproliferative potential of *echinops lanceolatus* mattf. (asteraceae) and identification of potential bioactive compounds. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 4, p. 1–14, 2020.

SHAPOVALOV, Y. *et al.* Dry anaerobic digestion of chicken manure: A review. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 10, n. 21, p. 1–24, 2020.

SILLERO, L.; SOLERA, R.; PEREZ, M. Anaerobic co-digestion of sewage sludge, wine vinasse and poultry manure for bio-hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 47, n. 6, p. 3667–3678, 2022.

SILLERO, L. *et al.*, Effect of temperature on biohydrogen and biomethane production using a biochemical potential test with different mixtures of sewage sludge, vinasse and poultry manure. **Journal of Cleaner Production**, v. 382, 1 jan. 2023.

SILVA-NETO, J. M. DA *et al.* Can ethanol partially or fully replace sulfuric acid in the acid wash step of bioethanol production to fight contamination by *Lactobacillus fermentum*? **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 37, n. 2, p. 323–332, 2020.

SILVA, A. S. DA *et al.* Sugarcane and Woody Biomass Pretreatments for Ethanol Production. **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization**, v. Cap. 3, 2013.

SILVA, R. D. S. *et al.* Effect of Acid Treatment in Alcoholic Fermentation. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 1, p. 52–56, 2015.

SLUITER, A. *et al.* Determination of Extractives in Biomass. n. January, 2005.

SLUITER, A. *et al.* Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. n. August, 2012.

SOARES; DUFT, D.; *et al.* Sugarcane Trash Processing and Burning Alternatives. **Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists**, v. 30, p. 157–164, 2019.

SOARES; DUFT; *et al.* SUCRE Project | Sugarcane Trash Processing and Burning Alternatives. n. September, 2019.

SOARES, C. Projeto SUCRE | SISTEMAS DE PROCESSAMENTO DE PALHA. 2019.

SOARES, V. L. *et al.* Potential use of sisal juice as raw material for sequential biological production of hydrogen and methane. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, n. 0123456789, 2023.

SUKPHUN, P. *et al.* Two-stage biohydrogen and methane production from sugarcane-based sugar and ethanol industrial wastes : A comprehensive review. **Bioresource Technology**, v. 386, n. May, 2023.

SUSMOZAS, A. *et al.* Economic and environmental assessment of the retrofitting of a first-generation ethanol plant. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 15, n. 6, p. 8997–9010, 2025.

SWINBOURN, R.; LI, C.; WANG, F. A Comprehensive Review on Biomethane Production from Biogas Separation and its Techno-Economic Assessments. **ChemSusChe.**, 7 out. 2024.

SYDNEY, E. B. *et al.* Current developments and challenges of green technologies for the valorization of liquid , solid , and gaseous wastes from sugarcane ethanol production. **Journal of Hazardous Materials**, v. 404, n. September 2020, p. 124059, 2021.

TAKEDA, P. Y. *et al.* Enhancing the energetic potential of sugarcane biorefinery exchanging vinasse and glycerol in sugarcane off-season in an anaerobic reactor. **Renewable Energy**, v. 195, p. 1218–1229, 1 ago. 2022.

TANG, J. *et al.* Inhibitory effects of acetate and ethanol on biohydrogen production of *Ethanoligenens harbinense* B49. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 1, p. 741–747, 2012.

TEDSREE, K. *et al.* Hydrogen production from formic acid decomposition at room temperature using a Ag–Pd core–shell nanocatalyst. **Nature Nanotechnology**, v. 6, n. 5, p. 302–307, 2011.

TENA, M.; LUQUE, B.; SOLERA, R. Enhanced hydrogen production from sewage sludge by cofermentation with wine vinasse. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 32, p. 15977–15984, 2020.

THADDEUS EZEJI, NASIB QURESHI, H. P. B. Butanol Production From Agricultural Residues: Impact of Degradation Products on *Clostridium beijerinckii* Growth and Butanol Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, No 6, p. 503–505, 2007.

THUNGKLIN, P.; SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A. Sequential fermentation of hydrogen and methane from steam-exploded sugarcane bagasse hydrolysate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 21, p. 9924–9934, 24 maio 2018.

TIAN, H. *et al.* Organic waste to biohydrogen: A critical review from technological development and environmental impact analysis perspective. **Applied Energy**, v. 256, n. September, p. 113961, 2019.

TIBÚRCIO NETO, L. *et al.* Methane production from anaerobic co-digestion of vinasse and molasses: effects of substrate proportion, COD and alkalizing agent. **International Journal of Environmental Science and Technology**, 2024.

TJO, H.; CONWAY, J. M. Sugar transport in thermophiles: Bridging lignocellulose deconstruction and bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. Oxford University Press, 2024.

TOLEDO-ALARCÓN, J. *et al.* Basics of bio-hydrogen production by dark fermentation. *In: Bioreactors for microbial biomass and energy conversion*. [s.l.] Springer, 2018. p. 199–220.

TOLEDO-CERVANTES, A. *et al.* Comparative evaluation of the mesophilic and thermophilic biohydrogen production at optimized conditions using tequila vinasses as substrate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 19, p. 11000–11010, 2020.

TOMAS, A. F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Effect of xylose and nutrients concentration on ethanol production by a newly isolated extreme thermophilic bacterium. **Water Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 341–347, 2011.

TOMASINI, M. C. Produção sequencial de hidrogênio e metano via digestão anaeróbia a partir da fração hemicelulósica da palha de cana-de-açúcar. **Dissertação de mestrado em bioquímica**, v. UFRJ, n. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2020.

TOMASINI, M.; FABER, M. DE O.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Sequential production of hydrogen and methane using hemicellulose hydrolysate from diluted acid pretreatment of sugarcane straw. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 48, n. 27, p. 9971–9987, 2022.

TORO, E. E. R. *et al.* Two-stage semi-continuous hydrogen and methane production from undetoxified and detoxified acid hydrolysates of agave bagasse. **Biomass and Bioenergy journal**, v. 150, n. May, 2021.

TSAI, Y.; DU, Y.; YANG, C. Anaerobic biohydrogen production from biodetoxified rice straw hydrolysate. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 123, p. 134–140, 2021.

VANDENBERGHE, L. P. S. *et al.* Beyond sugar and ethanol: The future of sugarcane biorefineries in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 167, n. January 2021, p. 112721, 2022.

VARANASI, J. L.; KUMARI, S.; DAS, D. Improvement of energy recovery from water hyacinth by using integrated system. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 3,

p. 1303–1318, jan. 2018.

VARDAR-SCHARA, G.; MAEDA, T.; WOOD, T. K. Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via fermentation. **Microbial Biotechnology**, v. 1, p. 107–125, 2008.

VASCONCELOS, N. M. DE; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. DE S. Determination of Reducing Sugars by 3,5-Dinitrosalicylic Acid: History of Method Development and Establishment of a Protocol for the Bioprocess Laboratory. **Boletim de Pesquisa Número 9 - Embrapa**, v. 88, p. 1–16, 2013.

VIDRA, A.; NÉMETH, Á. Bio-produced Propionic Acid : A Review. **Periodica Polytechnica Chemical Engineering**, v. 62, p. 57–67, 2018.

VOLPI, M. C. P. *et al.* Anaerobic Thermophilic Co-digestion of Sugarcane Biorefinery Residues Enhances Biogas Production. **bioRxiv**, v. preprint, 2021.

VOLPI, M. P. C. *et al.* Biohydrogen and methane production via silage-based dark co-fermentation using vinasse and filter cake. **Bioresource Technology Reports**, v. 27, n. August, p. 1–12, 2024.

VOLPI, M. P. C.; FUESS, L. T.; MORAES, B. S. Economic performance of biogas production and use from residues co-digestion in integrated 1G2G sugarcane biorefineries : Better electricity or biomethane ? **Energy Conversion and Management**, v. 277, n. October 2022, p. 116673, 2023.

WANG, J.; WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production : A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 2, p. 799–811, 2009.

WANG, J.; YIN, Y. Fermentative hydrogen production using various biomass-based materials as feedstock. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, n. January 2017, p. 284–306, 2018a.

WANG, J., YIN, Y. Fermentative hydrogen production using various biomass-based materials as feedstock. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, p. 284–306, 1 set. 2018b.

WANG, J., YIN, Y. Progress in microbiology for fermentative hydrogen production from organic wastes. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 10, p. 825–865, 2019.

WANG, Z. *et al.* Enhancing energy recovery via two stage co-fermentation of hydrothermal liquefaction aqueous phase and crude glycerol. **Energy Conversion and Management**, v. 231, n. February, p. 113855, 2021.

WATANABE, M. D. B. *et al.* Process simulation of renewable electricity from sugarcane straw : Techno-economic assessment of retro fit scenarios in Brazil. **Journal of Cleaner Production**, v. 254, p. 120081, 2020.

WOOSHIN PARK, SEUNG H. HYUN, SANG-EUN OH, BRUCE E. LOGAN, I. S. K. Removal of Headspace CO₂ Increases Biological Hydrogen Production. **Environ. Sci. Technol.**, v. 39, p. 4416–4420, 2005.

XIE, B. *et al.* Cogeneration of hydrogen and methane from glucose to improve energy conversion efficiency. v. 33, p. 5006–5011, 2008.

XU, S. *et al.* Effects of high-pressure extruding pretreatment on MSW upgrading and hydrolysis enhancement. **Waste Management**, v. 58, p. 81–89, 2016.

YANG, G.; WANG, J. Various additives for improving dark fermentative hydrogen production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 95, p. 130–146, 1 nov. 2018.

YANG, H. *et al.* Characterization of hemicelluloses in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) culm during xylogenesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 1119–1128, 2020.

YILDIRIM, O. *et al.* Optimization of oxalic and sulphuric acid pretreatment conditions to produce bio-hydrogen from olive tree biomass. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 47, n. 62, p. 26316–26325, 2022.

YOO, M.; NGUYEN, N.; SOUCAILLE, P. Trends in Systems Biology for the Analysis and Engineering of *Clostridium acetobutylicum* Metabolism. **Trends in Microbiology**, p. 1–23, 2019.

ZAGRODNIK, R.; DUBER, A.; SEIFERT, K. Dark-fermentative hydrogen production from synthetic lignocellulose hydrolysate by a mixed bacterial culture : The relationship between hydraulic retention time and pH conditions. **Bioresource Technology**, v. 358, n. March, p. 127309, 2022.

ZHANG, B. *et al.* Glycerol production through TPI1 defective *Kluyveromyces marxianus* at high temperature with glucose, fructose, and xylose as feedstock. **Biochemical Engineering Journal**, v. 161, n. April, p. 107689, 2020.

ZHANG, Z. *et al.* Degradation and transformation of extracellular polymeric substances (EPS) and dissolved organic matters (DOM) during two-stage anaerobic digestion with waste sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 15, p. 9619–9629, 2017.

ZHAO, Y. *et al.* Effects of different headspace gas compositions and partial pressures on productivity of H₂ and liquid fermentation products during the fermentation of food wastewater. **Fuel**, v. 329, 1 dez. 2022.

ZHENG, Y. *et al.* Quantitative analysis of hydrogen and fatty acid from homoacetogenesis and optimization of glycerol fermentation condition. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 48, n. 11, p. 4182–4192, 2023.

ANEXOS

Produção Bibliográfica/Patentária no período Fevereiro 2021 – Outubro 2025



23/06/2025

870250052458

15:31



29409162339397231

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2025 012933 7

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 3

Nome ou Razão Social: PETROGAL BRASIL LTDA.

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 03571723000139

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Pessoa Jurídica

Endereço: Av. Governador Agamenon Magalhães, n. 4775, 17º andar, Ilha do Leite

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50070-160

País: Brasil

Telefone:

Fax:

Email: lssp@eagv.com.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 23/06/2025 às 15:31, Petição 870250052458

Depositante 2 de 3

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 33663683000116

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Pedro Calmon, 550 – Cidade Universitária

Cidade: Rio de Janeiro

Estado: RJ

CEP: 21941-901

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Depositante 3 de 3

Nome ou Razão Social: INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA (INT)

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 01263898000407

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Pessoa Jurídica

Endereço: Av. Venezuela, 82 - Saúde

Cidade: Rio de Janeiro

Estado: RJ

CEP: 20081-312

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em
23/06/2025 às 15:31, Petição 870250052458

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROCESSO DE AUTÓLISE DE LODO ANAERÓBIO, SUPLEMENTO E USO.

Resumo: A presente invenção refere-se a um processo de obtenção de suplemento nutricional a partir de lodo anaeróbio, por meio de autólise e/ou hidrólise térmica, sem necessidade de aditivos químicos, ajuste de pH ou pressurização. O processo permite a liberação de compostos nitrogenados, sendo o suplemento obtido aplicado em processos fermentativos anaeróbios, preferencialmente na produção de hidrogênio. A invenção também contempla o suplemento em si e seu uso como fonte de nitrogênio em fermentações.

Figura a publicar: 6

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: Luis Fernando Ribeiro Matos Júnior

Numero OAB: 088406RJ

Numero API: 720

CPF/CNPJ: 01478316799

Endereço: Rua da Assembléia, 35- 6º andar - Centro

Cidade: Rio de Janeiro

Estado: RJ

CEP: 20011-001

Telefone: (21) 38611250

Fax: (21) 38611251

Email: mail@matos.com.br

Escritório:

Nome ou Razão Social: Matos & Associados - Advogados

CPF/CNPJ: 35813153000132

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 23/06/2025 às 15:31, Petição 870250052458

Nome: MARINA CRISTINA TOMASINI

CPF: 36698249874

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Av. Paulo de Frontin, 160 – apto 301 - Praça da Bandeira

Cidade: Rio de Janeiro

Estado: RJ

CEP: 20260-011

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 8 de 12

Nome: EDUARDO DE OLIVEIRA JÚNIOR

CPF: 02834397007

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Engenheiro, arquiteto e afins

Endereço: Rua Pains, 104, Apartamento 101 - Guadalupe

Cidade: Rio de Janeiro

Estado: RJ

CEP: 21660-160

País: BRASIL

Telefone:

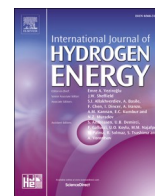
Fax:

Email:

Inventor 9 de 12

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em
23/06/2025 às 15:31, Petição 870250052458



Unlocking bioenergy potential: Hydrogen production applying vinasse and straw hemicellulose hydrolysate from the sugarcane-ethanol industry

Marina Tomasini^{a,b}, Mariana Oliveira Faber^{a,b}, Viridiana Santana Ferreira-Leitão (Viridiana)^{a,b,*}

^a Laboratório de Biocatálise, Bioprocessos e Bioprodutos, Instituto Nacional de Tecnologia (INT), Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTIC), Divisão de Catálise, Biocatálise e Processos Químicos, CEP, 20081-312, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Departamento de Bioquímica, CEP, 21941-909, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Vinasse
Wastewater
Straw
Pentoses
Hydrolysed
Co-fermentation

ABSTRACT

This study evaluated hydrogen (H₂) production via dark fermentation using sugarcane vinasse and hemicellulose hydrolysate (HH). Vinasse, rich in organic matter and micronutrients but recalcitrant, yielded low H₂ when used alone. The most suitable conditions for H₂ production were 50 °C and pH 5.5. Using sealed reactors without pressure release, fermentation of vinasse (15 g_{COD}/L) produced 97.17 NmL/L of H₂, which was 71 % higher than at pH 6.5 and 81 % higher than at 35 °C. In pressure-controlled reactors (≤0.6 bar), H₂ production using vinasse (25 g_{COD}/L) increased from 189.24 to 245.86 NmL/L. Co-fermentation of vinasse and HH boosted H₂ production by 58 % compared with vinasse mono-fermentation using pressure-controlled reactors and improved substrate consumption (up to 92 %). A balanced C/N ratio and appropriate carbohydrate concentration favored the butyric and acetic acid pathways, enhancing H₂ production while minimizing propionic acid accumulation. Vinasse and HH integration enhances H₂ recovery and valorizes sugarcane residues.

List of abbreviations

Hemicellulose hydrolysate	HH
Carbon to nitrogen ratio	C/N ratio
Chemical oxygen demand	COD
Chemical oxygen demand in the supernatant of raw materials or fermentation and anaerobic digestion medium	sCOD
Volatile fatty acids	VFA
Volatile suspended solids	VSS
Total suspended solids	TSS
Assay in a sealed reactor using hemicellulose hydrolysate (1 g/L)	pHH1
Assay in a sealed reactor using hemicellulose hydrolysate (5 g/L)	pHH5
Assay using hemicellulose hydrolysate in a sealed reactor (10 g/L)	pHH10
Assay with gas release using hemicellulose hydrolysate (10 g/L)	HH10
Assay with gas release using hemicellulose hydrolysate (20 g/L)	HH20
Assay using vinasse	VI pVI
Assay in a sealed reactor using vinasse	
Assay with gas release using vinasse	VI1
Co-fermentation of hemicellulose hydrolysate and vinasse	VH
Anaerobic digestion	AD
Two-stage anaerobic digestion	TS-AD

(continued on next column)

(continued)

5-hydroxymethyl-2-furaldehyde	HMF
Free amino nitrogen	FAN
Standard deviation	SD

1. Introduction

The sustainable management and utilization of agricultural residues have become increasingly important for addressing environmental concerns and enhancing resource exploitation efficiency. The large-scale production of sugarcane, particularly in countries like Brazil, generates substantial quantities of bagasse, straw, and vinasse, presenting both opportunities and challenges for their proper management [1]. Brazil is the world's largest producer of sugarcane [2]. The 2024/25 harvest is estimated to be 685 million tons, corresponding to the generation of 107 million tons of straw, related to the harvest and processing of sugar and ethanol, and 396 billion liters of vinasse related to ethanol distillation [3].

* Corresponding author. Laboratório de Biocatálise, Bioprocessos e Bioprodutos, Instituto Nacional de Tecnologia (INT), Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTIC), Divisão de Catálise, Biocatálise e Processos Químicos, CEP, 20081-312, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

E-mail addresses: viridiana.leitao@int.gov.br, vsfleitao@gmail.com (V.S. Ferreira-Leitão).

<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2025.152411>

Received 17 July 2025; Received in revised form 23 October 2025; Accepted 3 November 2025

Available online 8 November 2025

0360-3199/© 2025 Hydrogen Energy Publications LLC. Published by Elsevier Ltd. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

Vinasse is currently applied to fertigate agricultural crops associated with ethanol production. However, its continuous and excessive use can cause significant environmental impacts due to its high salt content and organic load. Despite these concerns, vinasse also presents an opportunity for additional uses. Its concentrations of residual sugars, proteins, and organic acids, along with essential minerals, such as nitrogen, phosphorus, and potassium, make it a valuable source of carbon and nutrients for anaerobic microorganisms. This composition supports its use as a substrate for hydrogen production [1,4,5].

Along with vinasse, sugarcane straw is an abundant by-product of the sugar and ethanol industries, mainly composed of lignocellulosic biomass and often left in the field or used as a low-value resource [6]. Hemicellulose constitutes approximately 20–30 % of the dry weight of sugarcane straw, a complex polysaccharide of pentose and hexose sugars with diverse applications in biorefineries [1,7]. Unlike cellulose, which forms strong structures, hemicellulose is easily hydrolysed, making it an ideal candidate for bioconversion processes [8,9]. In biorefineries, hemicellulose converted into sugar monomers by diluted acid pretreatment can be a precursor to produce biofuels and bioenergy, such as H_2 by dark fermentation.

Hydrogen, often considered a clean fuel due to its high energy content and zero carbon emissions upon combustion, plays a crucial role in the transition towards a low-carbon economy [10]. Countries with substantial sugarcane industries, like Brazil, can support both energy diversification and environmental sustainability by adopting H_2 production from their wastes. Economically, the use of agricultural waste for energy production can create new revenue streams for the agricultural and energy sectors, reducing costs associated with waste disposal while generating clean energy. In addition, sugarcane wastes could play a significant role in achieving national energy targets and reducing carbon footprints. In biological production through dark fermentation, bacteria convert organic substrates into H_2 , volatile fatty acids, and carbon dioxide. Several types of inoculum can be used in the dark fermentation process, including anaerobic sludge from a sewage treatment plant, which contains a mixed microbial population. As that population has both H_2 -producers and H_2 -consumers, it is necessary to treat the microbial consortium to suppress hydrogen-consuming archaea, which facilitates H_2 accumulation in the reactor [11]. The efficiency of the dark fermentation process can be limited by factors such as type of substrate and initial concentration, temperature, pH, and hydrogen partial pressure inhibition [12].

Fermentation using sugar-rich materials often yields higher H_2 production compared to protein or fatty acid-rich materials. This is attributed to the higher accessibility of carbohydrate-based substrates for microorganisms and the predominance of the acetate–butyrate pathway, which yields 4 and 2 mol H_2 per mol of glucose, respectively. In contrast, protein- or fatty acid-rich feedstocks lead to propionate as a metabolic product, which is generally not associated with H_2 formation [13,14]. The propionate pathway is undesired because it lowers pH and reduces H_2 yields [15–17]. Maintaining a stable pH is critical, as excessive substrate loading can lead to acid accumulation that inhibits microbial activity and H_2 production [18–20]. In sealed reactors, high substrate concentrations can also stimulate homoacetogenic bacteria to consume the produced H_2 . Pressure release can mitigate the adverse effects of H_2 partial pressure [12,21–23]. Furthermore, co-fermentation with buffering substrates is a crucial strategy for stabilizing pH, alleviating inhibition, and optimizing the carbon-to-nitrogen ratio, thereby improving H_2 production efficiency [17,23].

The optimization of these conditions is essential to maximize H_2 yield and improve the overall efficiency of biohydrogen production systems. This study explores biochemical limitations by substrate concentrations (glucose, xylose, and arabinose), H_2 partial pressure, and strategies to alleviate such inhibitory effects for enhancing the H_2 production. Additionally, co-fermentation experiments were carried out mainly to verify vinasse digestibility by microorganisms and the balance of nutrients (C/N ratio), since it is a recalcitrant effluent.

2. Methods

2.1. Characterization of raw materials

Vinasse and sugarcane straw were collected from a sugar and ethanol mill located in the state of São Paulo, Brasil. The vinasse was collected during the 2021/22 harvest season and stored at 4 °C, while the straw was kept at room temperature.

The sugarcane straw was characterized according to the standard methodology “Determination of Extractives in Biomass” and “Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass” [24,25], in which 39 % of lignocellulose material corresponds to cellulose, 28 % hemicellulose, 19 % lignin, 5 % ashes, and 9 % extractives.

The raw straw was pretreated with diluted acid (H_2SO_4 1.6 % m/m) as described in previous work [26,27]. Hemicellulose hydrolysate (HH) were analyzed according to the protocol for sugars and by-products [28]. Carbohydrates from raw vinasse was analyzed following for reducing sugars methodology, as described by Ref. [29], and vinasse was also hydrolysed following the methodology described by Ref. [25] to release conjugated carbohydrates, which were then analyzed by Ref. [29]. Chemical oxygen demand (COD), pH, and suspended solids were analyzed according to the Standard Methods for Examination [30]. The element content (C, H, N) was measured by an elemental analyzer (LECO CHN 628), and sample readings were performed according to the procedure described in ASTM D5291:2016. Phosphorus was quantified using Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES).

2.2. Inoculum

Activated anaerobic sludge collected from a UASB reactor at a municipal sewage treatment plant (Rio de Janeiro, RJ, Brazil) was used as inoculum for all experiments conducted in this work. The anaerobic sludge contained approximately 20,000 mg/L of volatile suspended solids (VSS), 11,173 mg/L of fixed suspended solids (FSS), 31,031 mg/L of total suspended solids (TSS), pH 7.39, and 1156 mg/L of chemical oxygen demand (COD) [30]. Aiming at hydrogen (H_2) production, the anaerobic sludge was heat-treated at 65 °C for 30 min to inhibit methanogenic archaea and other non-spore-forming organisms. Accordingly, the heat-treated sludge was employed in the fermentations at an adjusted concentration of 10,000 mg_{VSS}/L. The heat-treated sludge characterization, analyzed according to the methods described by Ref. [30], showed 10,333 mg/L of VSS, 10,050 mg/L of FSS, 20,317 mg/L of TSS, pH 7.34, and 1268 mg/L of COD.

2.3. Hydrogen production

Two experimental systems were used to evaluate the dark fermentation process. Figure illustrating the systems is available in the supplementary material.

2.3.1. Dark fermentation in sealed flasks

The batch experiments were performed in 100 mL flasks sealed with rubber lids to prevent air contact, without valves for pressure release. Pressure was measured exclusively at the end of each fermentation period using a mobile pressure gauge. The working volume was 45 mL, composed of thermally treated anaerobic sludge with VSS at a concentration of 10,000 mg/L and the raw material. All flasks were purged with N_2 for 1 min to ensure an anaerobic environment, and agitation was maintained at 160 rpm. Vinasse fermentation was conducted at 35 and 50 °C for 72 h, at two different pH levels (5.5 and 6.5), using 15 and 25 g_{COD}/L. An additional experiment with centrifuged vinasse was done to assess the effect of particulates in the effluent on the fermentation process. For HH fermentation, three initial concentrations of carbohydrates were tested for H_2 production (pHH1 = 1 g/L, pHH5 = 5 g/L, and pHH10 = 10 g/L) under a thermophilic condition (50 °C) at pH 5.5 for

72 h in order to observe the biochemical behavior of the process. Prior to its use as a raw material for H₂ production, the pH of HH was adjusted to 5 by adding NaOH at 10 mol/L. Metabolic patterns were evaluated based on substrate consumption, volatile fatty acids (VFAs) production, H₂ production and yield, and inhibitory effects caused by H₂ partial pressure.

2.3.2. Dark fermentation in manometric reactors

Reactors with a 300 mL capacity, equipped with manometer and a gas release valve, were operated in batch mode with a working volume of 135 mL. Pressure was monitored throughout the experiment using the reactor manometer to ensure it did not exceed 0.6 bar, preventing over-pressurization and allowing controlled gas release when necessary. Thermally treated anaerobic sludge (10,000 mg_{VSS}/L) was used in these assays, with triplicate samples monitored for each condition. All flasks were purged with N₂ for 1 min to ensure an anaerobic environment. The medium pH was adjusted to 5.5 by adding NaOH at 10 mol/L, and agitation was maintained at 160 rpm. The assays were conducted at 50 °C for 72 h in order to observe the biochemical behavior of the process. For fermentation assays, vinasse or HH was used at concentrations: V11 (25 g_{COD}/L of vinasse), HH10 (HH with 10 g/L of carbohydrates), and HH20 (HH with 20 g/L of carbohydrates). The co-fermentation assays using vinasse and HH were performed with different VI:HH ratios, designated as VH1, VH2, and VH3, as shown in Table 1.

2.4. Biogas quantification and calculations

The pressure of the sealed reactor was measured exclusively at the end of the incubation period, using a manometer. For the manometric reactors equipped with a valve, the pressure was continuously monitored throughout the experiment using a manometer attached to the reactor (supplementary material). The normalized gas volume was calculated using the isothermal expansion equation and the principle of internal energy conservation for ideal gases, as described in Equation (1). In this equation, P_{atm} represents atmospheric pressure, P_{man} denotes manometric pressure, V_{HS} corresponds to the headspace volume, and V_{biogas} refers to the volume of biogas (H₂, CO₂, or CH₄) at atmospheric pressure.

$$(P_{atm} + P_{man}) * V_{HS} = P_{atm} * V_{biogas} \quad (\text{Eq. 1})$$

H₂ yield (NmL/g_{COD}) (Y) was calculated using Equation (2) through the ratio between V_{H2} and the initial organic matter, considering experimental values.

$$Y_{H2} = \frac{V_{HS}}{COD} \quad (\text{Eq. 2})$$

The modified Gompertz equation (Equation (3)) was employed to

Table 2

Characterization of raw sugarcane vinasse used as raw material in this study.

Parameter	Media	SD		
COD ^a total	g/L	37.70	±	1.70
COD soluble	g/L	23.20	±	0.70
TSS ^b	g/L	13.67	±	0.70
VSS ^c	g/L	12.82	±	0.54
Acetic acid	g/L	1.53	±	0.08
Lactic acid	g/L	2.48	±	0.21
Propionic acid	g/L	2.48	±	0.09
Soluble Carbohydrates	g/L	1.55	±	0.01
Carbohydrates after hydrolysis ^d	g/L	3.78	±	0.23
Glycerol	g/L	1.35	±	0.40
Ethanol	g/L	0.79	±	0.07
Nitrogen	% (m/m)	0.48	±	0.02
Carbon	% (m/m)	11.38	±	0.25
Hydrogen	% (m/m)	11.31	±	1.00
Phosphorus	mg/kg	55.76	±	2.94
PH		4.45		
C/N		24		

^a COD:Chemical oxygen demand.

^b TSS:Total suspended solids.

^c VSS:Volatile suspended solids.

^d Quantification was performed after raw vinasse was subjected to acid hydrolysis following the Sluiter et al. [25] protocol. The values are the mean and standard deviation (SD) of the analysis of three samples (n = 3) from raw vinasse.

estimate kinetic parameters of H₂ production [31].

$$H(t) = H_{max} \exp \left[-\exp \left[\frac{R_{max} \exp (\lambda_0 - t) + 1}{H_{max}} \right] \right] \quad (\text{Eq. 3})$$

H is specific H₂ production (NmL/L); H_{max} is the maximum accumulated specific H₂ volume (NmL/L); R_{max} is maximum H₂ rate production (NmL/(L.h)); t is the incubation time (h); λ is the adaptive phase (h); and exp is Euler's constant (2.71828).

2.5. Analytical methods

The analysis of carbohydrates in dark fermentation using vinasse was performed by measuring reducing sugars, following the method described by Ref. [32]. The hydrolysate from acid pretreatment and the effluent from H₂ production were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC Shimadzu LC 10 AT). The liquid assays applying HH and the co-fermentation of vinasse with HH were analyzed to determine xylose, glucose, arabinose, ethanol, acids, HMF, and furfural, following the methodology described by Ref. [27]. Free amino nitrogen concentration was assayed by the ninhydrin colorimetric method [33]. H₂, CH₄, and CO₂ concentrations were analyzed using a gas

Table 1

Media composition of co-fermentation in manometric reactors using sugarcane vinasse and hemicellulose hydrolysate (HH).

System	VH1		VH2			VH3		
CODt Vinasse (g/L) ^a	25		10			7		
CODt HH (g/L) ^a	2		7			7		
CODt of VH (g/L) ^a	27		17			14		
sCOD (g/L) ^b	18.78	±	12.85	±	0.62	9.17	±	0.49
Vinasse:HH ratio ^c	12.5:1		1.43:1			1:1		
Carbon (%) (w/w)	4.302		1.232			0.783		
Nitrogen (%) (w/w)	0.182		0.034			0.015		
C/N	24		36			52		
FAN (mg/L) ^d	652.70	±	513.00	±	7.63	391.80	±	10.50
Carbohydrates (g/L)	2.89	±	4.69	±	0.02	5.04	±	0.45

VH: mixture of vinasse and hydrolysate; CODt: Total chemical oxygen demand.

^a The amount of CODt was determined based on COD of the results obtained from the characterization of raw materials, as presented in Tables 2 and 3.

^b sCOD: soluble COD in the supernatant obtained after mixing two raw materials and measured experimentally.

^c The ratio was calculated based on CODt of HH and CODt of vinasse.

^d FAN: Free amino nitrogen.

Table 3

Characterization of the hemicellulose hydrolysate obtained by the diluted acid pretreatment of raw sugarcane straw.

Parameter		Media		SD
COD ^a total	g/L	64.05	±	1.17
Glucose	g/L	2.63	±	0.05
Xylose	g/L	35.42	±	0.20
Arabinose	g/L	6.03	±	0.23
Acetic Acid	g/L	5.60	±	0.14
HMF ^d	g/L	n.d.	±	n.d.
Furfural	g/L	n.d.	±	n.d.
Carbon	% (m/m)	41.67	±	0.76
Nitrogen	% (m/m)	0.36	±	0.03
Hydrogen	% (m/m)	10.69	±	0.18
Nitrogen	% (m/m)	0.36	±	0.03
Phosphorus	mg/kg	48.94	±	0.95
PH	–	1.15		
C/N	–	116		

^a COD:Chemical oxygen demand.

^b TSS:Total suspended solids.

^c VSS:Volatile suspended solids.

^d HMF: 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde. The values are the mean and standard deviation (SD) of the analysis of three samples (n = 3) from hemicellulose hydrolysate.

chromatograph, model AGILENT 7890B, equipped with PORA PLOT Q column (27.5 m × 0.53 mm × 0.70 μm). The injector temperature was set at 180 °C, the thermal conductivity detector at 220 °C, the valve temperature at 200 °C, and the oven at 40 °C, with nitrogen as the carrier gas.

3. Results and discussion

3.1. Physical and chemical characterization of the raw materials

Sugarcane vinasse is widely studied as a feedstock for H₂ and CH₄ production by dark fermentation, and extensive detail is available on the compositional characteristics of sugarcane vinasse [34–37]. However, the variability in composition is expected, as prior characterization is necessary before use as a substrate source. Table 2 shows the main parameters quantified. The soluble carbohydrates (1.55 ± 0.01 g/L) and the sugars quantified after acid hydrolysis (3.78 ± 0.23 g/L) consist of residual sugars that have not been converted to ethanol (Table 2). The hydrolysis of raw vinasse revealed that 41 % of the carbohydrates are oligosaccharides or conjugated with other molecules, as shown in Table 2. In addition to monosaccharides, vinasse contains several carbohydrates [38], such as melanoidins, which are dark-colored recalcitrant compounds formed during the Maillard reaction in heat-treated wastewaters with a composition of sugars and amino acids, such as sugarcane vinasse [39]. To simplify the discussion on sugar consumption and the calculation of H₂ yield, glucose was assumed to be the standard sugar.

Glycerol (1.35 ± 0.04 g/L) is formed as a by-product of yeast metabolism during ethanol production under osmotic stress, frequently present in vinasse. Lactic acid (2.48 ± 0.21 g/L) is produced by bacterial contamination during yeast fermentation in ethanol production, especially by lactic acid bacteria [40–42]. These substrates are the main soluble organic compounds quantified before dark fermentation. Acetic acid (1.53 ± 0.08 g/L) and propionic acid (2.48 ± 0.09 g/L) are products from bacterial contamination in the alcohol fermentation process [4]. Unidentified compounds such as proteins, melanoidins, phenolic compounds, and by-products of microbial metabolism [4,39,43] are also present and correspond to 70 % of the CODt (supplementary material).

Vinasse has a high content of inorganic components, mainly phosphorous, which is important for H₂ production due to its nutritional value and buffering capacity [44]. The carbon to nitrogen ratio (C/N) of 24 represents low levels of nitrogen (0.48 ± 0.02 %) and carbon (11.38

± 0.25 %). Some unbalanced nutritional aspects, including the C/N ratio, must be adjusted for a satisfactory H₂ production rate [45,46].

Hemicellulose acid hydrolysate characterization showed similar nitrogen content (0.36 ± 0.03 %) compared to vinasse (Table 3). Thus, the C/N ratio of the hydrolysate of 116 represents a carbohydrate- and carbon-rich material suitable for co-digestion with vinasse. HH from sugarcane straw is mainly composed of monosaccharides, such as xylose (35.72 ± 0.20 g/L), arabinose (6.07 ± 0.23 g/L), and glucose (2.63 ± 0.05 g/L), representing approximately 42 % of the carbon fraction of HH.

Acetic acid (5.60 ± 0.14 g/L) was released during the hydrolysis reaction of hydronium ions (H₃O⁺) from the dissociation of sulfuric acid with the acetyl groups of glucuronoarabinoxylan [47,48]. The hydrolysate used for H₂ and CH₄ production did not require a prior detoxification step for fermentation and anaerobic digestion, as no furanic compounds were measured. In this study, approximately 88 % of the COD in the hemicellulose hydrolysate was quantified using our analytical method [28], which means that 12 % was not considered in the analysis (data in supplementary material) and the HH may be a suitable feedstock for use as a single or co-substrate source for H₂ and CH₄ production, with potential competition for ethanol production.

3.2. Hydrogen production from vinasse

3.2.1. Comparative mesophilic and thermophilic fermentations at different pH for the H₂ production using vinasse

The influence of temperature and pH on H₂ production using vinasse was investigated under mesophilic (35 °C) and thermophilic (50 °C) conditions at pH 5.5 and 6.5 (Table 4). In addition, a comparative assay was performed with the supernatant of vinasse after centrifugation to evaluate the effects of particles from the vinasse on the fermentation. Maximum H₂ production was achieved in 24 h under thermophilic conditions and a pH of 5.5 (97.17 NmL/L), 81 % higher than in mesophilic fermentation (53.49 NmL/L) and 71 % higher compared with fermentation at 50 °C and at pH 6.5 (56.82 NmL/L) in the same period. Hydrogen production was not observed during the fermentation of vinasse under mesophilic conditions at an initial pH of 6.5.

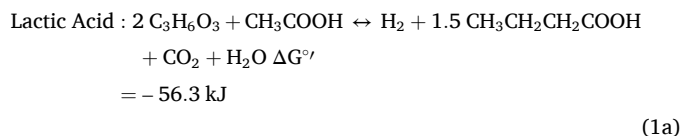
Several studies have demonstrated that thermophilic fermentation improves H₂ production rates due to the lower solubility of H₂ in liquid at higher temperatures [46,49–51]. In addition, thermophilic bacteria may be more promising than mesophilic bacteria in dark fermentation [44]. Sewage sludge often contains heat-resistant microbial species that produce H₂, such as *Thermoanaerobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Acinetobacter* spp., *Eubacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Eutercoccus* spp., *Tissierella* spp., *Bacteroides* spp., and *Streptococcus* spp. [52]. The combination of thermophilic fermentation with the inherent presence of heat-resistant H₂-producing microbial species in sewage sludge is a better approach for the dark fermentation of vinasse. Toledo-Cervantes and coworkers [51] also reported that fermentation of vinasse under thermophilic conditions yielded better performance in H₂ production. Their study showed that the yield increased by 16 % in thermophilic fermentation compared to mesophilic fermentation using tequila vinasse, and the main metabolic pathways involved were lactate and formate degradation.

At pH 5.5, both mesophilic and thermophilic fermentation processes mainly used lactic acid as the carbon source, which was converted into H₂ and soluble metabolites such as butyric acid by *Clostridium propionicum*, *Coprococcus catus*, *Clostridium homopropionicum*, *Megasphaera elsdenii*, and *Prevotella ruminicola* (reaction 1) [17,53,54]. Carbohydrates are typically the main carbon source for endospore-forming bacteria, including *Clostridium* spp. and *Bacillus* spp., which are representative microorganisms involved in the aceto-butyrac pathway during dark fermentation (reactions 2 and 3) [55,56]. However, the results obtained in this study using vinasse deviated from this pattern, as sugars were not the first compounds to be metabolized by the bacterial community.

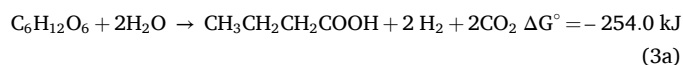
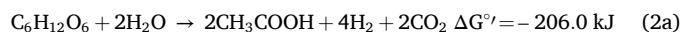
Table 4
Accumulated hydrogen after 24 h of vinasse (15 g_{con}/L) fermentation performed in sealed reactors without pressure relief, and final medium composition. The internal pressure did not exceed 0.6 bar. The systems started with average initial concentrations of 0.36 ± 0.05 g/L of carbohydrates, 0.51 ± 0.05 g/L of lactic acid, 0.58 ± 0.05 g/L of acetic acid, and 0.46 ± 0.02 g/L of propionic acid. The maximum H₂ production was obtained in the system designated pVI.

Feedstock	T (°C)	pH	CODs (g _{ox} /L)	H ₂ (NmL/L)	CO ₂ (NmL/L)	Carbohydrates (g/L)	Lactic Acid (g/L)	Acetic acid (g/L)	Butyric acid (g/L)	Propionic acid (g/L)
Raw Vinasse	35	5.5	9.54	53.49	6.81	157.96	± 23.33	0.04	0.05	± 0
Raw Vinasse	35	6.5	11.31	± 0.26	± 0	151.37	± 0.97	0.02	0.01	± 0
Raw Vinasse (pVI)	50	5.5	11.00	± 1.71	± 3.33	334.10	± 18.57	0.47	0.10	± 0
Raw Vinasse	50	6.5	11.31	± 0.58	± 10.11	233.93	± 25.97	0.09	0.13	± 0
Supernatant of vinasse	50	5.5	9.53	± 1.71	± 9.40	423.26	± 14.54	0.01	0.27	± 0

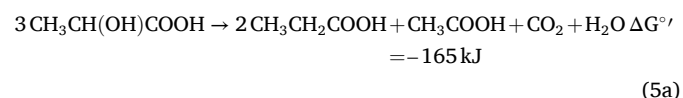
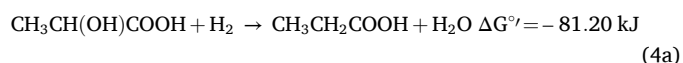
Among the media tested, only the one containing the supernatant of the vinasse fermentation effectively used carbohydrates as the primary carbon source, producing 79.31 ± 9.40 NmL/L of H₂. Although Table 4 presents only the results at 24 h, the assays were conducted over 72 h, and this was the only condition in which complete carbohydrate consumption (0.39 ± 0.04 g/L) was achieved, occurring within 48 h (data not shown). These results indicate that the compounds present in the suspended solids of the vinasse probably inhibit sugar uptake by microorganisms. Comparato and co-workers [39] showed that melanoidins negatively affect dark fermentation by reducing the availability and consumption of free carbohydrates. Although we did not quantify melanoidins, this explanation could support the phenomenon observed in our study. This suggests that the carbohydrates were used for microbial growth rather than fermentative gas production.



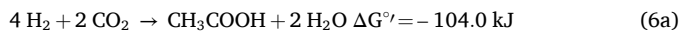
Hexoses:



Thus, the conversion of lactate and acetate to butyrate has been identified as the primary metabolic pathway responsible for H₂ production from vinasse in thermophilic batch processes [51] (reaction 1), which was also confirmed in this study (Table 4). At the end of fermentation at pH 6.5, the propionic acid concentration (1.60 ± 0.45 g/L) was 66 % higher than that measured at pH 5.5 (pVI) (0.86 ± 0.08 g/L). Propionate formation, which can occur via lactate fermentation (reactions 4 and 5), is associated with *Clostridium* ssp. metabolism, represents the least favorable fermentation pathway [16,17]. This unfavorable outcome occurs because lactic acid can be converted either together with H₂ to form propionic acid (reaction 4) or converted into both acetate and propionic acid (reaction 5).



In this context of acid production, under all tested conditions — initial pH values of 5.5 and 6.5 at 35 °C and 50 °C — homoacetogenic activity was observed, characterized by the production of acetate from H₂ and CO₂ (reaction 6) through the Wood–Ljungdahl pathway [57]. Representative microorganisms of this reaction include species of the *Clostridium* genus, such as *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, and *Clostridium carboxidivorans* [23,58]. These fermentations were conducted in sealed reactors without pressure release, resulting in an increased partial pressure of H₂ in the system. This condition facilitated the reabsorption of H₂ into the liquid phase due to limitations in mass transfer between the liquid and gas phases. [59,60]. The resulting H₂ accumulation induced shifts in metabolic pathways, favoring its consumption for acetate and ethanol synthesis [61]. In batch and fed-batch reactors, homoacetogenic microorganisms can consume between 11 % and 43 % of the H₂ generated, respectively [62]. Strategies to improve H₂ production rates and yields in fermentative processes are still under investigation, with an emphasis on addressing challenges posed by homoacetogenesis, including kinetic and thermodynamic limitations, as well as efficient gas removal from the reactor headspace [63].



Acetate accumulation (up to 1 g/L), along with increasing concentrations of other organic acids (acetic, butyric, and propionic acids), can lead to cell damage [64]. At pH 5.5, a greater fraction of acetic (pKa 4.75), butyric (pKa 4.80) and propionic (pKa 4.88) acids are un-dissociated and can diffuse into the cells, where intracellular dissociation occurs. This process leads to proton accumulation within the cytoplasm, inducing intracellular acidification that can activate enzymes involved in solventogenesis, a metabolic pathway that competes with H_2 production [61,64,65]. Additionally, the resulting anions increase cytoplasmic osmolarity, elevate turgor pressure against the cell wall, and induce cellular stress. Proton transport to the extracellular medium, as a defense mechanism, further reduces intracellular ATP availability, thereby impacting microbial metabolism [28,64,66,67].

Although an initial pH of 5.5 showed better results than 6.5, H_2 production remained low under this condition.

In contrast, during fermentation at pH 6.5, acetic, butyric, and propionic acids are predominantly present in their dissociated forms. To maintain intracellular pH homeostasis, microorganisms must offset the influx of protons generated by acid dissociation. This process requires metabolic energy, as ATP is utilized to actively export H^+ ions across the cell membrane, consequently reducing microbial growth rates. The effects of organic acid accumulation on cell integrity have been widely reported in the literature [15,68], and similar effects were also observed in the present study, since under this condition (pH 6.5), low or unquantifiable H_2 (Table 4).

In addition, at pH above 6, sulfate-reducing bacteria (SRB) use H_2 from acidogenesis as an electron donor to reduce sulfate to sulfide [69, 70]. This is particularly relevant in the treatment of vinasse, which

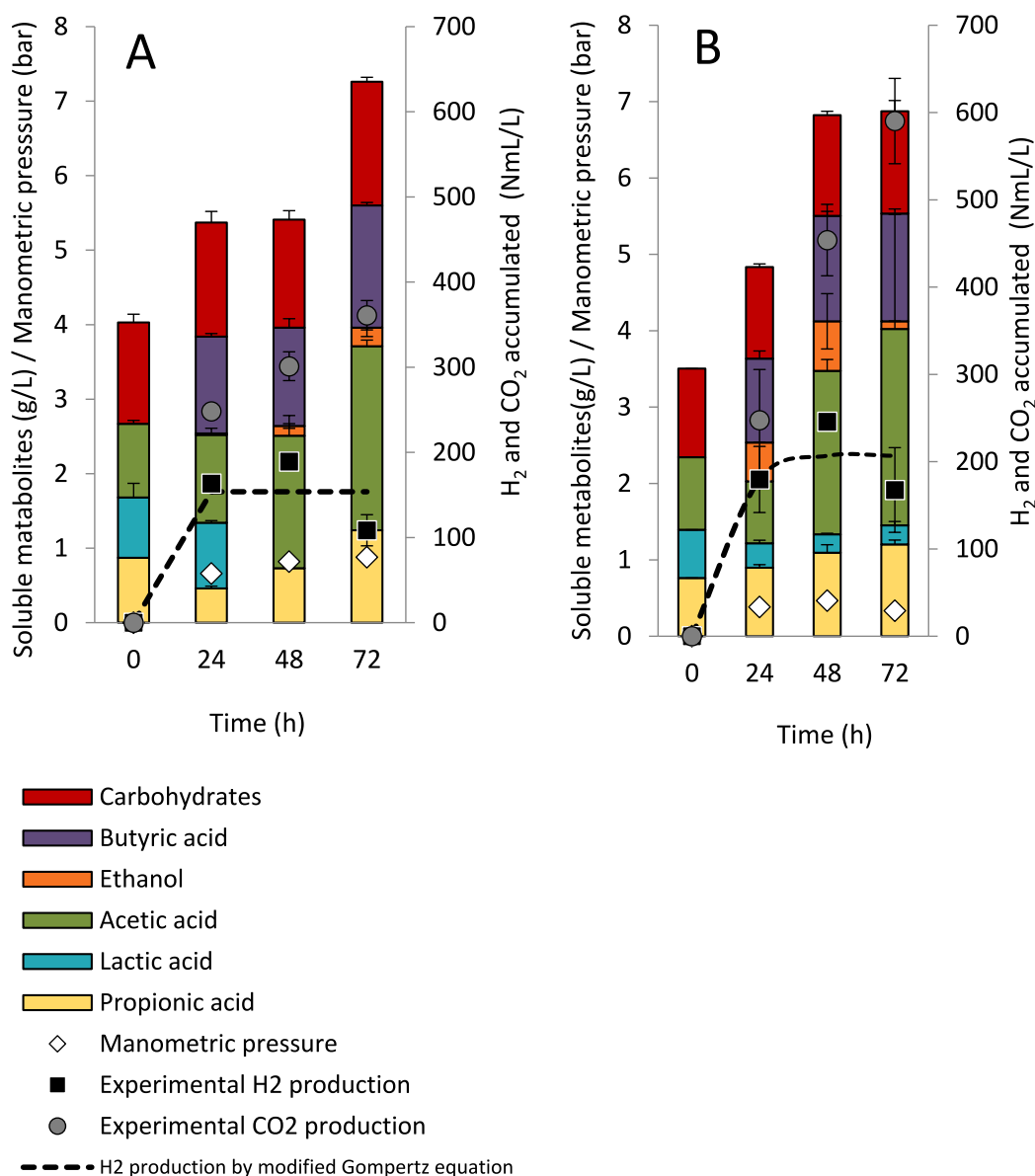


Fig. 1. Hydrogen production from vinasse (25 g_{COD}/L) at 50 °C and pH 5.5 using two types of reactors: (A) sealed reactor (pressure was measured exclusively at the end of each hour incubation, and (B) VII – manometric reactor (pressure evaluated during the fermentation). The concentration of substrate and main metabolite are presented in bars, while experimental H_2 and CO_2 production, in specific volume, are represented by markers, as well as the internal pressure of the system. Estimated parameters by modeling the experimental data of H_2 production by the Gompertz equation: (A) 153.76 NmL/L (Hmax), 132.87 NmL/L.h (Rm), 15 h (λ), 0.84 (R^2); (B) 203.74 NmL/L (Hmax), 37.92 NmL/L.h (Rm), 18 h (λ), 0.91 (R^2).

contains high concentrations of sulfate due to the use of sulfuric acid in ethanol mills to control microbial contamination [37,71,72]. Hydrogen production occurring alongside sulfidogenesis suggests that sulfidogenic pathways can be integrated with H₂ generation as a preparatory step for methanogenesis, since represent a strategic ‘cleaning’ step to remove sulfate before methanogenesis [36], providing potential for sequential H₂ and CH₄ production in integrated biotechnological processes.

Therefore, pH is a crucial factor influencing hydrogenases activity and metabolic pathways [73]. Although hydrogenase activity was not quantified in this work, previous studies have reported the stability of hydrogenase activity within a pH range of 5.0–6.5 [19]. It can significantly influence microbial activity by altering intracellular ion transport, substrate degradation efficiency, growth dynamics of different microbial groups, and the overall metabolite profile during dark fermentation [19,23]. Among the systems investigated, dark fermentation at a pH of 5.5 and 50 °C was the most favorable for H₂ production, and had the highest H₂ value (Table 4). Nevertheless, overall H₂ production remained limited, mainly due to operation in sealed reactors. The implementation of a controlled pressure release could improve the H₂ production profile and use higher initial COD concentrations, which would improve process efficiency and scalability.

3.2.2. Effects of increased COD concentration and pressure-release reactor configuration

Since the thermophilic condition at pH 5.5 (pVI) favored the production of H₂, a new batch was conducted under these conditions, but using a higher initial concentration of organic matter from vinasse. Fig. 1A shows the profile of the dark fermentation with vinasse at 25 g_{COD}/L in a sealed reactor (Fig. 1A) and using a manometric reactor (Fig. 1B – VII).

In sealed reactor, the medium was composed with two-times more lactic acid (0.81 ± 0.12 g/L) and 1.7-fold more carbohydrates (0.66 ± 0.02 g/L) than the assay using 15 g_{COD}/L (pVI – Table 4), providing more substrates for microbial growth and gas production (Fig. 1A). The H₂ production in 24 h was 68 % higher (163.53 ± 2.62 NmL/L) than the condition using 15 g_{COD}/L (pVI), and the maximum was achieved in 48 h, 189.24 ± 9.26 NmL/L (Fig. 1A). In addition, the production of butyric acid, the main metabolite associated with H₂ formation, was approximately twice as high after 24 h of fermentation (1.32 ± 0.12 g/L – Fig. 1A) compared to the pVI (0.67 g/L – Table 4). Lactic acid was fully consumed at 72 h, while residual carbohydrates remained in the system during this period (Fig. 1A). The internal pressure of the reactors reached 0.9 bar after 48 h. Several strategies can be implemented to mitigate the inhibitory effects of H₂ partial pressure, including increasing the reactor headspace volume [74], purging the headspace with an external gas to adjust the high pressure, sparging inert gas (e.g. nitrogen) into the fermenter to reduce the H₂ partial pressure during biohydrogen synthesis [75], or reducing the internal pressure of the reactor by releasing gas [22]. The latter strategy was applied in this study, designing a reactor equipped with a manometer to monitor internal pressure and a valve to release gas, thereby preventing pressures exceeding 0.6 bar.

In this context, Fig. 1B shows the profile of H₂ production and soluble metabolites produced using vinasse at an initial concentration of 25 g_{COD}/L in a manometric reactor (VII). Hydrogen production at 24 h of fermentation was 179.64 ± 37.85 NmL/L, and achieved the highest production at 48 h with a generation of 245.86 ± 8.56 NmL/L and 0.47 bar of pressure, approximately 30 % higher H₂ compared to sealed batch mode (189.24 ± 9.26 NmL/L and 0.82 bar of pressure – Fig. 1A). Based on the Student's *t*-test at a 5 % significance level, the variations observed in the volumes produced were not statistically significant ($p > 0.05$) between the sealed and manometric systems.

High reactor pressure influences H₂ production, with inhibitory effects already observed at pressures of 0.6–0.8 bar during fermentation [22,76]. Although the manometric reactor with a valve (VII – Fig. 1B) enabled pressure release and showed differences in H₂ production at 48

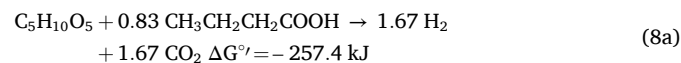
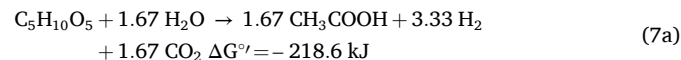
h compared with the sealed system, no further production was observed after this point. Fermentation of sugarcane vinasse still faces major challenges in achieving high cumulative H₂ yields, primarily due to the intrinsic characteristics of this feedstock and the constraints of batch operation. This indicates that other factors, such as the recalcitrance of the vinasse, could exert a more decisive influence on the process than the partial pressure itself. A fermentative medium supplemented with macro- and micronutrients, along with microorganisms adapted to vinasse substrates, could enhance the stability of H₂ production [77,78]. Continuous systems are commonly employed to facilitate inoculum adaptation to this recalcitrant medium and to improve the metabolism of vinasse-derived substrates and compounds, thereby supporting sustained H₂ production [77].

Table 5 includes comparative studies on H₂ production using vinasses as feedstock. Sillero and colleagues [46] used almost double the initial organic load (49 g_{COD}/L) as this study (25 g_{COD}/L) and inoculum adaptation with carbohydrate-rich and supplemented medium to promote cell growth and produce higher volumes of H₂. In contrast, Tena and colleagues [79] used the highest organic load (53 g_{COD}/L) of the studies examined, an inoculum adapted to thermophilic conditions, and nutrient-supplemented medium. From an overall perspective, the use of supplemented media is common in studies with vinasse, as it provides better acclimation conditions for microorganisms and facilitates the adaptation of the inoculum to complex substrates containing recalcitrant compounds, such as those present in vinasse. The use of standard substrates or minerals for inoculum adaptation prior to dark fermentation systems is generally not economically feasible [80], emphasizing the importance of using alternative raw materials carbohydrate-rich materials, as evaluated in the present study in section 3.3 using vinasse and HH for co-fermentation.

3.3. Hydrogen production from hemicellulose hydrolysate

3.3.1. Evaluation of increased initial substrate concentration and partial pressure in sealed reactors

Fermentation of HH was conducted at 50 °C and an initial pH of 5.5, the best condition applied to vinasse fermentation. Three initial carbohydrate concentrations of HH (1, 5, and 10 g/L) were used in a kinetic study of H₂ production employing sealed reactor (pHH1 – Fig. 2A; pHH5 – Fig. 2B; pHH10 – Fig. 2C). Pentoses (reactions 7 and 8) and hexoses (reaction 1 and 2) from HH used as carbon sources for dark fermentation lead to the production of H₂, CO₂, along with acetic and butyric acids [64].



In the pHH1 system using a sealed reactor (Fig. 2A), the highest H₂ production was achieved at 24 h, 451.76 ± 14.94 NmL/L, which corresponds to a 100 % increase compared to a previous study by Tomasini et al. [27]. In that study, an H₂ production of 217.48 ± 10.42 NmL/L was achieved in 24 h with HH at the same initial carbohydrate concentration but under mesophilic conditions (35 °C). At high temperatures, dissolved H₂ decreases, and the pathway of homoacetogenesis is reduced, allowing greater H₂ release in gaseous form. Previous studies have shown that an acetate to butyrate ratio (Hac/Hbut ratio) greater than 1 indicates dominance of the acetate pathway, while a ratio less than 1 indicates preference of the butyrate pathway [85]. In dark fermentation of pHH1 under thermophilic conditions, the ratio of acetic acid to butyric acid (Hac/Hbut) was 2.16, indicating that the process followed the acetic acid pathway, which is associated with higher H₂ yields, as the acetate to butyrate was above 1 [85]. However, the acetate to butyrate ratio does not account for homoacetogenic activity, i.e., the

Table 5
Comparative studies on H₂ production with vinasse as raw material by dark fermentation using batch mode.

Raw Material	Initial COD (g/L)	pH	Temperature (°C)	Time	Production (mL/L)	Reference
Sugarcane Vinasse	11.6	5.5	36	42 h	67.75	[81]
Sugarcane Vinasse and Molasses	6	6.1	25	24 h	25	[82]
Sugarcane Vinasse	0.3	5.5	25	44 h	6	[83]
Wine Vinasse	53	5.5	55	8 days	842	[84]
Sugarcane Vinasse	49	5.5	55	–	458	[46]
Sugarcane Vinasse	25	5.5	50	48 h	189.24	This study ^a
Sugarcane Vinasse	25	5.5	50	48 h	245.86	This study ^b

^a Hydrogen production using vinasse in sealed reactors without pressure relief.
^b The most favorable condition for hydrogen production in this study was obtained using vinasse in a manometric reactor with gas release.

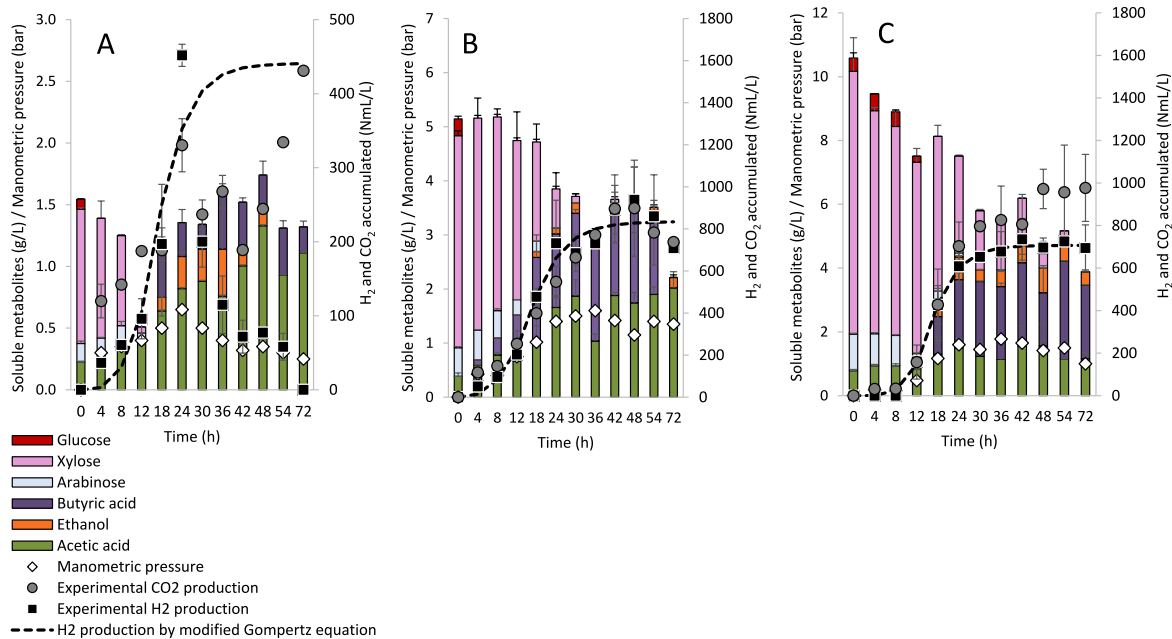
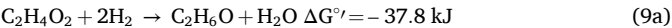


Fig. 2. Hydrogen production using hemicellulose hydrolysate in sealed reactors without pressure relief. Initial carbohydrate concentration 1 g/L = pHH1 (A) 5 g/L = pHH5 and 10 g/L = pHH10 at 50 °C and pH 5.5. Pressure was measured exclusively at the end of each period of incubation in HH1 = 1 g/L (A), HH5 = 5 g/L (B), and HH10 = 10 g/L (C) at 50 °C and pH 5.5. The concentration of substrates and main metabolites are presented in bars, while experimental H₂ and CO₂ production, in specific volume, is represented by markers, as well as the internal pressure of the system. Estimated parameters by modeling the experimental data of H₂ production by the Gompertz equation: pHH1 = 316.25 NmL/L (Hmax), 25.89 NmL/L.h (Rm), 7 h (λ); 0.84 (R²); pHH5 = 833.94 NmL/L (Hmax), 44 NmL/L.h (Rm), 7 h (λ), 0.96 (R²); pHH10 = 706.88 (Hmax), 49.34 NmL/L.h (Rm), 9 h (λ), 0.99 (R²).

increased acetate concentration is associated with H₂ consumption. Consequently, H₂ consumption was detected after 24 h of fermentation (Fig. 2A), and acetate concentration increased mainly after 42–48 h. Ethanol was also measured between 18 and 36 h and decreased thereafter. During dark fermentation, the reaction between acetate and H₂ (reaction 9), which is catalyzed by CoA transferase to form acetyl-CoA, leads to the production of ethanol by the solventogenesis pathway. Thus, H₂ production under thermophilic conditions was two-fold higher than in mesophilic conditions observed in the study by Tomasini et al. [27]. H₂ consumption after 24 h in pHH1 could be related to homoacetogenesis and solventogenesis, justifying the low H₂ yield in this concentration.



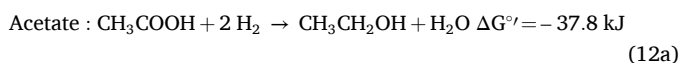
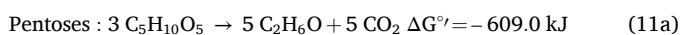
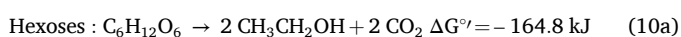
Dessi et al. [86] also compared mesophilic and thermophilic conditions using standard xylose as a substrate and found a 17 % higher yield at 55 °C. In addition, glucose from pHH1 was the first substrate completely consumed at 4 h of fermentation (0.1 g/L) (Fig. 2A). Xylose was the main carbohydrate in the medium (1.22 ± 0.12 g/L); its consumption began effectively at 8 h of fermentation. Arabinose consumption started at 12 h and was completely consumed (0.15 ± 0.02

g/L) in 18 h of fermentation, while xylose was fully consumed in 24 h. Thermophilic microorganisms such as *Clostridium* species can metabolize both pentoses and hexoses via distinct transport systems, such as ABC transporters for pentoses and PTS for hexoses [87–89]. The high affinity of PTS for glucose favors its uptake, often leading to carbon catabolite repression in mixed-sugar conditions [89]. Therefore, owing to the higher affinity of the transporters for glucose, this carbohydrate is preferentially consumed, followed by pentoses.

The metabolic profile and H₂ production differed significantly in fermentations conducted with higher initial substrate concentrations, such as in the pHH5 (Fig. 2B) and pHH10 (Fig. 2C) systems. In pHH5 (Fig. 2B), the highest H₂ production was achieved at 48 h (938.36 ± 155.68 NmL_{H2}/L), and in pHH10 (Fig. 2C) at 42 h with an accumulated volume of 735.41 ± 97.74 NmL_{H2}/L. In pHH5 and pHH10, there were no significant increases in H₂ production or gas consumption after 42 h of fermentation. Although higher substrate concentrations and elevated temperatures are generally associated with increased H₂ production due to enhanced liquid–gas mass transfer [90], this trend was not observed in the present study. The pHH5 system exhibited superior H₂ production compared to pHH10, but no difference in H₂ accumulation (p-value >0.05) was observed, despite pHH10 having more substrates available

for conversion to H₂. The manometric pressure in both systems (pHH5 and pHH10) exceeded 1 bar, triggering a pathway shift toward homoacetogenesis and solventogenesis, delaying substrate consumption due to H₂ accumulation in the system and H₂ adsorption for these routes [22, 56]. In pHH5, there was a high acetate production of 2.02 ± 0.3 g/L of acetic acid within 72 h. However, H₂ production was not proportional to acid formation because it was consumed through the homoacetogenic pathway.

In addition, both pHH5 and pHH10 demonstrated a metabolic shift from hydrogen-producing pathways toward ethanol formation, indicating the activation of a solventogenic *Clostridium*-type metabolism characterized by the synthesis of acetone, butanol, and ethanol (ABE pathway) [91]. Specifically, pHH10 produced 0.43 ± 0.1 g/L of ethanol within 72 h, while pHH5 generated 0.19 ± 0.01 g/L. During solventogenesis, H₂ produced via the acetic-butyric pathway or derived from glycolysis and the pentose phosphate pathway is used as an electron donor for NAD⁺ regeneration, leading to the formation of solvents, such as ethanol (Reactions 10, 11, and 12) [38]. Considering that the conversion of pentoses into ethanol is thermodynamically more favorable [62,92], systems with higher xylose concentrations tend to exhibit increased ethanol production, provided that conditions are conducive to this metabolic route.



Although pHH5 and pHH10 resulted in similar production of H₂ ($p > 0.05$), both values remained below the theoretical yield via the acetic acid pathway (3.33 mol/mol – reaction 7). In pHH5, the highest yield was 1.32 molH₂/molcarbohydrates after 48 h, corresponding to 40 % efficiency, whereas pHH10 reached only 0.64 molH₂/molcarbohydrates, with an efficiency of 19 %. A control assay was previously conducted by Tomasini et al. [27] using a standard medium (SM) composed of glucose, xylose, and arabinose at the same concentrations present in the HH. The results showed that SM did not outperform HH in fermentation; on the contrary, HH exhibited higher H₂ production, 941 NmL H₂/L was obtained for HH, compared with 737 NmL H₂/L for SM, using 10 g/L of carbohydrates. In anaerobic digestion, however, inhibitory effects became evident, as SM achieved 56.8 % higher methane accumulation than HH. These results suggest that methanogenic archaea are more sensitive to the complex composition of HH than fermentative bacteria [27].

In the pHH10 assay, butyric acid was the predominant metabolite at the end of fermentation (2.30 ± 0.01 g/L). Hydrogen production via the butyrate pathway involves the reduction of two NAD⁺ molecules along with H₂ generation (Reaction 8), resulting in lower H₂ yields than the acetic pathway. The pHH10 experiment was conducted in sealed reactors without partial pressure relief, a condition that allows excess H⁺ to serve as an electron donor for NAD⁺ reduction, favoring less efficient H₂-producing pathways such as the butyrate route. Hydrogen partial pressure, therefore, plays an indirect but crucial role in the biochemical equilibrium during substrate conversion to H₂, ultimately influencing the dominant metabolic pathway [73,93]. Previous studies have also investigated strategies to mitigate the effects of partial pressure by removing the produced H₂. Reactor sparging enhanced H₂ yield by 121 %, while headspace flushing with nitrogen resulted in a 56 % increase, both compared with untreated reactors [94]. Moreover, lowering H₂ partial pressure via vacuum application resulted in an eightfold increase in H₂ production relative to the control [95].

Systems with increased initial substrate concentrations were evaluated by Fasheun et al. [22] and Faber et al. [21] in systems with pressure control to avoid exceeding pressures of 0.8 and 0.25 bar, respectively. By using more concentrated media, they achieved higher H₂ production. In

pHH10, production remained stable, without an increase in H₂ production, until the end of the process in 72 h with 1 bar of pressure. This system achieved 1.78 bar in 36 h, and the highest internal pressure was observed. Thus, the saturation effects of H₂ owing to partial pressure are explicit. Based on this statement, two media with initial concentration of carbohydrates of 10 g/L (Fig. 3A–HH10) and 20 g/L (Fig. 3B – HH20) were evaluated in a system with gas release to avoid manometric pressures higher than 0.6 bar.

3.3.2. Evaluation of hydrogen production using hemicellulose hydrolysate at higher concentrations in manometric reactors with pressure release

In HH10, H₂ production achieved 1107.97 ± 74.83 NmL/L at 24 h, 82 % higher than pHH10 fermentation (608.70 ± 74.45 NmL/L) system without pressure release, and carbohydrates were fully consumed at 36 h (Fig. 3A). In 30 h of HH10 fermentation 1070.68 ± 29.42 NmL/L of H₂ was produced, which was similar to that observed at 24 h of fermentation ($p > 0.05$). However, carbohydrate concentration at 30 h, specifically xylose, was 0.72 ± 0.15 g/L, compared with 2.33 ± 0.24 g/L at 24 h. As predicted by the Gompertz model, stabilization of the process was initiated at 30 h of fermentation (Fig. 3A). Therefore, dark fermentation can be interrupted at 30 h with maximum H₂ production and low residual carbohydrate in the medium, in which the subsequent period (36 h) consumes H₂ for other pathways, such as solventogenesis.

In HH20 (Fig. 3B), H₂ production began at 18 h, and the maximum production was 670.24 ± 37.26 NmL/L in 72 h. This system exhibited inhibitory effects, as evidenced by only 37 % of the carbohydrates consumed by the end of fermentation. Substrate inhibition could be a significant factor, as xylose concentrations increased in this system (15.79 ± 0.6 g/L) compared with HH10 (7.65 ± 0.36 g/L). Some studies have reported substrate inhibition in xylose-rich media at concentrations of 10 g/L in mixed cultures [96] and 20 g/L in pure cultures [97]. It is reasonable to anticipate that H₂ production and yield would increase with higher substrate concentrations, provided that other influencing factors were not considered. Although HH20 had pressure control to avoid H₂ partial pressure inhibition, one factor to consider is the excess carbohydrate concentration relative to the number of microorganisms in the medium. Additionally, because hydrolysate was used as a raw material, acetic acid is present in its composition, and its concentration increases concurrently with the initial carbohydrate concentration in the medium, two factors that enhance the system osmolarity [98]. Acetate concentration in HH20 was 2.09 ± 0.07 g/L compared with 0.99 ± 0.06 g/L in HH10 (Fig. 3). There is no consensus on the exact threshold acetate concentration that inhibits H₂ production, but several studies have reported its occurrence at high levels (up to 3 g/L) [12,99,100]. Van Ginkel and Logan [101] demonstrated complete inhibition of H₂ production when 50 mM (approximately 3 g/L) of acetic and butyric acids operated at 30 °C, pH 5.5, and glucose as substrate. Furthermore, high osmolarity influenced the adaptive phase, extending it to 13 h, the longest observed in the systems evaluated in this study.

Table 6 summarizes H₂ production results from batch dark fermentation using hemicellulose hydrolysates of sugarcane, corn, rice and pine tree wood as raw materials, as reported in the literature, and compares them with the findings of this study. Among the studies reported in the literature, the present work is distinguished by the levels of H₂ production achieved, the carbohydrate concentrations employed, and the use of pure or mixed microbial cultures as inoculum without external supplementation. Lower initial carbohydrate concentration in previous studies limits yield comparability with this work. In contrast, Gonzales et al. [102] reported higher yields and production, which can be attributed to the supplementation of the fermentation medium with mineral nutrients. Although supplementation provides more favorable initial conditions for fermentation, it also increases operational costs, representing a limitation for processes aimed at the valorization of agro-industrial residues.

Therefore, based on the results obtained in this study, thermophilic conditions are appropriate for H₂ production through dark fermentation

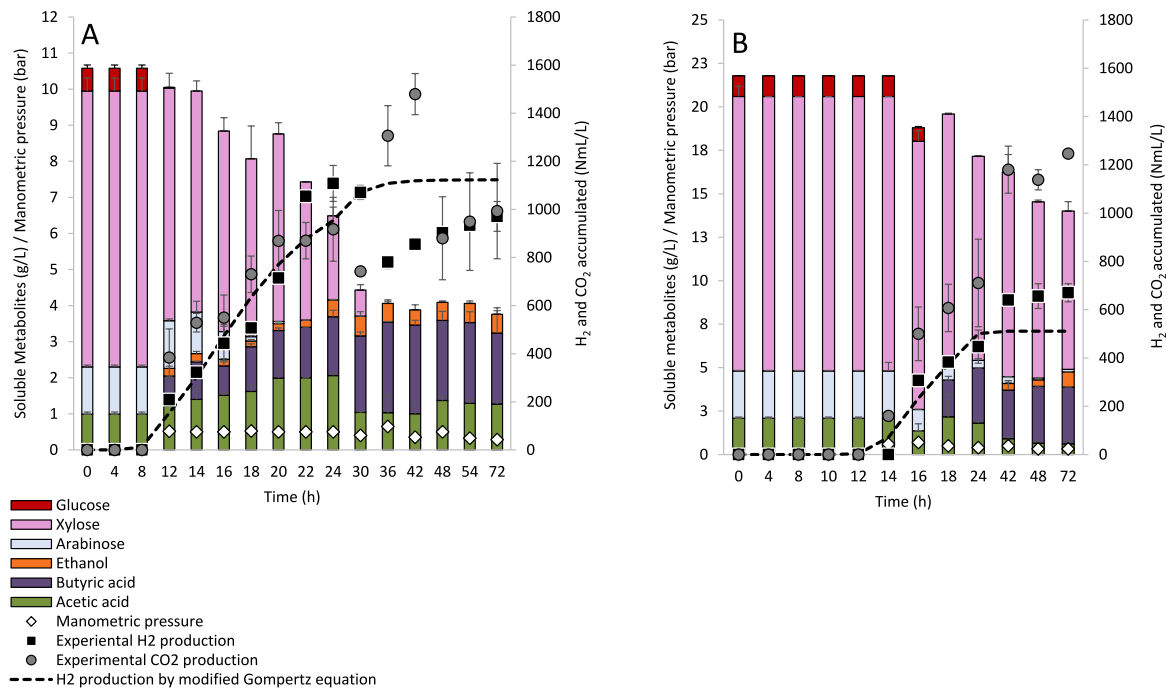


Fig. 3. Hydrogen production using hemicellulose hydrolysate in a manometric reactor with gas relief (pressure evaluated during the fermentation). Initial carbohydrate concentrations are 10 g/L = HH10 (A) and 20 g/L = HH20 at 50 °C and pH 5.5. Concentration of substrate and main metabolite are presented in bars, while experimental H₂ and CO₂ production, in specific volume, are represented by markers, as well as the internal pressure of the system. Estimated parameters by modeling the experimental data of H₂ production by the Gompertz equation: HH10P = 1123.18 NmL/L (Hmax), 86.03 NmL/L.h (Rm), 10 h (λ); 0.97 (R²); HH20P = 526.88 NmL/L (Hmax), 57.04 NmL/L.h (Rm), 12 h (λ), 0.96 (R²); HH10 = 706.88 (Hmax), 49.34 NmL/L.h (Rm), 9 h (λ); 0.79 (R²).

Table 6
Comparative studies on H₂ production using hemicellulose fractions from pine tree wood and straws of sugarcane and pine tree wood.

Biomass	Raw Material	Inoculum	pH	Initial Concentration (g/L)	Temperature (°C)	Time (h)	H ₂ (NmL/L)	Yp/s H ₂	Reference
Rice Straw	Rice straw thermal acid hydrolysate	Anaerobic consortium	7	5	28	48	304	0.64 mol _{H2} /mol _{carbohydrates}	[104]
Rice Straw	Detoxified rice straw thermal acid hydrolysate	Anaerobic consortium	7	5	28	96	433	0.90 mol _{H2} /mol _{carbohydrates}	[104]
Sugarcane Straw	Acidic hemicellulose hydrolysed	Anaerobic Sludge	5.5	5	35	36	1095	1.75 mol _{H2} /mol _{carbohydrates}	[27]
Sugarcane bagasse	Acidic hemicellulose hydrolysed	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> KKU-ED1	6.5	5	55	–	699	1.12 mol _{H2} /mol _{carbohydrates}	[96]
Pine tree wood	Acidic hemicellulose hydrolysed filtered using 8 N Ca(OH) ^b	Anaerobic consortium	7	10	35	24	1617	1.27 mol _{H2} /mol _{carbohydrates}	[102]
Sugarcane Straw	Acidic hemicellulose hydrolysed	Anaerobic sludge	5.5	10	50	24	609	0.54 mol _{H2} /mol _{carbohydrates}	This study ^a
Sugarcane Straw	Acidic hemicellulose hydrolysed	Anaerobic sludge	5.5	10	50	24	1107	0.66 mol _{H2} /mol _{carbohydrates}	This study ^b

^a Hydrogen production using hemicellulose hydrolysate in sealed reactors without pressure relief.
^b The most favorable condition for hydrogen production in this study was obtained using hemicellulose hydrolysate in a manometric reactor with gas release.

using hemicellulose hydrolysate as the raw material. The use of carbohydrate-rich substrates has been shown to increase the H₂ partial pressure as substrate concentrations rise. This condition may promote a metabolic shift toward solventogenesis and homoacetogenesis, thereby reducing the overall H₂ yield. Some researchers have reported harmful effects associated with high H₂ partial pressure caused by concentrated substrates in the medium and have suggested that low to moderate initial substrate concentrations may lead to improved H₂ yield and production performance [85,103]. However, the economic feasibility of biological H₂ production from wastes such as vinasse and sugarcane

straw remains challenging, particularly when using diluted media that require multiple batches. This challenge was addressed by employing manometric reactors specifically designed to enable continuous gas release, thereby preventing pressures from exceeding 0.6 bar and facilitating the use of more concentrated media. However, the system collapsed in HH20 because of the high osmolarity of the medium. These results confirm that the systems must be evaluated individually, as each organic material presents specific challenges, such as the biodegradability of the substrate (as observed with HH at concentrations up to 10 g/L) and increased partial pressure. In addition, complex raw

materials, such as HH20, with high initial acetic acid concentration (2.09 g/L), require further investigation under different inoculum ratios to optimize their utilization [20]. This represents a promising approach to valorize the C5 fraction by integrating sugarcane straw into the bio-refinery process, as this biomass remains underutilized in the sugarcane industry owing to impurities inherent in its composition.

3.4. Co-fermentation of vinasse and straw hemicellulose hydrolysate

Table 7 presents the results of H₂ production, substrate consumption, and metabolite formation during the co-fermentation (VH) of vinasse (VI) and hydrolysate (HH) compared to the fermentation processes carried out separately. VH1 produced 389.60 ± 60.61 NmL/L of H₂, 58 % higher than VI1 (245.86 ± 8.56 NmL/L) under equivalent soluble COD, with double the carbohydrate concentration and the same experimental period (Table 6). Co-fermentation with HH-derived sugars significantly improved H₂ production, as seen in VH2 (709.71 ± 69.40 NmL/L), which generated seven-fold more H₂ than pVI (97.17 ± 3.33 NmL/L). Despite the presence of double carbohydrates, pHH10 showed statistically equivalent H₂ production. Although pHH5 had the same carbohydrate concentration as VH2, its simpler composition and lower organic load favored H₂ production, hindering direct comparisons with the co-fermentation system involving vinasse due to the presence of diverse interfering and recalcitrant compounds that affect the process. As H₂ production in pVI occurred only within 24 h, data for these systems are presented for this period, after which only gas consumption was recorded (Table 4).

In anaerobic fermentation, the carbon/nitrogen (C/N) ratio is a critical factor that reflects the nutrient balance in the medium and directly influences cellular synthesis, growth, and metabolism. The optimal C/N ratio may depend on the type of substrate, inoculum, and

fermentation conditions [23]. Several authors have suggested that C/N ratios ranging from 20 to 200 are appropriate for H₂ production [20,23, 105–107]. Values lower than 6 may be toxic and harmful to anaerobic microorganisms owing to the low availability of carbon, leading to the overproduction of ammonia (NH₃) [108]. In this study, the ratio of VI: HH was chosen to evaluate the possible improvement in vinasse consumption assisted by monomers derived from HH. Thus, the vinasse was equal to or exceeded the organic matter (COD) in the medium concerning the optimal C/N ratio for the microorganisms. Specifically, the C/N ratios of 23.6 (HV1), 36.1 (HV2), and 52.2 (HV3) (Table 1).

In metabolic profiles of co-fermentation and fermentation of vinasse, lactic acid was the first substrate to be consumed (Supplementary material). Although this study did not identify them, previous research on vinasse has reported compounds, such as melanoidins, that influence the initial sugar consumption and promote the growth of *Lactobacillus* species [39]. At lower concentrations of COD from vinasse in the medium, as observed in VH3, cells were less negatively affected, enabling them to metabolize glucose more effectively, which resulted in 92 % substrate consumption in 48 h compared to 30 % in vinasse fermentation (pVI), corresponding to lactic acid consumption (Table 4). In addition, all monitored substrates were completely consumed in VH3 within 72 h of fermentation (supplementary material).

While H₂ production in VH2 and pHH10 was statistically equivalent ($p < 0.05$), the carbohydrates from HH, a highly biodegradable carbon source, significantly enhanced substrate consumption, achieving 88 % in VH2 compared to only 30 % in pVI. Co-fermentation studies involving vinasse enhanced the conversion of substrate into H₂, particularly at lower organic loads. The literature reinforces that co-fermentation with vinasse can enhance substrate conversion into H₂, especially under low organic loading conditions. Menezes et al. [17] reported co-fermentation of glycerol and vinasse, attributing it to its use as a

Table 7
Comparative results of co-fermentation (HV), fermentation of vinasse (VI), and hemicellulose hydrolysate (HH) for hydrogen production.

System	Co-fermentation – Vinasse and Hydrolysate manometric reactor			Vinasse manometric reactor	Vinasse in sealed reactor	Hydrolysate in sealed reactor		Hydrolysate manometric reactor	
	VH1	VH2	VH3	VI1	pVI	pHH5	pHH10	HH10	HH20
sCOD (g/L) ^a	18.78 ± 0.20	12.85 ± 0.62	9.17 ± 0.49	16.40 ± 0.3	11.00 ± 1.71	7.10 ± 0.20	12.30 ± 0.07	12.76 ± 0.15	16.06 ± 0.37
Carbohydrates (g/L)	2.89 ± 0	4.69 ± 0	5.04 ± 0.20	1.20 ± 0.04	0.40 ± 0.08	4.76	9.81	9.59	19.70
VI:HH ratio ^b	12.5:1	1.43:1	1:1	1:0	0:1	0:1	0:1	0:1	0:1
Carbon (%) (m/m)	4.30	1.23	0.78	7.55	4.52	4.72	9.45	9.45	18.62
Nitrogen (%) (m/m)	0.18	0.03	0.01	0.32	0.19	0.04	0.08	0.08	0.16
C/N (m/m)	24	36	52	23	23	115	115	115	116
Fermentation time	48	48	48	48	24	48	72	24	72
Substrate consumption (%)	72	88	92	62	30	100	100	76	53
H ₂ production (NmL/L)	389.60 ± 60.61	709.71 ± 69.40	649.13 ± 41.50	245.86 ± 8.56	97.17 ± 3.33	938.36 ± 155.68	797.92 ± 135.38	1107.97 ± 74.83	670.24 ± 37.56
CO ₂ production (NmL/L)	751.28 ± 87.95	990.91 ± 96.46	804.11 ± 61.65	453.87 ± 40.92	334.10 ± 18.57	898.34 ± 228.36	1063.69 ± 163.39	917.38 ± 132.79	1246.44 ± 1.33
Final Acetic acid (g/L) ^c	1.88 ± 0.03	0.72 ± 0.09	0.79 ± 0	2.14 ± 0.15	0.97 ± 0	1.75 ± 0.19	1.74 ± 0.20	2.06 ± 0.06	0.61 ± 0.19
Acetic acid production (g/L) ^c	1.35 ± 0.03	0.40 ± 0.09	0.20 ± 0	1.19 ± 0.15	0.32 ± 0.03	1.36 ± 0.18	0.96 ± 0.10	1.07 ± 0.06	e
Butyric acid production (g/L)	2.18 ± 0.08	1.51 ± 0.11	1.66 ± 0.22	1.38 ± 0.06	0.66 ± 0	1.58 ± 0.69	2.42 ± 0.02	1.63 ± 0.18	3.27 ± 0.02
Final propionic acid (g/L) ^d	0.75 ± 0.13	0.77 ± 0.02	–	1.09 ± 0.10	0.76 ± 0.06	–	–	–	–
Propionic acid production (g/L) ^d	0.39 ± 0.10	0.37 ± 0.02	–	0.33 ± 0.10	0.28 ± 0.06	–	–	–	–
Ethanol production (g/L)	0.66 ± 0.04	0.16 ± 0.03	0.22 ± 0.03	0.65 ± 0.30	–	0.12 ± 0.01	0.78 ± 0	0.50 ± 0.04	0.38 ± 0.07

^a sCOD: Soluble Chemical Oxygen Demand in the supernatant of fermentation medium.

^b The ratio was calculated based on the COD of vinasse and HH.

^c Acetic acid initial concentration: 0.53 g/L (VH1), 0.32 g/L (VH2), 0.59 g/L (VH3), 0.95 g/L (VI1), 0.65 g/L (pVI1), 0.39 g/L (pHH5), 0.78 g/L (pHH10), 0.99 g/L (HH10), 2.09 g/L (HH20).

^d Propionic acid initial concentration: 0.36 g/L (VH1), 0.40 g/L (VH2).

^e only consumption.

carbon source for cell growth, which achieved a production of 1851 mL H₂ d⁻¹ L⁻¹. Similarly, Ribeiro and coworkers [109] applied molasses as a raw material to achieve a 55 % increase in H₂ production compared to Menezes [17], reaching 2.8 L H₂ L⁻¹ d⁻¹, which indicates that its carbohydrates were more assimilated by microorganisms than glycerol. The supply of highly biodegradable carbon source fosters increased biomass growth within the reactor. On the other hand, continuous processes offer greater microbial adaptation to organic matter in the system. However, these studies did not establish the C/N ratio under investigation.

A table comparing studies on the co-fermentation of vinasse with various raw materials, as well as the co-fermentation of cheese whey and glycerol, which are effluents also generated in large volumes by the dairy industry, is provided in the supplementary material. However, since not all studies conducted separate fermentations of the raw materials, direct comparisons between H₂ production in co-fermentation and mono-fermentation processes are limited.

Volpi et al. [7] reported that ensiling filter cake together with vinasse not only created an anaerobic environment favorable for fermentation but also significantly increased H₂ yield, reaching 95 NmL H₂ gVS⁻¹ compared to 63 NmL H₂ gVS⁻¹ obtained with raw filter cake. Similarly, Almeida [110] investigated the co-fermentation of whey and glycerol, highlighting the advantage of natural pH regulation without the need for chemical additives such as bicarbonate, which can make the process economically unviable. In this context, co-fermentation with buffering residues offers a low-cost and environmentally sustainable alternative to maintain system stability. In those experiments, H₂ yields were three times higher than those achieved through mono-fermentation of whey.

Acetic and butyric acids increase in all tests related to H₂ production. Propionic acid, often associated with system instability and inhibition [70], did not exhibit these effects during co-fermentation, as propionate production in the VH1 and VH2 media was equivalent to vinasse mono-fermentation (VI1 and pVI). However, VH1 demonstrated the most shift pathway to the solventogenesis, with ethanol production reaching 0.66 ± 0.04 g/L.

In summary, these results reinforce that co-fermentation substantially enhances H₂ production. This study demonstrates that incorporating a carbohydrate-rich feedstock can facilitate microbial adaptation to more recalcitrant raw materials, such as vinasse, while enabling the integrated utilization of two residues within a single production cycle.

4. Conclusion

This study demonstrates the potential of integrating sugarcane vinasse and hemicellulose hydrolysate (HH) as complementary raw materials for dark fermentation aimed at hydrogen production. Thermophilic conditions (50 °C, pH 5.5) proved promising, and pressure-release reactors played a critical role in mitigating inhibitory effects, allowing higher gas accumulation. The co-fermentation strategy not only increased H₂ production by 58 % compared to fermentation with vinasse but also improved carbohydrate consumption and promoted metabolic shifts toward favorable pathways, such as butyrate and acetate production, while reducing propionate formation. Moreover, the use of HH, rich in readily biodegradable sugars, enabled microbial adaptation to more complex substrates, such as the substrates contained in vinasse. Overall, the results support the feasibility of integrating vinasse and sugarcane straw hydrolysate into biorefinery systems for sustainable hydrogen production, contributing to the circular economy within the sugarcane-ethanol industry.

CRediT authorship contribution statement

Marina Tomasini: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Mariana Oliveira Faber:** Writing – review & editing, Visualization, Validation, Resources, Formal analysis, Data

curation. **Viridiana Santana Ferreira-Leitão:** Writing – review & editing, Visualization, Validation, Supervision, Resources, Project administration, Methodology, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was supported by the CAPES Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior grant numbers 88887.600289/2021-00; by the CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), grant numbers 306978/2022; by the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) grant number E-26/204.332/2024, E-26/201.347/2023, and E-26/210.791/2021; and GALP76 supported by GALP Energia (SGPS S. A.), the Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), and the Empresa Brasileira de Pesquisa e Inovação Industrial (EMBRAPII).

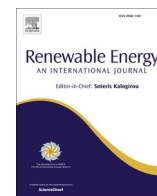
References

- [1] Vandenbergh LPS, Valladares-Diestra KK, Bittencourt GA, Zevallos Torres LA, Vieira S, Karp SG, et al. Beyond sugar and ethanol: the future of sugarcane biorefineries in Brazil. *Renew Sustain Energy Rev* 2022;167:112721. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112721>.
- [2] FAO F and AO. Food and agricultural data. FAOSTAT; 2023. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>.
- [3] CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira 2024/25. Cia Nac Abast 2024;11: 110. <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>.
- [4] Fuess LT. Fermentative biohydrogen production in sugarcane biorefineries: advances, challenges and prospects. *Int J Hydrogen Energy* 2024;49:532–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.10.092>.
- [5] Sydney EB, Carvalho JC de, Lett LAJ, Magalhães AI, Karp SG, Martinez-Burgos WJ, et al. Current developments and challenges of green technologies for the valorization of liquid, solid, and gaseous wastes from sugarcane ethanol production. *J Hazard Mater* 2021;404:124059. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124059>.
- [6] Negrão DR, Grandis A, Buckeridge MS, Rocha GJM, Leal MRLV, Driemeier C. Inorganics in sugarcane bagasse and straw and their impacts for biorefinery and biorefining: a review. *Renew Sustain Energy Rev* 2021;148:111268. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111268>.
- [7] Volpi MPC, Fuess LT, Moraes BS. Economic performance of biogas production and use from residues co-digestion in integrated 1G2G sugarcane biorefineries: better electricity or biomethane. *Energy Convers Manag* 2023;277:116673. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2023.116673>.
- [8] Özbay N, Yaman E, Yargıç AŞ, Şahin RZY. Hydrothermal vs. dilute acid pre-treatments: comparison of the biomass properties, distribution of pyrolysis products, and bio-oil characteristics. *Biomass Convers Biorefinery* 2023;13: 739–53. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-01203-0>.
- [9] Baksi S, Saha D, Saha S, Sarkar U, Basu D, Kuniyal JC. Pre-treatment of lignocellulosic biomass: review of various physico-chemical and biological methods influencing the extent of biomass depolymerization. *Int J Environ Sci Technol* 2023;20:13895–922. <https://doi.org/10.1007/s13762-023-04838-4>.
- [10] Castellanos-Sánchez JE, Aguilar-Aguilar FA, Hernández-Altamirano R, Venegas Venegas JA, Raj Aryal D. Biogas purification processes: review and prospects. *Biofuels* 2024;15:215–27. <https://doi.org/10.1080/17597269.2023.2223801>.
- [11] Xue S, Wang F. Pretreatment of the inoculum with trichloromethane to enhance biohydrogen production via two-stage batch fermentation. *Waste Biomass Valor* 2022;13:2237–48. <https://doi.org/10.1007/s12649-022-02008-0>.
- [12] Chen Y, Yin Y, Wang J. Recent advance in inhibition of dark fermentative hydrogen production. *Int J Hydrogen Energy* 2021;46:5053–73. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.11.096>.
- [13] Dauphain K, Trabaly E, Santa-Catalina G, Bernet N, Carrere H. Role of indigenous bacteria in dark fermentation of organic substrates. *Bioresour Technol* 2020;313. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123665>.
- [14] Zheng Y, Huang J, Shen R, Zhao Y, Lei C, Wang Y. Quantitative analysis of hydrogen and fatty acid from homoacetogenesis and optimization of glycerol fermentation condition. *Int J Hydrogen Energy* 2023;48:4182–92. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.09.250>.
- [15] Lv Z, Pan X, Ye ZL, Angelidaki I, Lv N, Li Y, et al. Homoacetogenesis is altering the metabolic pathway of acidogenic microbiome and combating volatile fatty acid accumulation in anaerobic reactors. *J Environ Chem Eng* 2023;11. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.110224>.

- [16] Fuess LT, Santos GM dos, Delforno TP, Moraes B de S, Silva AJ da. Biochemical butyrate production via dark fermentation as an energetically efficient alternative management approach for vinasse in sugarcane biorefineries. *Renew Energy* 2020;158:3–12. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.05.063>.
- [17] de Menezes CA, Almeida P de S, Delforno TP, de Oliveira VM, Sakamoto IK, Varesche MBA, et al. Relating biomass composition and the distribution of metabolic functions in the co-fermentation of sugarcane vinasse and glycerol. *Int J Hydrogen Energy* 2023;48:8837–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.11.271>.
- [18] Canto-Robertos M, Quintal-Franco C, Ponce-Caballero C, Vega-De Lille M, Moreno-Andrade I. Inhibition of hydrogen production by endogenous microorganisms from food waste. *Brazilian J Chem Eng* 2023;40:137–50. <https://doi.org/10.1007/s43153-022-00235-5>.
- [19] Zagrodnik R, Duber A, Seifert K. Dark-fermentative hydrogen production from synthetic lignocellulose hydrolysate by a mixed bacterial culture : the relationship between hydraulic retention time and pH conditions. *Bioresour Technol* 2022; 358:127309. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127309>.
- [20] Mattiello-Francisco L, Ferreira FV, Peixoto G, Mockaitis G, Zaiat M. Hydrogen production from sugarcane bagasse pentose liquor fermentation using different food/microorganism and carbon/nitrogen ratios under mesophilic and thermophilic conditions. *Fermentation* 2024;10:432. <https://doi.org/10.3390/fermentation10080432>.
- [21] Faber M de O, Meireles PLS de, Ferreira-Leitão VS. Process parameters and energy evaluation of biological hydrogen and methane sequentially produced using residual glycerin from biodiesel. *BioEnergy Res* 2022;16:1–21. <https://doi.org/10.1007/s12155-022-10539-6>.
- [22] Fasheun DO, da Silva ASA, Teixeira RSS, Ferreira-Leitão VS. Dark fermentative hydrogen production from cassava starch: a comprehensive evaluation of the effects of starch extrusion and enzymatic hydrolysis. *Int J Hydrogen Energy* 2024; 52:322–34. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.05.312>.
- [23] Karim A, Islam MA, Mishra P, Yousuf A, Faizal CKM, Khan MMR. Technical difficulties of mixed culture driven waste biomass-based biohydrogen production: sustainability of current pretreatment techniques and future prospective. *Renew Sustain Energy Rev* 2021;151:111519. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111519>.
- [24] Sluiter A, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, Sluiter A, et al. Determination of extractives in Biomass 2005. http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html.
- [25] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html; 2012.
- [26] Moutta R de O, Cristina Silva M, Reis Corrales RCN, Santos Cerullo MA, Ferreira-Leitão VS, da Silva Bon EP. Comparative response and structural characterization of sugarcane bagasse, straw and bagasse-straw 1:1 mixtures subjected to hydrothermal pretreatment and enzymatic conversion. *J Microb Biochem Technol* 2013. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.S12-005>. 01.
- [27] Tomasini M, Faber M de O, Ferreira-Leitão VS. Sequential production of hydrogen and methane using hemicellulose hydrolysate from diluted acid pretreatment of sugarcane straw. *Int J Hydrogen Energy* 2022;48:9971–87. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.11.276>.
- [28] De Sá LRV, De Oliveira Moutta R, Pinto Da Silva Bon E, Christie Cammarota M, Ferreira-Leitão VS. Fermentative biohydrogen production using hemicellulose fractions: analytical validation for C5 and C6-sugars, acids and inhibitors by HPLC. *Int J Hydrogen Energy* 2015;40:13888–900. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.08.014>.
- [29] de Vasconcelos NM, Gas Pinto, Araújo FA de S. Determination of reducing sugars by 3,5-Dinitrosalicylic acid, vol. 88. History of Method Development and Establishment of a Protocol for the Bioprocess Laboratory. *Bol Pesqui Número 9 - Embrapa*; 2013. p. 1–16. <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/982130/determinacao-de-acucares-redutores-pelo-acido-35-dinitrosalico-historico-do-desenvolvimento-do-metodo-e-estabelecimento-de-um-protocolo-para-o-laboratorio-de-bioprocessos>.
- [30] APHA APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. *Am Public Heal Assoc* 2017;23:1689–99. <https://www.standardmethods.org>.
- [31] Barrera-Quintero V, Davila-Gomez JA, Rizo Acosta P, Hernandez-Rojas ME, Baez-Pimiento S. Gompertz equation's first and second derivatives for kinetics analysis of batch dark fermentation on bio-hydrogen production. *Eur J Eng Res Sci* 2017; 2:18. <https://doi.org/10.24018/ejers.2017.2.11.509>.
- [32] De Sá LRV, Cammarota MC, De Oliveira TC, Oliveira EMM, Matos A, Ferreira-Leitão VS. Pentoses, hexoses and glycerol as substrates for biohydrogen production: an approach for Brazilian biofuel integration. *Int J Hydrogen Energy* 2013;38:2986–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.12.103>.
- [33] Lie S. Was found to give good reproducibility within mix thoroughly and read the absorption at read against a reference sample prepared with ninhydrin at pH 6-7 and the colour spectrophotometer covering the visible distilled water : 100 g NajjHPcy ~ HJO. *J Inst Brew* 1973;79:37–41. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1973.tb03495.x>.
- [34] Fuess LT, Braga AFM, Eng F, Gregoracci GB, Saia FT, Zaiat M, et al. Solving the bottlenecks of sugarcane vinasse biodegradation: impacts of temperature and substrate exchange on sulfate removal during dark fermentation. *Chem Eng J* 2023;455:140965. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.140965>.
- [35] Lima V de O, Barros VG de, Duda RM, Oliveira RA de. Anaerobic digestion of vinasse and water treatment plant sludge increases methane production and stability of UASB reactors. *J Environ Manage* 2023;327:116451. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116451>.
- [36] Piffer MA, Oliveira CA, Bovio-Winkler P, Eng F, Etchebehere C, Zaiat M, et al. Sulfate and pH-driven metabolic flexibility in sugarcane vinasse dark fermentation stimulates biohydrogen evolution , sulfidogenesis or homoacetogenesis. *Int J Hydrogen Energy* 2022;47:31202–22. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.07.039>.
- [37] Rego GC, Ferreira TB, Ramos LR, Menezes CA De, Soares LA, Sakamoto IK, et al. Bioconversion of pretreated sugarcane vinasse into hydrogen : new perspectives to solve one of the greatest issues of the sugarcane biorefinery. *Biomass Convers Biorefinery* 2020;12:5527–41. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00984-8>.
- [38] Couto PT, Eng F, Naessens W, Nopens I, Zaiat M. Modelling sugarcane vinasse processing in an acidogenic reactor to produce hydrogen with an ADM1-based model. *Int J Hydrogen Energy* 2020;45:6217–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.12.206>.
- [39] Comparato CN, de Araujo MN, Sakamoto IK, Fuess LT, Damjanovic MHRZ, da Silva AJ. Melanoidin content determines the primary pathways in glucose dark fermentation: a preliminary assessment of kinetic and microbial aspects. *Fermentation* 2024;10:272. <https://doi.org/10.3390/fermentation10060272>.
- [40] Fuess LT, Garcia ML, Zaiat M. Seasonal characterization of sugarcane vinasse: assessing environmental impacts from fertilization and the bioenergy recovery potential through biodegradation. *Sci Total Environ* 2018;634:29–40. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.326>.
- [41] Gonzalez R, Campbell P, Wong M. Production of ethanol from thin stillage by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* 2010;32:405–11. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0159-2>.
- [42] Silva RDS, Oliveira PA de, da Silva ERS, Cardoso CAL, Ernandes JR, Batistote M. Effect of acid treatment in alcoholic fermentation. *Ciência e Nat* 2015;37:52–6. <https://doi.org/10.5902/2179460x14173>.
- [43] Almeida MA de, Colombo R. Production chain of first-generation sugarcane bioethanol: characterization and value-added application of wastes. *Bioenergy Res* 2021;16:924–39. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10301-4>.
- [44] Ananthi V, Ramesh U, Balaji P, Kumar P, Govarthanan M, Arun A. A review on the impact of various factors on biohydrogen production. *Int J Hydrogen Energy* 2024;52:33–45. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.08.046>.
- [45] Cremonez PA, Teleken JG, Weiser Meier TR, Alves HJ. Two-stage anaerobic digestion in agroindustrial waste treatment: a review. *J Environ Manage* 2021; 281:111854. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111854>.
- [46] Sillero L, Solera R, Perez M. Effect of temperature on biohydrogen and biomethane production using a biochemical potential test with different mixtures of sewage sludge, vinasse and poultry manure. *J Clean Prod* 2023;382. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.135237>.
- [47] Carvalho DM de, Abad AM, Evtuguin DV, Colodette JL, Lindström ME, Vilaplana F, et al. Isolation and characterization of acetylated glucuronarabinoxylan from sugarcane bagasse and straw. *Carbohydr Polym* 2017;156:223–34. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.022>.
- [48] Rasmussen H, Sørensen HR, Meyer AS. Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the biorefinery: sugar reaction mechanisms. *Carbohydr Res* 2014;385:45–57. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.08.029>.
- [49] Ramos LR, Lovato G, Rodrigues JAD, Silva EL. Anaerobic digestion of vinasse in fluidized bed reactors: process robustness between two-stage thermophilic-thermophilic and thermophilic-mesophilic systems. *J Clean Prod* 2021;314. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128066>. 128066 Contents.
- [50] Ramos LR, Silva EL, Luis RW. Thermophilic hydrogen and methane production from sugarcane stillage in two-stage anaerobic fluidized bed reactors. *Int J Hydrogen Energy* 2019;45:5239–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.05.025>.
- [51] Toledo-cervantes A, Villaf F, M HO, Arreola-vargas J, Jalisco D, Jim LJ. Comparative evaluation of the mesophilic and thermophilic biohydrogen production at optimized conditions using tequila vinasses as substrate. *Int J Hydrogen Energy* 2020;45:11000–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.02.051>.
- [52] Abendroth C, Hahnke S, Simeonov C, Klocke M, Casani-Miravalls S, Ramm P, et al. Microbial communities involved in biogas production exhibit high resilience to heat shocks. *Bioresour Technol* 2018;249:1074–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.093>.
- [53] Reichardt N, Duncan SH, Young P, Belenguer A, Leitch CM, Scott KP, et al. Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *ISME J* 2014;8:1323–35. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.14>.
- [54] Vidra A, Németh Á. Bio-produced propionic acid : a review. *Period Polytech - Chem Eng* 2018;62:57–67. <https://doi.org/10.3311/PPch.10805>.
- [55] Mazareli RC da S, Sakamoto IK, Silva EL, Varesche MBA. *Bacillus* sp. isolated from banana waste and analysis of metabolic pathways in acidogenic systems in hydrogen production. *J Environ Manage* 2019;247:178–86. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.06.040>.
- [56] Patakova P, Branska B, Vasylikovska M, Jureckova K, Musilova J, Provaznik I, et al. Transcriptomic studies of solventogenic clostridia, *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*. *Biotechnol Adv* 2022;58:107889. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107889>.
- [57] Ragsdale SW, Pierce E. *Biochimica et Biophysica Acta* Acetogenesis and the Wood – Ljungdahl pathway of CO 2 fixation. *Proteins Proteom* 2008;1784:1873–98. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.08.012>.
- [58] Shin HJ, Jung KA, Nam CW, Park JM. A genetic approach for microbial electrosynthesis system as biocommodities production platform. *Bioresour Technol* 2017;245:1421–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.077>.
- [59] Junior ADNF, Pages C, Latrille E, Bernet N, Zaiat M, Trably E. Biogas sequestration from the headspace of a fermentative system enhances hydrogen

- production rate and yield Ant o. Int J Hydrogen Energy 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.02.064>.
- [60] Pauss A, Andre G, Perrier M, Guiot SR. Liquid-to-Gas mass transfer in anaerobic processes: inevitable transfer limitations of methane and hydrogen in the biomethanation process. Appl Environ Microbiol 1990;56:1636–44. <https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1636-1644.1990>.
- [61] Patakova P, Branska B, Sedlar K, Vasylikivska M, Jureckova K, Kolek J, et al. Acidogenesis, solventogenesis, metabolic stress response and life cycle changes in *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598 at the transcriptomic level. Sci Rep 2019;9:1–21. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37679-0>.
- [62] Saady NMC. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation : unresolved challenge. Int J Hydrogen Energy 2013;38:1–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.122>.
- [63] Park Wooshin, Hyun Seung H, Oh Sang-Eun, Bruce E, Logan ISK. Removal of headspace CO₂ increases biological hydrogen production. Environ Sci Technol 2005;39:4416–20. <https://doi.org/10.1021/es048569d>.
- [64] Elbeshbishy E, Dhar BR, Nakhla G, Lee HS. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. Renew Sustain Energy Rev 2017;79:656–68. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.075>.
- [65] Basak B, Jeon BH, Kim TH, Lee JC, Chatterjee PK, Lim H. Dark fermentative hydrogen production from pretreated lignocellulosic biomass: effects of inhibitory byproducts and recent trends in mitigation strategies. Renew Sustain Energy Rev 2020;133. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110338>.
- [66] de Sá LRV, Faber M de O, da Silva AS, Cammarota MC, Ferreira-Leitão VS. Biohydrogen production using xylose or xylooligosaccharides derived from sugarcane bagasse obtained by hydrothermal and acid pretreatments. Renew Energy 2020;146:2408–15. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.08.089>.
- [67] O-Thong S, Prasertsan P, Karakashev D, Angelidaki I. Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2. Int J Hydrogen Energy 2008;33:1204–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.12.015>.
- [68] Mirmohamadsadeghi S, Karimi K, Azarbaijani R, Parsa Yeganeh L, Angelidaki I, Nizami AS, et al. Pretreatment of lignocelluloses for enhanced biogas production: a review on influencing mechanisms and the importance of microbial diversity. Renew Sustain Energy Rev 2021;135:110173. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110173>.
- [69] Gil-García C, de Godoi LAG, Fuess LT, Damianovic MHRZ. Performance improvement of a thermophilic sulfate-reducing bioreactor under acidogenic conditions: effects of diversified operating strategies. J Environ Manage 2018;207:303–12. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.11.043>.
- [70] Rogeri RC, Fuess LT, Eng F, Borges A do V, Araújo MN de, Damianovic MHRZ, et al. Strategies to control pH in the dark fermentation of sugarcane vinasse: impacts on sulfate reduction, biohydrogen production and metabolite distribution. J Environ Manage 2023;325:116495. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116495>.
- [71] Ceccato-Antonini SR. Conventional and nonconventional strategies for controlling bacterial contamination in fuel ethanol fermentations. World J Microbiol Biotechnol 2018;34:1. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2463-2>.
- [72] Aguiar MM, Wadt LC, Vilar DS, Hernández-Macedo ML, Kumar V, Monteiro RTR, et al. Vinasse biovalorization for enhancement of pleurotus biomass productivity: chemical characterization and carbohydrate analysis. Biomass Convers Biorefinery 2023;13:10031–40. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-02198-y>.
- [73] Ayodele DT, Ogunbiyi OD, Akamo DO, Otun KO, Akinpelu DA, Adegoke JA, et al. Factors affecting biohydrogen production: overview and perspectives. Int J Hydrogen Energy 2023;48:27513–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.04.001>.
- [74] Levin DB, Pitt L, Love M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. Int J Hydrogen Energy 2004;29:173–85. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(03\)00094-6](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(03)00094-6).
- [75] Kim DH, Han SK, Kim SH, Shin HS. Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. Int J Hydrogen Energy 2006;31:2158–69. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.02.012>.
- [76] Cazier EA, Trably E, Steyer JP, Escudie R. Biomass hydrolysis inhibition at high hydrogen partial pressure in solid-state anaerobic digestion. Bioresour Technol 2015;190:106–13. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.055>.
- [77] García-Depraet O, Mena-Navarro V, Muñoz R, Rene ER, León-Becerril E. Effect of nitrogen and iron supplementation on the process performance and microbial community structure of a hydrogen-producing reactor continuously fed with tequila vinasse. Fuel 2023;334:126736. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.126736>.
- [78] Bayu AI, Lestary RA, Dewayanto N, Mellyanawaty M, Wicaksono A, Alvania Kartika RW, et al. Kinetic study of thermophilic anaerobic digestion of sugarcane vinasse in a single-stage continuous stirred tank reactor. Results Eng 2022;14:100432. <https://doi.org/10.1016/j.rineng.2022.100432>.
- [79] Tena M, Luque B, Perez M, Solera R. Enhanced hydrogen production from sewage sludge by cofermentation with wine vinasse. Int J Hydrogen Energy 2020;45:15977–84. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.04.075>.
- [80] Fuess LT, Fuentes L, Bovio-Winkler P, Eng F, Etchebehere C, Zaiat M, et al. Full details on continuous biohydrogen production from sugarcane molasses are unraveled: performance optimization, self-regulation, metabolic correlations and quantitative biomass characterization. Chem Eng J 2021;414:128934. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.128934>.
- [81] Pouresmaeil S, Nosrati M, Ebrahimi S. Operating control for enrichment of hydrogen-producing bacteria from anaerobic sludge and kinetic analysis for vinasse inhibition. J Environ Chem Eng 2019;7:103090. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103090>.
- [82] Albanez R, Lovato G, Zaiat M, Ratusznei SM, Rodrigues JAD. Optimization , metabolic pathways modeling and scale-up estimative of an AnSBBR applied to biohydrogen production by co-digestion of vinasse and molasses. Int J Hydrogen Energy 2016;41:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.08.145>.
- [83] Peixoto G, Pantoja-filho JLR, Augusto J, Agnelli B, Barboza M, Zaiat M. Hydrogen and methane production , energy recovery , and organic matter removal from effluents in a two-stage fermentative process. Appl Biochem Biotechnol 2012;168:651–71. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9807-4>.
- [84] Tena M, Luque B, Solera R. Enhanced hydrogen production from sewage sludge by cofermentation with wine vinasse. Int J Hydrogen Energy 2020;45:15977–84. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.04.075>.
- [85] Ginkel SW Van, Logan B. Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. Water Res 2005;39:3819–26. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.07.021>.
- [86] Dessì P, Porca E, Waters NR, Lakanien AM, Collins G, Lens PNL. Thermophilic versus mesophilic dark fermentation in xylose-fed fluidized bed reactors: biohydrogen production and active microbial community. Int J Hydrogen Energy 2018;43:5473–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.01.158>.
- [87] Durre P. Handbook of Clostridia. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0020370>; 2005.
- [88] Bidart GN, Gharabli H, Welner DH. Functional characterization of the phosphotransferase system in *Parageobacillus thermoglucosidasius*. Sci Rep 2023;13:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33918-1>.
- [89] Dev C, Jilani SB, Yazdani SS. Adaptation on xylose improves glucose-xylose co-utilization and ethanol production in a carbon catabolite repression (CCR) compromised ethanologenic strain. Microb Cell Fact 2022;21:154. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01879-1>.
- [90] Karadagli F, Marcus AK, Rittmann BE. Role of hydrogen (H₂) mass transfer in microbiological H₂ threshold studies. Biodegradation 2019;30:113–25. <https://doi.org/10.1007/s10532-019-09870-1>.
- [91] Branska B, Vasylikivska M, Raschmanova H, Jureckova K, Sedlar K, Provaznik I, et al. Changes in efflux pump activity of *Clostridium beijerinckii* throughout ABE fermentation. Appl Microbiol Biotechnol 2021;105:877–89. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-11072-2>.
- [92] Mockaitis G, Bruant G, Guiot SR, Peixoto G, Foresti E, Zaiat M. Acidic and thermal pre-treatments for anaerobic digestion inoculum to improve hydrogen and volatile fatty acid production using xylose as the substrate. Renew Energy 2020;145:1388–98. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.06.134>.
- [93] Montoya-Rosales J de J, Ontiveros-Valencia A, Esquivel-Hernández DA, Etchebehere C, Celis LB, Razo-Flores E. Metatranscriptomic analysis reveals the coexpression of hydrogen-producing and homoacetogenesis genes in dark fermentative reactors operated at high substrate loads. Environ Sci Technol 2023;57:11552–60. <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c02066>.
- [94] Massanet-Nicolau J, Guwy A, Dinsdale R, Premier G, Esteves S. Production of hydrogen from sewage biosolids in a continuously fed bioreactor: effect of hydraulic retention time and sparging. Int J Hydrogen Energy 2010;35:469–78. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.10.076>.
- [95] Rajhi H, Puyol D, Martínez MC, Díaz EE, Sanz JL. Vacuum promotes metabolic shifts and increases biogenic hydrogen production in dark fermentation systems. Front Environ Sci Eng 2016;10:513–21. <https://doi.org/10.1007/s11783-015-0777-y>.
- [96] Sariapan AF, Reungsang A. Biohydrogen production by thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum KKKU-ED1: culture conditions optimization using mixed xylose/arabinose as substrate. Electron J Biotechnol 2013;16:1–17. <https://doi.org/10.2225/vol16-issue1-fulltext-1>.
- [97] Tomas AF, Karakashev D, Angelidaki I. Effect of xylose and nutrients concentration on ethanol production by a newly isolated extreme thermophilic bacterium. Water Sci Technol 2011;64:341–7. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.730>.
- [98] de Sá LRV, Faber M de O, da Silva ASA, Cammarota MC, Ferreira-Leitão VS. Biohydrogen production using xylose or xylooligosaccharides derived from sugarcane bagasse obtained by hydrothermal and acid pretreatments. Renew Energy 2020;146:2408–15. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.08.089>.
- [99] Tang J, Yuan Y, Guo WQ, Ren NQ. Inhibitory effects of acetate and ethanol on biohydrogen production of ethanologens *harbinense* B49. Int J Hydrogen Energy 2012;37:741–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.04.067>.
- [100] Xu JF, Mi YT, Ren NQ. Buffering action of acetate on hydrogen production by *Ethanoligenes harbinense* B49. Electron J Biotechnol 2016;23:7–11. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.07.002>.
- [101] Van Ginkel S, Logan BE. Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids. Environ Sci Technol 2005;39:9351–6. <https://doi.org/10.1021/es0510515>.
- [102] Gonzales RR, Kumar G, Sivagurunathan P, Kim SH. Enhancement of hydrogen production by optimization of pH adjustment and separation conditions following dilute acid pretreatment of lignocellulosic biomass. Int J Hydrogen Energy 2017;42:27502–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.05.021>.
- [103] Cota-Navarro CB, Carrillo-Reyes J, Davila-Vazquez G, Alatraste-Mondragón F, Razo-Flores E. Continuous hydrogen and methane production in a two-stage cheese whey fermentation system. Water Sci Technol 2011;367–75. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.631>.
- [104] Tsai Y, Du Y, Yang C. Anaerobic biohydrogen production from biodetoxified rice straw hydrolysate. J Taiwan Inst Chem Eng 2021;123:134–40. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2021.05.034>.
- [105] Carosia MF, dos Reis CM, Sakamoto IK, Varesche MBA, Silva EL. Influence of C/P and C/N ratios and microbial characterization in hydrogen and ethanol

- production in an anaerobic fluidized bed reactor. *Int J Hydrogen Energy* 2017;42: 9600–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.01.127>.
- [106] Clemens J, Trimborn M, Weiland P, Amon B. Mitigation of greenhouse gas emissions by anaerobic digestion of cattle slurry. *Agric Ecosyst Environ* 2006;112: 171–7. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2005.08.016>.
- [107] Wongthanate J, Mongkarothei K. Enhanced thermophilic bioenergy production from food waste by a two - stage fermentation process. *Int J Recycl Org Waste Agric* 2018;7:109–16. <https://doi.org/10.1007/s40093-018-0196-8>.
- [108] Shapovalov Y, Zhadan S, Bochmann G, Salyuk A, Nykyforov V. Dry anaerobic digestion of chicken manure: a review. *Appl Sci* 2020;10:1–24. <https://doi.org/10.3390/app10217825>.
- [109] Ribeiro AR, Devens KU, Camargo FP, Sakamoto IK, Varesche MBA, Silva EL. Evaluation of the effect of increasing the organic load in the thermophilic co-fermentation of sugarcane industry by-products on hydrogen, ethanol and lactic acid generation. *Int J Hydrogen Energy* 2024;57:549–61. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2024.01.028>.
- [110] Almeida P de S, Menezes CA de, Camargo FP, Sakamoto IK, Varesche MBA, Silva EL. Producing hydrogen from the fermentation of cheese whey and glycerol as cosubstrates in an anaerobic fluidized bed reactor. *Int J Hydrogen Energy* 2022;47:14243–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.02.176>.



Biogas potential of biowaste: A case study in the state of Rio de Janeiro, Brazil

Helena Rodrigues Oliveira^{a,b}, Betina Kozlowsky-Suzuki^{c,d,e}, Annika Björn^{f,g}, Sepehr Shakeri Yekta^{f,g}, Cristiane Fonseca Caetano^{a,b}, Érika Flávia Machado Pinheiro^h, Humberto Marottaⁱ, João Paulo Bassin^j, Luciano Oliveira^k, Marcelo de Miranda Reis^l, Mario Sérgio Schultz^m, Norberto Mangiavacchiⁿ, Viridiana Santana Ferreira-Leitão^{o,p}, Daniel Oluwagbotemi Fasheun^{o,p}, Fernanda Geraldo Silvaⁿ, Igor Taveira^{a,q}, Ingrid Roberta de França Soares Alves^l, Júlia Castro^{q,r}, Juliana Velloso Durão^k, Juliana Guimarães^{a,q}, Mariana Erthal Rochaⁿ, Marina Tomasini^{o,p}, Pedro Vitor de Oliveira Martins^o, Rogerio Presciliano^q, Stella Buback dos Santos^{o,p}, Tamires Marques Faria^s, Tarcísio Corrêa^a, Thiago de Nuno Mendes Pery de Linde^t, Fernanda Abreu^{a,q}, Alex Enrich-Prast^{b,f,g,u,*}

^a Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Unidade Multiusuário de Análises Ambientais, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Departamento de Ecologia e Recursos Marinhos, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 22290-240, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^d Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Biodiversidade Neotropical, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 22290-240, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^e Programa de Pós-graduação em Ecoturismo e Conservação, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 22290-240, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^f Department of Thematic Studies, Environmental Change, Linköping University, 581 83, Linköping, Sweden

^g Biogas Solution Research Center, Linköping University, 581 83, Linköping, Sweden

^h Departamento de Agrotecnologias e Sustentabilidade, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23890-000, Seropédica, RJ, Brazil

ⁱ Department of Geography, Graduate Program in Geosciences (Environmental Geochemistry), Biomass and Water Management Research Center (NAB-UFF), Ecosystems and Global Change Laboratory (LEMG-UFF)/International Laboratory of Global Change (LINCGlobal), Universidade Federal Fluminense, 24210-310, Niterói, RJ, Brazil

^j COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-594, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^k Energy Research Office, Environmental Department, 20091-040, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^l Defense Engineering Program, Instituto Militar de Engenharia (IME), 22290-270, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^m Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade - NUPEM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 27965-045, Macaé, RJ, Brazil

ⁿ Department of Mechanical Engineering, Group for Environmental Studies and Simulations (GESAR), Rio de Janeiro State University, 20940-903, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^o National Institute of Technology, Ministry of Science, Technology, and Innovation (MCTI), Laboratory of Biocatalysis, 20081-312, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^p Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-909, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^q Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^r Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^s Nuclear and Energy Research Institute (IPEN/USP - SP), University of São Paulo, 05508-000, São Paulo, SP, Brazil

^t Oceans and Land Dynamics Program, Geosciences Institute, Universidade Federal Fluminense, 24210-310, Niterói, RJ, Brazil

^u Institute of Marine Science, Federal University of São Paulo (IMar/UNIFESP), 11015-020, Santos, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Anaerobic digestion
Organic residues
Biogas potential estimation
Agricultural residues
Bioelectricity

ABSTRACT

Anaerobic digestion has been widely applied for waste treatment, renewable energy generation and biofertilizer production. The biogas potential in Brazil is sizable, but the state of Rio de Janeiro is largely dependent on fossil fuels, and there is a lack of biogas potential assessments in the state. Thus, this study evaluated biomethane, electricity and biofertilizer potentials in the region. Three different scenarios of biomass supply were considered for four major biowaste streams: sewage sludge; cattle manure; sugarcane processing waste; and food waste. Biomethane generation from the assessed sources could reach 0.6–1.3 billion Nm³ year⁻¹, corresponding to

* Corresponding author. Dept. of Thematic Studies – Environmental Change, Linköping University, 581 83, Linköping, Sweden.

E-mail address: alex.enrich.prast@liu.se (A. Enrich-Prast).

<https://doi.org/10.1016/j.renene.2023.119751>

Received 18 January 2023; Received in revised form 29 October 2023; Accepted 25 November 2023

Available online 29 November 2023

0960-1481/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1,768–3,961 GWh year⁻¹ of electricity and 1.6–3.3 million Mg year⁻¹ of biofertilizer. Cattle manure was responsible for 73–84% of the projected biomethane production, presenting an opportunity to reduce the significant emissions from livestock farming. The estimated biofertilizer production could meet the demands of the state, and the produced electricity could offset up to 10% of the demand. The gas grid could facilitate the distribution of upgraded biomethane, and 10–22% of the natural gas demand could be met. The findings of this work highlight the high potential for biogas generation in Rio de Janeiro, which is up to seven times larger than the current production.

Abbreviations	
AD	Anaerobic Digestion
ANP	National Agency for Petroleum, Natural Gas and Biofuels
CAM	Campos dos Goytacazes
COD	Chemical Oxygen Demand
CHP	Combined Heat and Power
DM	Dry Mass
FW	Food Waste
GHG	Greenhouse Gases
LPG	Liquefied Petroleum Gas
MRC	Macaé-Rio das Ostras-Cabo Frio
MSW	Municipal Solid Waste
OFMSW	Organic Fraction of Municipal Solid Waste
PET	Petrópolis
RJA	Rio de Janeiro
SS	Sewage Sludge
RJ	State of Rio de Janeiro
VS	Volatile Solids
VRB	Volta Redonda-Barra Mansa

1. Introduction

To meet the rise in energy consumption and the Sustainable Development Goals of the United Nations 2030 Agenda (SDG), a significant effort should be made to increase renewable energy production. Bio-based residues have been increasingly used to produce fuels, electricity and heat worldwide, increasing the valorization of organic wastes and demonstrating the concept of a circular biobased economy [1]. The conversion of biowaste into valuable products such as biogas and biofertilizers via anaerobic digestion (AD) represents a strategic circular biotechnology contributing to the offset of a fossil fuel-based economy. AD is applied to several organic substrates, e.g., animal manure, agricultural-based residues, food waste, and sewage sludge, to produce biogas, which is mainly composed of methane (CH₄) and carbon dioxide (CO₂) [2].

Biogas can be directly converted into energy and heat or upgraded to biomethane and injected into a natural gas grid, providing a renewable and clean energy source [3]. Furthermore, the residue from AD processes, called digestate, is commonly applied as biofertilizer, since it is usually rich in several nutrients, including nitrogen, potassium, and phosphorus [4,5]. Biofertilizers can reduce the use of NPK mineral fertilizers by 50%, resulting in better conditions for plant growth and decreased energy consumption [6,7]. Therefore, it is imperative that countries with agricultural production and low mineral fertilizer production, such as Brazil, implement sustainable solutions to ensure the supply of nutrients necessary for agriculture.

Denmark, Sweden and Germany are examples of European countries that successfully apply AD processes for waste treatment and energy generation, with strategic investments and policies that encourage biogas production and use [8,9]. In 2020, 18 billion m³ of biogas was

produced in Europe, and the aim is to reach 35 billion m³ by 2030 [10]. Although developing countries have large potential for the implementation of biogas solutions, they have a much lower biogas production rate, which is only 2.35 billion m³ year⁻¹ in Brazil, for example [11].

During the 21st Conference of the Parties (COP 21) of the United Nations Framework Convention on Climate Change (UNFCCC), held in 2015, Brazil presented its Intended Nationally Determined Contribution to reduce greenhouse gas (GHG) emissions by 43% until 2030 compared to 2005 levels [12]. The state of Rio de Janeiro (RJ) has the third largest population in Brazil, with over 17 million inhabitants living in a densely populated area [13], and accounts for 10% of the Brazilian gross domestic product [14]. Although it is one of the most developed states in Brazil, RJ relies heavily on nonrenewable fossil-based energy sources [15]. Furthermore, it exhibits high discharges of urban sewage [16] and biomass from rural areas [17], in addition to organic urban waste landfilling [18], which are important sources of soil, air and water degradation.

Therefore, the aim of this study is to assess the potential for biomethane and biofertilizer production associated with electrical power generation from major biowaste sources in RJ. Considering the lack of similar assessments in the region, this work could contribute to the promotion of biogas technology as a sustainable pathway to replace the current predominant fossil fuel-based economy and as a model for developing countries.

2. Material and methods

2.1. Study design and data compilation

Biogas potential was estimated for the five regions of RJ: Rio de Janeiro (RJA), Volta Redonda-Barra Mansa (VRB), Petrópolis (PET), Campos dos Goytacazes (CAM), and Macaé-Rio das Ostras-Cabo Frio (MRC). RJA is the most populous region; it is highly urbanized and houses the state's capital. CAM is the largest region, characterized by significant livestock and agricultural production, which is also seen to a lesser extent in PET. VRB also has some livestock production, while MRC is responsible for 13% of the state's crop production.

Based on their availability in RJ, four sources of biowaste were considered for AD: sewage sludge (SS), cattle manure, sugarcane processing waste, and food waste (FW). FW and SS are two major waste streams in highly populated and urban areas [19], which is the case for RJ [13]. Nearly 500 million m³ year⁻¹ of sewage is treated in the 371 treatment plants in RJ [20,21]. Although agricultural production in the state is less expressive than in other areas of Brazil, the sugarcane production of 2.4 million Mg year⁻¹ comprises almost 61% of the crop production in RJ [22]. With 2.6 million animals [23], cattle are the largest livestock source in the state and represents the largest contribution of RJ to Brazilian animal production [24].

A dataset was compiled from trusted public and private sources, as specified in the following sections. Three scenarios for potential biogas production were considered: minimum, medium and maximum, defined by different assumptions of substrate availability (Table 1). As a prospective approach to support the implementation of AD in developing countries, the potential for biomethane, electricity and biofertilizer production in the different regions of RJ was estimated by applying conversion values from the literature for each available biowaste

Table 1

Minimum, medium and maximum scenarios considered for the estimation of the biogas potential in the state of Rio de Janeiro.

Biowaste	Scenario		
	Minimum	Medium	Maximum
Sewage sludge	Sludge from 50% of treated sewage	Sludge from 100% of treated sewage	Sludge from 100% of collected sewage
Cattle manure	Dairy cattle and feedlot beef cattle manure	Dairy cattle and 50% beef cattle manure	Dairy cattle and 100% of beef cattle manure
Sugarcane processing waste	Waste from ethanol production (2021–2022 harvest season)	Waste from operation with 50% capacity in ethanol plants	Waste from operation with 100% capacity in ethanol plants
Food waste	25% of the generated food waste	50% of the generated food waste	100% of the generated food waste

(Table 2).

2.2. Waste and biomethane production estimation

2.2.1. Sewage sludge

The data on the amount of collected and treated sewage were obtained from the Water and Sewage Services Diagnosis of 2019, released by the Brazilian National System of Information on Water and Sanitation [20]. The minimum and medium potential scenarios considered only treated sewage for the estimation of SS availability for biogas production, while the maximum potential was based on all collected sewage. The biomethane production potential was calculated assuming a solid sludge generation of 350 g m⁻³ of treated sewage [25], a volatile solids (VS) content of 77.5% of dry mass (DM) [26] and an average biomethane yield for a mixture of primary and secondary sludge of 249.3 Nm³ Mg⁻¹ VS [27–29].

2.2.2. Cattle manure

The amount of cattle manure was estimated based on the total number of cows in RJ [23] and the percentage of feedlot beef cattle was obtained from the agricultural census [36]. The scenarios for the estimation of biogas and biofertilizer potential were designed according to the ease of manure collection, with the minimum potential scenario considering only feedlot cattle and the maximum potential scenario taking manure from all cattle into account. Manure production, VS content and biomethane yield were estimated according to Mito et al. [30]. For beef and dairy cattle, the daily manure production per animal was 43.9 and 93.7 L d⁻¹, the VS content was 80.19 and 68.59 g L⁻¹, and the biomethane yield was 230 and 210 Nm³ Mg⁻¹ VS, respectively. For biofertilizer estimation, DM was calculated considering a VS/DM content of 83.7% and 85.3% in beef and dairy manure, respectively [37].

2.2.3. Sugarcane processing waste

Quantification of sugarcane processing waste was conducted based on the ethanol production in the 2021/2022 harvesting season, according to the National Supply Company [33] or the ethanol production capacities of plants in RJ, as obtained from the National Agency for Petroleum, Natural Gas and Biofuels (ANP) database for biofuel producers [38]. The minimum potential scenario considered the ethanol production in RJ, while the medium and maximum scenarios considered 50% and 100% of the ethanol plants capacities, respectively. An average vinasse production of 13 L L⁻¹ ethanol [31] and an ethanol production of 72.4 L Mg⁻¹ sugarcane [33] were considered. The amounts of sugarcane straw and filter cake were 140 kg Mg⁻¹ sugarcane and 35 kg Mg⁻¹ sugarcane, respectively [34]. While all vinasse and filter cake generated were considered for AD, only 50% of the sugarcane straw was assumed to be available, as half of it is usually left in the field [39,40]. The chemical oxygen demand (COD), DM and VS contents of sugarcane processing

Table 2

Equations used to calculate the biomethane potential of different biowaste sources.

Equations	Variables
(1) $SS_t = \frac{SG \times Sewage}{10^6}$	• SS_t: sewage sludge (Mg DM year⁻¹) • SG: solid sludge generation (350 g DM m⁻³) [25] • $Sewage$: volume of sewage (m³ year⁻¹) [20]
(2) $BMP_{SS} = SS_t \times SS_{VS} \times Y_{SS}$	• BMP_{SS}: sewage sludge biomethane potential (Nm³ year⁻¹) • SS_{VS}: sewage sludge volatile solids (77.5% DM) [26] • Y_{SS}: sewage sludge biomethane yield (249.3 Nm³ Mg⁻¹ VS) [27–29]
(3) $BMP_{Dairy} = \frac{M_{Dairy} \times VS_{Dairy}}{10^6} \times Y_{Dairy} \times 365$	• BMP_{Dairy}: dairy cattle manure biomethane potential (Nm³ year⁻¹) • M_{Dairy}: dairy cattle daily manure production (93.7 L d⁻¹) [30] • VS_{Dairy}: dairy manure VS content (68.59 g L⁻¹) • Y_{Dairy}: dairy cattle manure biomethane yield (210 Nm³ Mg⁻¹ VS) [30]
(4) $BMP_{Beef} = \frac{M_{Beef} \times VS_{Beef}}{10^6} \times Y_{Beef} \times 365$	• BMP_{Beef}: beef cattle manure biomethane potential (Nm³ year⁻¹) • M_{Beef}: beef cattle daily manure production (43.9 L d⁻¹) [30] • VS_{Beef}: cattle manure VS content (80.19 g L⁻¹) • Y_{Beef}: beef cattle manure biomethane yield (230 Nm³ Mg⁻¹ VS) [30]
(5) $BMP_{CM} = BMP_{Dairy} + BMP_{Beef}$	• BMP_{CM}: cattle manure biomethane potential (Nm³ year⁻¹)
(6) $BMP_{Vin} = E \times SP_{Vin} \times \frac{COD_{Vin}}{1000} \times Y_{Vin}$	• BMP_{Vin}: sugarcane vinasse biomethane potential (Nm³ year⁻¹) • E: ethanol production (m³ year⁻¹) • SP_{Vin}: vinasse specific production (13 m³ m⁻³ ethanol) [31] • COD_{Vin}: sugarcane vinasse COD (27.25 g L⁻¹) [32] • Y_{Vin}: vinasse biomethane yield (274 Nm³ Mg⁻¹ COD) [32]
(7) $SC = \frac{E}{SP_E} \times 1000$	• SC: sugarcane used for ethanol production (Mg year⁻¹) • SP_E: ethanol specific production (72.4 L Mg⁻¹ sugarcane) [33]
(8) $BMP_{Str/FC} = \frac{SC \times SP_{Str/FC}}{1000} \times Y_{Str/FC}$	• $BMP_{Str/FC}$: sugarcane straw or filter cake biomethane potential (Nm³ year⁻¹) • $SP_{Str/FC}$: sugarcane straw or filter cake specific production yield (140 kg Mg⁻¹ sugarcane and 35 kg Mg⁻¹ sugarcane, respectively) [34] • $Y_{Str/FC}$: sugarcane straw or filter cake biomethane yield (129 Nm³ Mg⁻¹ and 54 Nm³ Mg⁻¹, respectively) [32]
(9) $BMP_{SW} = BMP_{Vinasse} + \frac{BMP_{Str}}{2} + BMP_{FC}$	• BMP_{SW}: sugarcane processing waste biomethane potential (Nm³ year⁻¹)
(10) $MSW_i = 365 \times \sum_i MSW_i \times Pop_i$	• MSW_i: Municipal solid waste (Mg year⁻¹) • MSW_i: per capita municipal solid waste generation of each municipality (Mg inhab⁻¹ d⁻¹) [25] • Pop_i: population of each municipality [13, 25]
(11) $FW = MSW_i \times \%OFMSW \times \%FW$	• FW: food waste (Mg year⁻¹) • $\%OFMSW$: organic fraction of municipal solid waste (53%) [25] • $\%FW$: food waste fraction of OFMSW (73%) [35]
(12) $BMP_{FW} = FW \times VS_{FW} \times Y_{FW}$	• BMP_{FW}: food waste biomethane potential (Nm³ year⁻¹) • VS_{FW}: food waste volatile solids content (%) [35] • Y_{FW}: food waste biomethane yield (341 Nm³ Mg⁻¹ VS) [35]

wastes were estimated according to Janke et al. [32]. The biomethane potentials for vinasse, straw and filter cake were $274 \text{ Nm}^3 \text{ Mg}_{\text{COD}}^{-1}$, $129 \text{ Nm}^3 \text{ Mg}^{-1}$ and $54 \text{ Nm}^3 \text{ Mg}^{-1}$, respectively [32].

2.2.4. Food waste

FW generation was estimated based on municipal solid waste (MSW) production, with 53% of the total MSW produced annually considered as the organic fraction of MSW (OFMSW) [25], while FW content was assumed to be 73% of OFMSW [35]. MSW production was based on the population [13] and per capita MSW generation index of the municipalities, provided by the State's Solid Waste Plan [25]. The minimum and medium potential scenarios considered that 25% and 50% of MSW would be destined for AD, which are the mid- and long-term goals of energy recovery from waste in the state [25]. The maximum scenario estimated the biogas potential from 100% of the FW generated in RJ. A biomethane potential of $341 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 \text{ Mg}^{-1}$ VS was considered for FW, assuming that all components of the OFMSW contribute equally to the mass of VS, so the average DM and VS contents for FW are 229.5 kg Mg^{-1} and 200.5 kg Mg^{-1} , respectively [35].

2.3. Biofertilizer potential

The potential for biofertilizer production (in DM) from the digestate generated in the biogas process of each biowaste stream considered in this study was calculated according to Eq. (13) [41]. The estimated DM and VS contents of the different biomasses were obtained from previous studies, as detailed in Sections 2.2.1–2.2.5 [26,30,37,32,35].

$$\text{Biofertilizer} = \text{DM} - \text{VS} + 0.4 \times \text{VS} \quad (13)$$

where DM is the dry mass and VS is the volatile solids of the biowaste (Mg).

2.4. Electricity production from biomethane

The potential electricity generation from the biomethane produced from each biowaste source was calculated using Eq. (14).

$$P = V_{\text{CH}_4} \times \text{LHV} \times \eta \quad (14)$$

where P is the potential electricity generated from biomethane (kWh year^{-1}), V_{CH_4} is the volume of biomethane produced ($\text{Nm}^3 \text{ year}^{-1}$), LHV is the lower heating value of methane ($9.97 \text{ kWh Nm}^{-3} \text{ CH}_4$) and η is the engine's conversion efficiency (30%) [35].

2.5. Greenhouse gases avoided emissions

The avoidance of GHG emissions by the implementation of AD to generate electricity and biomethane was calculated based on the emissions from conventional energy sources that would be replaced [35]. Net electricity generation from AD was calculated considering the difference between electricity produced from biomethane and electricity consumed in the AD process, which was $67.9 \text{ kWh Mg}^{-1} \text{ DM}$ of waste [42]. Avoided emissions were then calculated considering the net electricity generation and the current emissions of the Brazilian electricity mix ($78.8 \text{ kg CO}_{2\text{eq}} \text{ MWh}^{-1}$) [43]. For biomethane application as vehicle fuel, only the replacement of fossil fuels by biomethane in passenger cars was considered for the estimation of avoided emissions. Emission factors for gasoline and natural gas of 164 and $124 \text{ g CO}_{2\text{eq}} \text{ km}^{-1}$, respectively [44], and a biomethane consumption yield of 2.02 km Nm^{-3} [35] were applied in the calculations.

3. Results and discussion

A total annual production of up to 1324 million Nm^3 of CH_4 , 3961 GWh of electricity and 3.3 million Mg of biofertilizer could be obtained in RJ with the implementation of AD for treating the biowaste streams

assessed in this study (Table 3). The total potential from the medium and maximum scenarios was approximately 1.5 and 2.2 times higher than that from the minimum scenario. Cattle manure had by far the highest potential, being responsible for 73–84% of the total projected biomethane and electricity production and 78–87% of the biofertilizer production, while sewage sludge had the lowest potential (3–5%). Brazil is one of the largest cattle producers in the world; therefore, cattle manure management and its AD potential are important in the country [45].

3.1. Biomethane potential

Even the lowest estimated biomethane potential of 591 million $\text{Nm}^3 \text{ year}^{-1}$ is considerably larger than the current biogas production in RJ of 327 million $\text{m}^3 \text{ year}^{-1}$ [11]. Assuming a CH_4 content in biogas of 60% [46,47], the biomethane potentials calculated in the minimum and maximum scenarios were, respectively, 3.0 and 6.7 times larger than the current methane production in RJ. Among the different regions of RJ, the estimated potentials were much higher than the current production, except in RJA (Fig. 1). In this region, which is responsible for 88% of the state's biogas production, the minimum potential did not surpass the current production. This may be due to an underestimation of the potential in the minimum scenario, in addition to the presence of biogas production from industrial residues in RJA [11], which were not considered in this study. Furthermore, it is noteworthy that the region with the largest potential, CAM, is also the one with the least amount of biogas currently produced, since most of the production in the state comes from MSW and sewage treatment and is concentrated in the metropolitan area of the capital [11].

The geographical distribution of biomethane potential in RJ was different among the biowaste streams (Fig. 2). This is directly related to the different biowaste generation rates across the regions of the state (Table S1).

SS production from treatment plants in RJ was estimated to be $174,641 \text{ Mg DM year}^{-1}$, resulting in a potential biomethane production of 17 – 54 million $\text{Nm}^3 \text{ year}^{-1}$. RJA contains more than 3/4 of the total state population and presents by far the largest potential (83%) for biomethane production (Fig. 2A). Although it has the third largest population, VRB has the lowest methane potential (2% of the SS potential) in the minimum and medium scenarios, as less than 30% of the sludge is treated; in the maximum scenario, which considers the potential production if all collected sewage was treated, the contribution of this region increased to 5%. Conversely, the MRC region has one of the highest collected sewage treatment indices (85.8%), being responsible for a potential biomethane production of 2.5 million $\text{Nm}^3 \text{ year}^{-1}$ in the medium scenario.

Table 3

Potential biomethane, electricity and biofertilizer production from different biowaste sources in the state of Rio de Janeiro.

	Scenario	Biomethane (10^6 Nm^3 year^{-1})	Electricity (GWh year^{-1})	Biofertilizer (10^3 Mg year^{-1})
Sewage sludge	Minimum	16.9	50.5	46.7
	Medium	33.7	100.9	93.4
	Maximum	54.2	162.2	150.1
Cattle manure	Minimum	498.0	1489.6	1356.8
	Medium	733.6	2194.2	1966.0
	Maximum	972.6	2909.1	2584.0
Sugarcane processing waste	Minimum	30.6	91.5	74.3
	Medium	57.5	171.8	139.6
	Maximum	114.9	343.7	279.2
Food waste	Minimum	45.6	136.5	72.9
	Medium	91.3	272.9	145.8
	Maximum	182.5	545.9	291.5
Total	Minimum	591.1	1768.1	1550.7
	Medium	916.1	2739.8	2344.8
	Maximum	1324.3	3960.9	3304.8

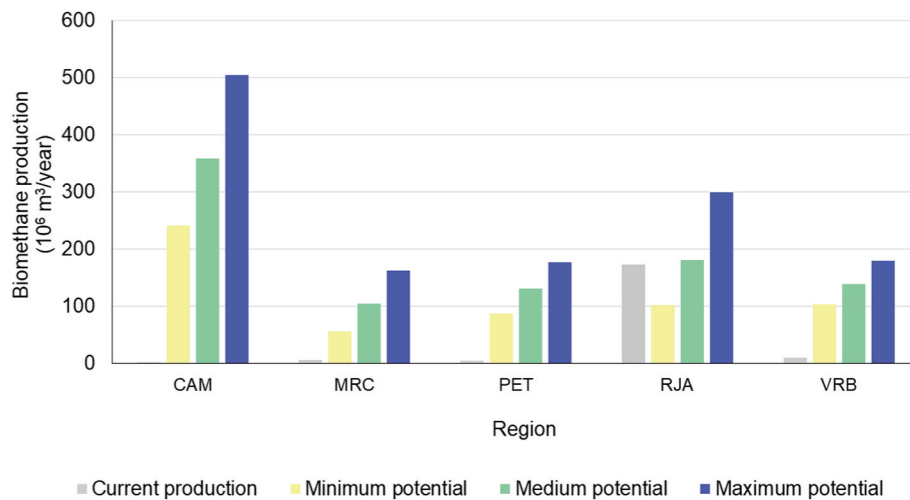


Fig. 1. Comparison of estimated biomethane potential with current production [11] considering a methane content of 60% in biogas. CAM: Campos dos Goytacazes; MRC: Macaé-Rio das Ostras-Cabo Frio; PET: Petrópolis; RJA: Rio de Janeiro; VRB: Volta Redonda-Barra Mansa.

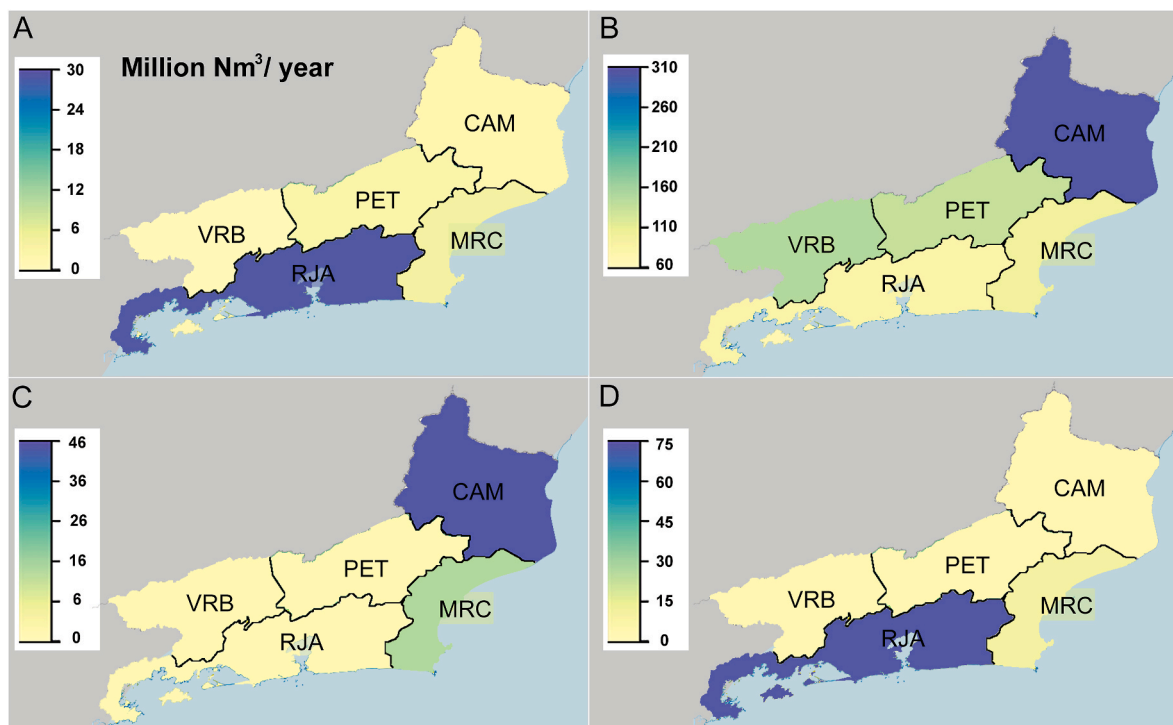


Fig. 2. Potential production of biomethane (million $\text{Nm}^3 \text{ year}^{-1}$) in the medium scenario from sewage sludge (A), cattle manure (B), sugarcane processing waste (C), and food waste (D) in the regions of the state of Rio de Janeiro. RJA: Rio de Janeiro; VRB: Volta Redonda-Barra Mansa; PET: Petrópolis; CAM: Campos dos Goytacazes. MRC: Macaé-Rio das Ostras-Cabo Frio.

When sludge from all collected sewage was considered (maximum scenario), the biomethane potential from SS increased by 61% in comparison with the scenario in which only sludge from treated sewage was considered for biogas production (medium scenario). Moreover, the potential for biomethane production from sewage that is neither collected nor treated also exists. In RJ, only 64% of the population has access to sanitation, 63% of the collected sewage is treated [20], and the development of sewage collection and treatment infrastructure would be needed for AD. The possibility for biogas production could become an additional motivation to develop more extensive sanitation programs.

According to the State's Solid Waste Plan [25], the generated sludge is placed in sanitary landfills throughout RJ. Therefore, the application of AD to treat this waste would allow for the recycling of nutrients and a

reduction in operating costs due to energy generation.

There are 2.6 million cattle heads in RJ, with 1.6 million beef cattle and 1.0 million dairy cattle. As most of the cattle in the state come from CAM, this region has the highest potential for biomethane production (42%) from cattle manure (Fig. 2B). The other regions each account for 9–20 % of the potential CH_4 generation, with the lowest potential in RJA, a highly urbanized area.

The cattle industry is responsible for 80% of the emissions from agricultural activities in RJ, with manure management alone contributing to the emission of 232 Gg $\text{CO}_{2\text{eq}}$ in 2015 [48]. Worldwide, less than 9% of the generated manure is treated, with most of it being left in the fields [49]. According to the World Biogas Association, livestock manure is one of the main sources of energy generation through AD [50] and is

expected to play a crucial role in most countries in future years, achieving up to 1900 million Nm^3 of methane every day [51]. Even if livestock farming is not the main economic activity of a region, this study shows that biogas production from livestock residues could be of extremely high value. Legislation to enforce and encourage manure treatment via AD and to stimulate its energetic use are needed to realize the global potential for biogas generation from manure [50].

Cattle for milk production are usually placed in a confined space twice a day; therefore, a significant amount of manure could be concentrated in these locations, which facilitates manure management. On the other hand, beef cattle are more dispersed, which makes manure management more difficult and expensive. As a result, 64% of dairy manure is treated in some way, while only 1% of beef cattle manure is adequately managed [49]. In RJ, most of the cattle production farms have relatively small pasture areas (<20 ha), especially in RJA, where 57% of the establishments have less than 10 ha of pasture, which could facilitate manure management [36]. There is a need to encourage the appropriate management of manure, especially that from beef cattle, to achieve a more sustainable production process.

Family farming is the basis for the cattle industry in RJ [22], with the average number of heads per producer being between 74 (PET) and 142 (VRB) [36]. Solutions for small producers depend on collaboration among farmers, who must gather enough raw material to enable biogas production. Most local milk producers are associated with cooperatives, and more than 65% of them use collective cooling tanks [52]. This indicates an existing relationship among farmers that could facilitate the development of joint AD facilities to collectively treat wastes and allow for an increase in scale. Another possibility is the establishment of centralized AD facilities near large producers, which would allow for high-capacity biogas plants, decreasing specific capital and operational costs of production [53].

There are four large sugar-ethanol processing plants in RJ, three of which are in CAM and one in MRC [38]. Altogether, they have the capacity to produce $1270 \text{ m}^3_{\text{ethanol}} \text{ d}^{-1}$, which would generate 6 million m^3 year⁻¹ of vinasse, 896 thousand Mg year⁻¹ of straw (with only half being considered for AD), and 224 thousand Mg year⁻¹ of filter cake. This capacity is much higher than the actual ethanol production, which was reported to be only $123,400 \text{ m}^3_{\text{ethanol}} \text{ year}^{-1}$ in the 2021/2022 harvest season. The biomethane potential would increase 276% if the full capacity was utilized (maximum scenario) in comparison to the current ethanol production (minimum scenario), presenting the potential to improve both bioethanol and biogas production in RJ. CAM is responsible for 79% of the biomethane production potential (Fig. 2C).

Vinasse and filter cake are generally used as fertilizers, but this practice might affect soil structure and cause contamination, salinization and acidification of soil, and surface and groundwaters [54,55]. Therefore, AD of these wastes could help to reduce the environmental impacts of ethanol production and allow for the recovery of energy and nutrients. However, low pH, low C:N ratio, and macro- and micro-nutrient deficiency [56] could hamper biogas production from vinasse. Vinasse also contains high concentrations of sulfur, leading to the formation of H_2S , which can impair biogas production and decrease biogas quality, requiring a desulfurization step [56].

RJA, where the state capital is located, has the highest population density [13] and per capita MSW generation index in the state ($1.19 \text{ kg inhabitant}^{-1} \text{ d}^{-1}$) [25] and thus has the highest potential for biomethane production from the AD of FW (82%) (Fig. 2D).

Source-segregated organic waste is preferable for AD since it facilitates reactor maintenance and digestate processing, allowing the digestate to meet the criteria needed to be used in food production [57]. In RJ, there is no collection of source-separated organic waste, but some municipalities have specific legislation [25] for the separate collection of organic residues from large waste generators, such as restaurants and supermarkets.

Although this residue is usually disposed in sanitary landfills, which wastes opportunities for resource recovery and energy generation,

organic waste from large generators is currently being used in a pilot plant in Rio de Janeiro City for the production of biomethane [35]. According to the National Solid Residue Plan [58], this is the only facility in RJ where AD technology is applied to OFMSW, of which 73% is FW [35], and the facility can treat up to 30 Mg d^{-1} , producing $1000 \text{ Nm}^3 \text{ d}^{-1}$ of biomethane. This plant also produces digestate, which is used by the municipality in reforestation programs [59]. However, the treatment capacity of this facility corresponds to only 0.4% of the FW production in RJ, showing the need for the implementation of policies to increase sustainable organic waste management.

Solid waste management measures in Brazil are focused on eliminating improper waste disposal, so the implementation of source-segregation could be difficult, requiring a change in societal behavior and the enforcement and promotion of new public policies. Thus, post-separation technologies would be essential at present for separating FW from MSW.

3.2. Application of biogas to offset electricity and fossil-fuel demands in the state of Rio de Janeiro

The produced biogas could be used as a substitute for cooking gas. The application of biogas from small-scale plants for cooking has environmental, economic, and social benefits for rural and low-income areas [60,61]. This could help offset the effects of the rising liquefied petroleum gas (LPG) prices in RJ. In 2020, 3.2 million tons of LPG were used in the whole Southeast region of Brazil [62], which is equivalent to nearly 41,464 GWh [63], which could be offset by 14–32% by the energetic potential of methane estimated in this study.

RJ already has a natural gas distribution grid connecting its five regions, covering almost 60% of the municipalities (Fig. 3), that could be used for biomethane distribution. RJA has several municipalities connected to the grid, while CAM, which has the highest biomethane potential, has only one. However, the only two current biogas facilities that produce biomethane in the state do not inject it into the gas grid; instead, they sell it directly to the final consumer (e.g., gas stations and industrial clients) [46], which can be attributed to inconsistencies in the legislation for biomethane distribution (Section 3.5).

The produced biomethane could be easily distributed to households and businesses connected to the natural gas distribution grid. According to the natural gas distributor in RJ, Naturgy, 16.6 million m^3 of gas is distributed every day, which would be equivalent to a demand of nearly 6.1 billion m^3 every year [64,65]. The estimated biomethane production could provide between 10 and 22% of this demand, reducing dependency on fossil fuels and improving the contribution of renewable energy sources in the state. Biomethane is commonly applied in the vehicle fuel sector in countries such as Sweden [8]. Although the number of vehicles that use biomethane in RJ is quite low (286), more than 1.3 million vehicles run on natural gas (Fig. S1), highlighting an enormous market for biomethane. Almost 3.4 million $\text{m}^3 \text{ day}^{-1}$ of natural gas is commercially used as vehicle fuel [64,65], and all this demand could be supplied by biogas production from the sources selected in this study. The development of biogas solutions in the state could encourage a shift in vehicle fuel consumption, along with government policies and incentives for the production and use of renewable energy.

Despite economic advantages, the initial investments into biogas upgrading can be costly [66], and the produced biomethane would have to be competitive with natural gas. Alternatively, biogas could be used for heat and electricity production in a CHP system. The electricity could help supply the biogas plant and waste-generating activities (e.g., farms, sugar-ethanol plants, and wastewater treatment systems). For example, sewage treatment plants that use activated sludge systems have very high electricity demands associated with the aeration of reactors, and the integration of CHP is the most accepted option to increase energy recovery [67]. In RJ, the total electricity consumption in sewage systems is approximately $107 \text{ GWh year}^{-1}$ [20], of which 47% could be supplied by electricity generation from biogas from SS in the more conservative

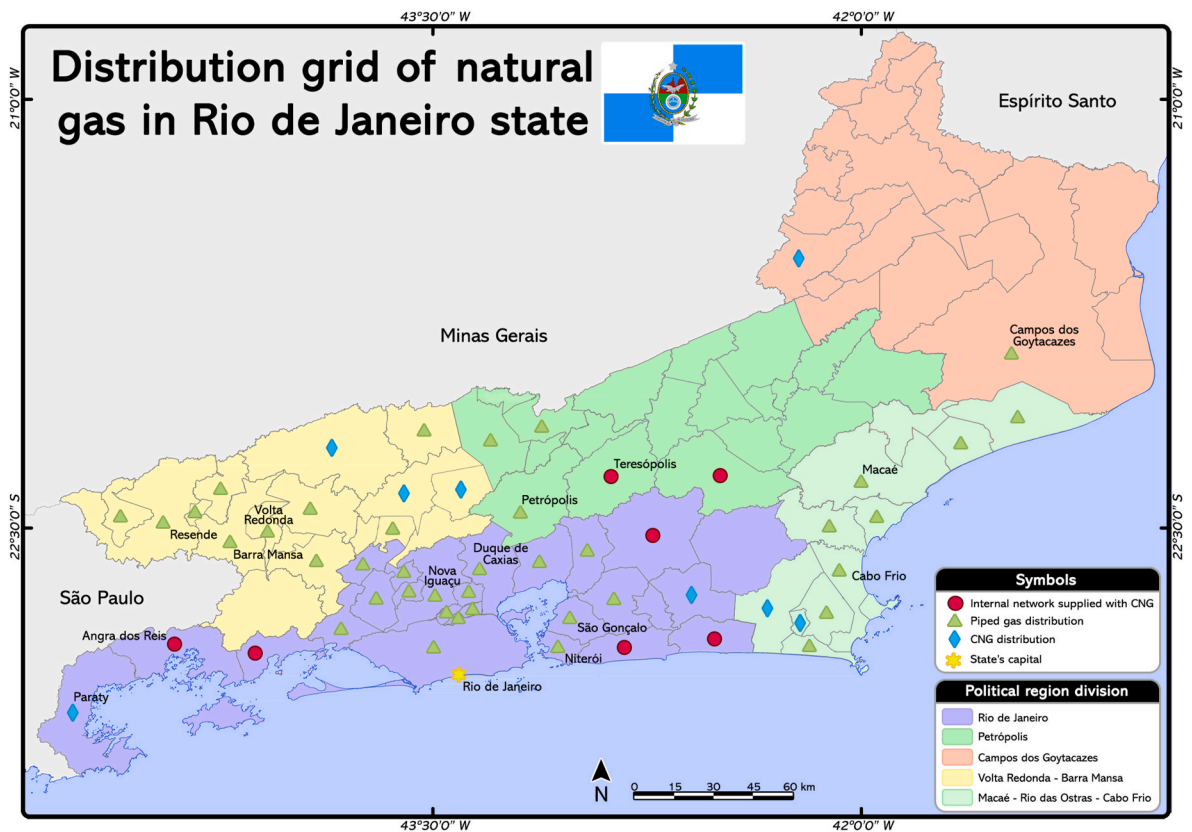


Fig. 3. Gas distribution in the state of Rio de Janeiro [64,65]. Compressed Natural Gas (CNG).

scenario. With the expansion of sewage treatment and the AD of sewage sludge (maximum potential scenario), all electricity could be provided by biogas, and profits could be obtained from selling the excess energy.

If the electricity is not used within the biogas plant, it could be distributed locally. A total of 39,244 GWh was consumed in RJ in 2019 [68]; thus, the electricity potential estimated from all streams considered in our study could offset 5–10% of the electricity from the power grid. Heat is also generated within the system, which could be utilized in other parts of the process, such as during pretreatment or for heating reactors.

3.3. Digestate utilization: achieving a circular economy

Digestate can help neutralize acid soils, since its pH usually ranges from 7 to 8.5, and enhance soil fertility, both as a source of nutrients [69] and by improving soil cation exchange capacity, which is crucial for RJ low fertility soils. It can also be used as a substrate for plant beds, especially for Atlantic Forest trees in RJ [70]. In summary, digestates from suitable feedstocks could act as secondary nutrient sources, promoting a circular biobased economy.

CAM has the highest potential for biofertilizer production from AD of

Table 4
Biofertilizer and nutrient production from digestate and demand in each region of the state of Rio de Janeiro. CAM: Campos dos Goytacazes; MRC: Macaé-Rio das Ostras-Cabo Frio; PET: Petrópolis; RJA: Rio de Janeiro; VRB: Volta Redonda-Barra Mansa.

Region	Scenario	Biofertilizer (Mg year ⁻¹)	N (Mg year ⁻¹)	P (Mg year ⁻¹)	K (Mg year ⁻¹)
CAM	Minimum	648,331	29,160	7,923	41,299
	Medium	947,999	41,580	11,297	60,582
	Maximum	1,314,190	54,696	14,841	84,604
MRC	Minimum	148,853	6,633	1,861	9,237
	Medium	271,945	12,091	3,404	16,832
	Maximum	413,827	17,691	4,941	25,811
PET	Minimum	304,847	14,918	4,096	18,968
	Medium	415,815	20,354	5,613	25,741
	Maximum	531,559	26,015	7,215	32,658
RJA	Minimum	238,257	11,947	4,052	10,840
	Medium	407,069	20,498	7,181	17,313
	Maximum	643,417	31,907	11,314	25,760
VRB	Minimum	210,423	10,283	2,822	13,071
	Medium	301,928	14,750	4,063	18,662
	Maximum	401,849	19,691	5,510	24,445
Total	Minimum	1,550,711	72,941	20,754	93,416
	Medium	2,344,756	109,274	31,557	139,130
	Maximum	3,304,842	150,000	43,820	193,279
RJ Demand ^a	-	52,802	8,976 ^b	5,280 ^b	7,920 ^b

^a Source: NPCT [72].
^b Considering the N–P–K composition of the southeast region of Brazil (17-10-15%).

the studied biowastes, with more than twice the potential of any other region, while MRC has the lowest potential (Table 4). The produced biofertilizer can be used in agricultural production, since CAM is responsible for 61% of the state's production, mainly related to sugarcane [22]. Alternatively, the biofertilizer could be used for the cultivation of soybean and other grains, which has been encouraged and identified as one alternative to occupy the areas that were previously used by sugarcane in the North and Northwest of Rio de Janeiro [71].

The biofertilizer production projected in this study could surpass the fertilizer demand in RJ, of 52,802 Mg year⁻¹ [72], providing at least 8, 4 and 12 times the amount of N, P and K needed, respectively. In the maximum potential scenario, the application of AD to treat the studied wastes could provide up to 17, 8 and 24 times the needed N, P and K, respectively. The replacement of mineral fertilizers for biofertilizers usually results in a reduction in GHG emissions and energy consumption in fertilizer production, reducing the use of fossil fuels [7,73].

Digestate characteristics vary widely with feedstock. Digestate from FW has the highest nitrogen (N) content, while that from SS has the highest phosphorus (P) concentration, and those from cattle manure and sugarcane waste have the highest potassium (K) content (Table S2). Biosolids produced from sewage treatment stations in RJ after AD and drying are suitable for agricultural application, complying with the legal quality requirements [70,74], but sludge is landfilled due to the absence of a state sludge recycling program [25,70]. Cattle manure and OFMSW-based digestates can have pathogens, impurities and contaminants, which negatively affect digestate processing and the possibility of land application [57,75,76].

Furthermore, for farmland application, the land should be located near the biogas plant, and for land that is farther away, volume reduction and digestate treatment must be considered to reduce transportation costs [5,57]. For longer distances, ammonia stripping can result in cost reduction, and if a CHP system is used, excess heat can be used to increase stripping efficiency [5]. Additionally, pelletization of the end-product may improve its fertilization properties, reduce transportation costs and facilitate land application [75].

Since the calculated digestate potential is much higher than the fertilizer demand in RJ, alternative uses in addition to soil application should be considered. For example, co-combustion of digestate can be performed for power generation [57]. Thermal conversion technologies such as combustion, pyrolysis and gasification are usually applied for energy recovery from digestate while also producing biochar, which could be utilized as a soil amendment [75]. Gasification is commercially available for urban digestates, and several operating plants exist in the United States [75]. The produced gas could be used either in pretreatment steps, to heat the reactor or in the digestate drying process.

3.4. Avoided greenhouse gas emissions

Brazil has one of the most sustainable energy matrices mainly due to the contribution of sugarcane biomass (19%) and hydropower (13%), with 48% of the energy produced coming from renewable sources (Fig. S2A) in 2020, in comparison with 14% in the world [77]. However, in 2016 (the latest available data), RJ was strongly dependent on nonrenewable sources for energy (88%) and electricity (78%) production [15] (Fig. S2).

Studies have noted that the energy produced from biogas contributes to lower GHG emissions compared to fossil fuels [78,79]; therefore, the implementation of AD technology can help improve the energetic status of RJ. Emissions of up to 439 thousand Mg CO_{2eq} could be avoided if gasoline was replaced by the estimated biomethane produced from the studied biowaste streams as vehicle fuel. A total of 332 thousand Mg CO_{2eq} would be avoided if natural gas was replaced. In this study, only passenger vehicles were considered, and further opportunities for GHG reduction exist if biomethane was used in heavy transportation.

If biogas is used to generate electricity, the emission of 275 thousand Mg CO_{2eq} could be avoided based on the Brazilian electricity mix. If the

RJ electricity mix were to be considered, this impact would be even higher due to the higher dependency of the state on nonrenewable sources (Fig. S2B). However, it is important to emphasize that anaerobic digester energy and GHG emissions can differ depending on the input substrates and end-use applications [80], which could change the value of the calculated avoided emissions.

Due to its higher biomethane potential, CAM is the region that could have the largest avoided GHG emissions, with 104, 167 and 126 thousand Mg CO_{2eq} avoided when biomethane is used to substitute electricity, gasoline, and natural gas, respectively (Fig. S3). Conversely, the MRC region has the lowest reduction potential, with less than 54 thousand Mg CO_{2eq} avoided for these applications. RJA, which is the most urbanized region, could achieve up to 99 thousand Mg CO_{2eq} avoided.

3.5. Current legal framework

In Brazil, in addition to legislation regulating biogas production and its subsequent commercialization and consumption, there are also policies to encourage or enforce the use of renewable energy sources (Table S3). One of the most important policies in the biogas scenario is the National Biofuels Policy (RenovaBio - law 13,576/2017). It aims to promote the increase of biofuel contribution in the energy matrix, with an emphasis on energy security and efficiency, predictability in the fuel market and reduction of GHG emissions at all stages.

The Brazilian Electricity Regulatory Agency (ANEEL) provides tax reductions for power plants that use biodigestion (Normative Resolution 77/2004) and allows that the energy generated from renewable sources to be used by producers or be distributed in the local electricity grid (Normative Resolution 482/2012). Additionally, ANP sets standards for quality control and specifications for biomethane destined for vehicular use and use in residential, industrial, and commercial installations to be sold throughout Brazil (Normative Resolution 685/2017, Resolution 08/2015). This allowed the first authorization for commercialization of biomethane from landfills in the state (ANP Dispatch 1,084/2017).

In RJ, there is also a legal framework that could influence the development of the biogas sector, with the aim being to increase energy generation from renewable sources (Decree 41,318/2008, Law 5,690/2010, Resolution 65/2012, Law 6,361/2012, Decree 46,476/2018). However, many of the goals have not yet been executed or evaluated. The State Policy of Renewable Gas should be highlighted, as it encourages the production and consumption of biomethane in RJ and states that gas distributors must replace 10 % natural gas with biomethane when available. However, it also establishes a maximum price for biomethane sale to natural gas distribution companies, which is often not advantageous for biomethane producers, who currently choose to sell biomethane directly to the final consumer.

Despite the number of policies in place that encourage the production and use of renewable energy, few are focused on biogas and other AD products. This clearly indicates that a governmental agenda focused on legal, political, and regulatory challenges is necessary to allow for the development of AD technology in Brazil [81].

3.6. Challenges for biogas production in the state of Rio de Janeiro and comparison with other regions

Despite the importance of RJ to the national economy, the state has only 10 (out of 755) biogas plants under operation, that are responsible for approximately 17% of the biogas in Brazil [47]. Our estimates, however, indicate that RJ alone could approach the current biogas production of the entire Southeast region (1.42 billion Nm³) [47]. This region, which comprises RJ, São Paulo, Minas Gerais and Espírito Santo, is responsible for 60% of the current national production, with São Paulo being the largest regional and national producer. Despite the fact that 84% of the biogas plants in the Southeast region belong to the agricultural and livestock sectors, and the enormous biogas potential of cattle

manure in RJ, no biogas plant in the state currently treats these feedstocks. A previous assessment of the biomethane potential in the state of São Paulo [82], estimated a potential production of 2,992 million m^3 year⁻¹, which is 3.5 times higher than the estimated potential in our maximum scenario. This difference was expected, since São Paulo has a much larger population and more expressive agricultural activity [13, 24,83]. Similar to our findings, the estimation was significantly higher than the current biogas production in the state.

In spite of all this potential, hindrances to expansion are manifold. They include a low level of knowledge about biogas and the use of cheaper and less technologically challenging options (e.g., composting), a mismatch in funding opportunities and financial requirements for biogas projects, poor interactions among actors, and high variability in geography and types of feedstocks, which collide with a highly centralized policy development, and the lack of a national biogas agenda [84–86]. Many of the specific barriers for biogas development noted in the present study, such as poor collection and segregation of waste, long digestate transportation distances, and lack of political support are also present in other Latin American and developing countries [87].

We compared our estimates with some recently published biomethane potential data from the world's leading producers of sugarcane and cattle manure and/or upper middle-income level countries with considerable agriculture production. Large variation in biomethane potential between regions or states is, for instance, also observed in India, China, Thailand and Turkey [88–91]. In our study, the largest potential comes from CAM mostly due to a combined potential of cattle manure and sugarcane processing waste (Figs. 1 and 2) with estimates that are comparable to those from regions with low to moderate potentials from animal and agricultural residues in Turkey (52–472 million Nm^3 year⁻¹) [90], India (150–600 million Nm^3 year⁻¹) [88]; Thailand (<819 million Nm^3 year⁻¹) [91] or in the Hubei Province in China (<494 million Nm^3 year⁻¹) [89]. Although Brazil is the world's largest producer of sugarcane and one of the largest cattle producers, production in RJ is not as expressive. For instance, while the Southeast region is responsible for 63% of the sugarcane produced in Brazil, the contribution of RJ is only 0.3% [33].

The International Energy Agency [92] reported the potential for biogas generation throughout the world. While Europe generates more than twice the biogas of China, which is the second largest producer, Asia, Central and South America have much higher potential than Europe. Successful biogas production has been shaped by the application of policies and incentives to realize existing potential. Therefore, developing countries located in Asia, and in Central and South America have much scope for increasing biogas production, if adequately supported. Accordingly, assessing the potential in these regions is the first step to promote a discussion of the development of AD.

Regarding biogas end utilization, almost two-thirds of the global biogas generated in 2018 was used for electricity and heat generation, with only a small share upgraded to biomethane [92]. One reason for this is a gap between natural gas and biomethane prices in Central and South America. Biomethane production from landfill gas upgrading is typically the least expensive option.

Northern Europe has the largest proportion of renewable energy within Europe, with most of it coming from bioenergy generation [93], and can be used as an example of successful implementation of bioenergy. In Germany, which is the largest biogas producer in the region, 92% of biogas comes from agricultural plants [93]. This highlights that the development of biogas solutions in rural areas may be an important driving force in establishing a strong biogas sector. The benefits go beyond bioenergy and biofuel production, and the abatement of GHG emissions, with clear positive outcomes regarding employment and development of rural areas and an increase in energy security [93,94].

4. Conclusion

This study showed substantial potential for biogas generation from

different biowastes in RJ, especially via AD of cattle manure, which was the substrate with the highest estimated potential. Potential biomethane generation from the assessed biowaste streams was at least three and up to seven times greater than the current production in RJ and would be able to considerably offset the cooking gas, natural gas, or electricity demands of the state. The presence of a gas distribution grid throughout the state could be an important factor promoting the utilization of the produced biomethane as a substitute for natural gas. Furthermore, the biofertilizer potential would be enough to supply the nutrient demand for agriculture in the state, even in the most conservative scenario, and the digestate could be valorized in other ways. To date, the existing legal framework does not consider the specificities of the biogas industry, and policy implementation needs to be improved.

CRedit authorship contribution statement

Helena Rodrigues Oliveira: Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing – original draft. **Betina Kozłowsky-Suzuki:** Writing – original draft, Conceptualization, Writing – review & editing. **Annika Björn:** Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing. **Sepehr Shakeri Yekta:** Supervision, Writing – review & editing. **Cristiane Fonseca Caetano:** Writing – review & editing. **Érika Flávia Machado Pinheiro:** Writing – review & editing. **Humberto Marotta:** Writing – review & editing. **João Paulo Bassin:** Writing – review & editing. **Luciano Oliveira:** Writing – review & editing. **Marcelo de Miranda Reis:** Writing – review & editing. **Mario Sérgio Schultz:** Writing – review & editing. **Norberto Mangiavacchi:** Writing – review & editing. **Viridiana Santana Ferreira-Leitão:** Writing – review & editing. **Daniel Oluwagbotemi Fasheun:** Methodology, Investigation. **Fernanda Geraldo Silva:** Methodology, Investigation. **Igor Taveira:** Methodology, Investigation. **Ingrid Roberta de França Soares Alves:** Methodology, Investigation. **Júlia Castro:** Methodology, Investigation. **Juliana Velloso Durão:** Methodology, Investigation, Writing – review & editing. **Juliana Guimarães:** Methodology, Investigation. **Mariana Erthal Rocha:** Methodology, Investigation. **Marina Tomasini:** Methodology, Investigation. **Pedro Vitor de Oliveira Martins:** Methodology, Investigation. **Rogério Presciliano:** Methodology, Investigation. **Stella Buback dos Santos:** Methodology, Investigation. **Tamires Marques Faria:** Methodology, Investigation. **Tarcísio Corrêa:** Methodology, Investigation. **Thiago de Nuno Mendes Pery de Linde:** Methodology, Investigation. **Fernanda Abreu:** Supervision, Writing – review & editing, Visualization, Writing – review & editing. **Alex Enrich-Prast:** Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This work was developed during the course “Biogas and biofertilizer production” coordinated by Linköping University, Sweden, and the authors thank the Graduate Program in Biological Sciences (Neotropical Biodiversity) - PPGBIO at Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO) for hosting the course. The study received financial support from Vinnova (project number 2019–05382) by the Swedish Energy Agency [Grant number: 35624-2] conducted within the Biogas Research Solution Center hosted by Linköping University, Sweden and by the funding agency Formas [Grant number: 2021-02429]. The authors also thank the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.renene.2023.119751>.

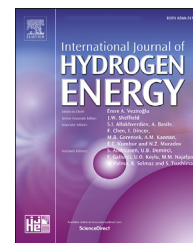
References

- [1] A. Fagerström, T. Al Seadi, S. Rasi, T. Briseid, The role of anaerobic digestion and biogas in the circular economy, IEA Bioenergy Task 37 (2018). https://www.iea-bioenergy.com/wp-content/uploads/2018/08/anaerobic-digestion_web_END.pdf%0A. https://www.iea-bioenergy.com/wp-content/uploads/2018/08/anaerobic-digestion_web_END.pdf%0A. http://task37.iea-bioenergy.com/files/daten-redaktion/download/Technical_Bro.
- [2] EBA, Biogas Basics, 2019.
- [3] I. Angelidaki, L. Xie, G. Luo, Y. Zhang, H. Oechsner, A. Lemmer, R. Munoz, P. G. Kougias, Biogas upgrading: current and emerging technologies, in: Biofuels Altern. Feed. Convers. Process. Prod. Liq. Gaseous Biofuels, second ed., Academic Press, 2019, pp. 817–843, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816856-1.00033-6>.
- [4] W.A.V. Stiles, D. Styles, S.P. Chapman, S. Esteves, A. Bywater, L. Melville, A. Silkina, I. Lupatsch, C. Fuentes Grünwald, R. Lovitt, T. Chaloner, A. Bull, C. Morris, C.A. Llewellyn, Using microalgae in the circular economy to valorise anaerobic digestate: challenges and opportunities, Bioresour. Technol. 267 (2018) 732–742, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.100>.
- [5] B. Drogg, W. Fuchs, T. Al Seadi, M. Madsen, B. Linke, Nutrient Recovery by Biogas Digestate Processing, 2015. http://www.iea-biogas.net/files/daten-redaktion/download/Technical_Brochures/NUTRIENT_RECOVERY_RZ_web1.pdf%5Cn. http://www.iea-biogas.net/files/daten-redaktion/download/Technical_Brochures/NUTRIENT_RECOVERY_RZ_web2.pdf.
- [6] A. Cisse, A. Arshad, X. Wang, F. Yattara, Y. Hu, Contrasting Impacts of Long-Term Application of Biofertilizers and Organic Manure on Grain Yield of Winter Wheat in North China Plain, vol. 9, Agronomy, 2019, <https://doi.org/10.3390/agronomy9060312>.
- [7] B. Dubis, A. Szatkowski, K.J. Jankowski, Sewage sludge, digestate, and mineral fertilizer application affects the yield and energy balance of Amur silvergrass, Ind. Crops Prod. 175 (2022), <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114235>.
- [8] M. Falde, M. Eklund, Towards a sustainable socio-technical system of biogas for transport: the case of the city of Linköping in Sweden, J. Clean. Prod. 98 (2015) 17–28, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.05.089>.
- [9] J. Edwards, M. Othman, S. Burn, A review of policy drivers and barriers for the use of anaerobic digestion in Europe, the United States and Australia, Renew. Sustain. Energy Rev. 52 (2015) 815–828, <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.112>.
- [10] EBA, Breaking Free of the Energy Dependency Trap, Delivering 35 Bcm of Biomethane by 2030, 2022. <https://www.europeanbiogas.eu/wp-content/uploads/2022/04/REPowerEU-with-biomethane-EBA.pdf>.
- [11] BiogasMap Cibiogas. <https://mapbiogas.cibiogas.org/>, 2022. (Accessed 1 February 2022).
- [12] CEBDS, Opportunities and Challenges of the Brazilian NDC Commitments for the Business Sector, 2017. Rio de Janeiro, https://cebds.org/wp-content/uploads/2017/06/CEBDS_NDC_SUMEX_ING_navegavel.pdf.
- [13] IBGE, Cidades, 2021. <https://cidades.ibge.gov.br/>. (Accessed 30 August 2021).
- [14] IBGE, Produto Interno Bruto dos Municípios. [https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/contas-nacionais/9088-produto-interno-bruto-dos-municipios.html? t=pib-por-municipio&c=3304557](https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/contas-nacionais/9088-produto-interno-bruto-dos-municipios.html?t=pib-por-municipio&c=3304557), 2018.
- [15] A.O.P. Pereira Jr., Matriz Energética Do Estado do Rio de Janeiro: 2017-2031, Synergia, Rio de Janeiro, 2018.
- [16] A.S. Fries, J.P. Coimbra, D.A. Nemazie, R.M. Summers, J.P.S. Azevedo, S. Filoso, M. Newton, G. Gelli, R.C.N. de Oliveira, M.A.R. Pessoa, W.C. Dennison, Guanabara Bay ecosystem health report card: science, management, and governance implications, Reg. Stud. Mar. Sci. 25 (2019), 100474, <https://doi.org/10.1016/j.rsm.2018.100474>.
- [17] V.E.N. Santos, A. Magrini, Biorefining and industrial symbiosis: a proposal for regional development in Brazil, J. Clean. Prod. 177 (2018) 19–33, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.12.107>.
- [18] L.S. Franca, G.M. Ribeiro, G. de L.D. Chaves, The planning of selective collection in a real-life vehicle routing problem: a case in Rio de Janeiro, Sustain. Cities Soc. 47 (2019), 101488, <https://doi.org/10.1016/j.scs.2019.101488>.
- [19] F. Battista, N. Frison, P. Pavan, C. Cavinato, M. Gottardo, F. Fatone, A.L. Eusebi, M. Majone, M. Zeppilli, F. Valentino, D. Fino, T. Tommasi, D. Bolzonella, Food wastes and sewage sludge as feedstock for an urban biorefinery producing biofuels and added-value bioproducts, J. Chem. Technol. Biotechnol. 95 (2020) 328–338, <https://doi.org/10.1002/jctb.6096>.
- [20] SNIS, Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgoto - 2019, 2020.
- [21] GEOINEA, Esgotamento Geral: Estações de Tratamento - ERJ, 2023. <https://geoportal.inea.rj.gov.br/portal/apps/mapviewer/index.html?layers=c7acdb23633e4a0891040891fa19008d&layerid=1>. (Accessed 10 October 2023).
- [22] EMATER-RIO, RELATÓRIO POR MUNICÍPIOS DO SISTEMA ASPA/AGROGEO, 2019. <http://www.emater.rj.gov.br/images/municipios2019.htm>. (Accessed 20 October 2020).
- [23] EMATER-RIO, Bovinocultura, Pecuária de Leite/Corte, 2019.
- [24] IBGE, Pesquisa, Pecuária Municipal, 2019. <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/tabelas/brasil/2019>. (Accessed 20 October 2020).
- [25] Rio de Janeiro, Plano Estadual de Resíduos Sólidos do Rio de Janeiro, Relatório Síntese, Rio de Janeiro, 2013.
- [26] M. von Sperling, R.F. Gonçalves, Sludge characteristics and production, in: C. V. Andreoli, M. von Sperling, F. Fernandes (Eds.), Sludge Treat. Dispos, IWA Publis, 2007, <https://doi.org/10.2166/9781780402130>.
- [27] V. Cabbai, N. De Bortoli, D. Goi, Pilot plant experience on anaerobic codigestion of source selected OFMSW and sewage sludge, Waste Manag. 49 (2016) 47–54, <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.12.014>.
- [28] G. Silvestre, A. Bonmati, B. Fernández, Optimisation of sewage sludge anaerobic digestion through co-digestion with OFMSW: effect of collection system and particle size, Waste Manag. 43 (2015) 137–143, <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.06.029>.
- [29] G. Silvestre, A. Rodríguez-Abalde, B. Fernández, X. Flotats, A. Bonmati, Biomass adaptation over anaerobic co-digestion of sewage sludge and trapped grease waste, Bioresour. Technol. 102 (2011) 6830–6836, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.019>.
- [30] J.Y. de L. Mito, S. Kerkhoff, J.L.G. Silva, M.G. Vendrame, R.L.R. Steinmetz, A. Kunz, Metodologia para estimar o potencial de biogás e biometano a partir de plantéis suínos e bovinos no Brasil, Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, 2018.
- [31] C.L. Joppert, M.M. dos Santos, H.K.M. Costa, E.M. dos Santos, J.R.M. Simões, Energetic shift of sugarcane bagasse using biogas produced from sugarcane vinasse in Brazilian ethanol plants, Biomass Bioenergy 107 (2017) 63–73, <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.09.011>.
- [32] L. Janke, A. Leite, M. Nikolaus, T. Schmidt, J. Liebetrau, M. Nelles, W. Stinner, Biogas production from sugarcane waste: assessment on kinetic challenges for process designing, Int. J. Mol. Sci. 16 (2015) 20685–20703, <https://doi.org/10.3390/ijms160920685>.
- [33] Conab, Acompanhamento da safra brasileira de Cana-de-açúcar. Safra 2021/22, 2021. Brasília, <http://www.conab.gov.br>.
- [34] L. Janke, A.F. Leite, H. Wedwitschka, T. Schmidt, M. Nikolaus, W. Stinner, Biomethane production integrated to the Brazilian sugarcane industry: the case study of São Paulo state, in: In: 22nd Eur. Biomass Conf. Exhib, 2014, pp. 23–26, <https://doi.org/10.5071/22ndEUBCE2014-3DV.2.4>. Hamburg.
- [35] B. Ornelas-Ferreira, L.C.S. Lobato, L.F.D. Colturato, E.O. Torres, L.M. Pomo, F.J. P. Pujatti, J.C. Araújo, C.A.L. Chernicharo, Strategies for energy recovery and gains associated with the implementation of a solid state batch methanization system for treating organic waste from the city of Rio de Janeiro - Brazil, Renew. Energy 146 (2020) 1976–1983, <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.08.049>.
- [36] IBGE, Censo Agropecuário, 2017. <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/censo-o-agropecuário/censo-agropecuário-2017>.
- [37] EU-Agro-Biogas, Online European Feedstock Atlas, 2021. <https://daten.ktbl.de/euagrobiogasbasis/navigation.do?selectedAction=Startseite>. (Accessed 30 June 2021).
- [38] ANP, Relatório Dinâmico de Autorizações - Produtores de Ethanol, 2021. <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrJoiZWM3ZDI4YjEtOTI1Mi00NDY5LWJjZDktMTA0MTZlOGYzOGJlIiwidCl6JlQ0OTlmgZmZlT0YTYtNGI0Mi0IN2VmLTkYnGfMmY2FkYzkyMyJ9&pageName=ReportSection>. (Accessed 21 June 2021).
- [39] V. Ferreira-Leitão, L.M.F. Gottschalk, M.A. Ferrara, A.L. Nepomuceno, H.B. C. Molinari, E.P.S. Bon, Biomass residues in Brazil: availability and potential uses, Waste and Biomass Valorization 1 (2010) 65–76, <https://doi.org/10.1007/s12649-010-9008-8>.
- [40] J.L.N. Carvalho, R.C. Nogueiro, L.M.S. Menandro, R. de O. Bordonal, C.D. Borges, H. Cantarella, H.C.J. Franco, Agronomic and environmental implications of sugarcane straw removal: a major review, GCB Bioenergy 9 (2017) 1181–1195, <https://doi.org/10.1111/gcbb.12410>.
- [41] C. Ngumah, J. Ogbulie, J. Orji, E. Amadi, Potential of organic waste for biogas and biofertilizer production in Nigeria, Environ. Res. Eng. Manag. 63 (2013) 60–66, <https://doi.org/10.5755/j01.erem.63.1.2912>.
- [42] H. Tian, X. Wang, E.Y. Lim, J.T.E. Lee, A.W.L. Ee, J. Zhang, Y.W. Tong, Life cycle assessment of food waste to energy and resources: centralized and decentralized anaerobic digestion with different downstream biogas utilization, Renew. Sustain. Energy Rev. 150 (2021), 111489, <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111489>.
- [43] EPE, Balanço Energético Nacional 2021: Relatório Síntese - Ano Base 2020, 2021. Rio de Janeiro.
- [44] IRENA, Biogas for Road Vehicles: Technology Brief, 2018. Abu Dhabi.
- [45] FAOSTAT, Livestock Manure, 2019. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/EMN>. (Accessed 30 August 2021).
- [46] É.M. da S. Guerreiro, Potential de Aproveitamento Energético de Biometano Gerado em Aterros Sanitários: Estudo de Casos, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, 2020. <http://www.peamb.ueg.br/trabalhosconclusao/2020/Dissert-PEAMB-2020-Erica-Machado-Guerreiro.pdf>.
- [47] Cibiogas, Panorama Do Biogás No Brasil 2021, Foz Do Iguaçu, 2022.
- [48] Rio de Janeiro, Inventário de Emissões de Gases de Efeito Estufa (GEE) do Estado do Rio de Janeiro - 2015, 2017. Rio de Janeiro.
- [49] FAOSTAT, Livestock Manure, 2018. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/EMN>. (Accessed 23 June 2021).
- [50] World Biogas Association, Global Potential of Biogas, 2019.
- [51] J.J. Chávez- Fuentes, A. Capobianco, J. Barbušová, M. Hutnan, Manure from our agricultural animals: a quantitative and qualitative analysis focused on biogas production, Waste and Biomass Valorization 8 (2017) 1749–1757, <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9970-5>.
- [52] FAERJ/SEBRAE, Diagnóstico da Cadeia Produtiva do Leite do Estado do Rio de Janeiro, 2010. Rio de Janeiro.
- [53] L. Skovsgaard, H.K. Jacobsen, Economies of scale in biogas production and the significance of flexible regulation, Energy Pol. 101 (2017) 77–89, <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2016.11.021>.

- [54] L.T. Fuess, M.L. Garcia, Implications of stillage land disposal: a critical review on the impacts of fertigation, *J. Environ. Manag.* 145 (2014) 210–229, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.07.003>.
- [55] J.C. Delvaux, R. Carmargo, R.M.Q. Lana, M.H.R. Franco, M.C. Stanger, R. A. Gonçalves, E.M. Lemes, P.S.B. Miguel, Soil quality bioindicators in initial eucalyptus growth under organomineral fertilization based on sugarcane filter cake, *Aust. J. Crop. Sci.* 15 (2021) 602–609, <https://doi.org/10.21475/ajcs.21.15.04.p3071>.
- [56] M. Parsaee, M. Kiani Deh Kiani, K. Karimi, A review of biogas production from sugarcane vinasse, *Biomass Bioenergy* 122 (2019) 117–125, <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.01.034>.
- [57] M. Logan, C. Visvanathan, Management strategies for anaerobic digestate of organic fraction of municipal solid waste: current status and future prospects, *Waste Manag. Res.* 37 (2019) 27–39, <https://doi.org/10.1177/0734242X18816793>.
- [58] Brasil, Plano Nacional de Resíduos Sólidos, 2020. Brasília, <http://consultaspublica.smma.gov.br/planares/wp-content/uploads/2020/07/Plano-Nacional-de-Residuo-s-Solidos-Consulta-Publica.pdf>.
- [59] Rio de Janeiro, PMGIRS - Plano Municipal de Gestão Integrada de Resíduos Sólidos da Cidade do Rio de Janeiro, 2017. Rio de Janeiro, <http://www.rio.rj.gov.br/dlstatic/10112/3372233/4123401/PMGIRS.pdf>.
- [60] H. Roubik, J. Mazancová, Small-scale biogas plants in central Vietnam and biogas appliances with a focus on a flue gas analysis of biogas cook stoves, *Renew. Energy* 131 (2019) 1138–1145, <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.08.054>.
- [61] S.P. Lohani, B. Dhungana, H. Horn, D. Khatiwada, Small-scale biogas technology and clean cooking fuel: assessing the potential and links with SDGs in low-income countries – a case study of Nepal, *Sustain. Energy Technol. Assessments* 46 (2021), 101301, <https://doi.org/10.1016/j.seta.2021.101301>.
- [62] Sindigas, GLP EM MOVIMENTO: PANORAMA DO SETOR DE GLP EM MOVIMENTO Janeiro 2021-44ª Edição, 2021. https://www.sindigas.org.br/Download/PANORAMAS/NOVO_GLP_EM_MOVIMENTO_JANEIRO_2021_Rev5.pdf. (Accessed 20 July 2022).
- [63] Bp, Approximate Conversion Factors - Statistical Review of World Energy, 2021, <https://doi.org/10.1016/b978-075067856-8/50028-1>.
- [64] Naturgy, Informe Anual Integrado 2019 - CEG Rio, 2019. <http://www.grupobimbo.com/informe/Bimbo-Informe-Anual-2011/descargas/Grupo-Bimbo-Informe-Anual-Integrado-2011.pdf>.
- [65] Naturgy, Informe Anual Integrado 2019 - CEG, 2019. <http://www.grupobimbo.com/informe/Bimbo-Informe-Anual-2011/descargas/Grupo-Bimbo-Informe-Anual-Integrado-2011.pdf>.
- [66] B. Morero, R. Vicentin, E.A. Campanella, Assessment of biogas production in Argentina from co-digestion of sludge and municipal solid waste, *Waste Manag.* 61 (2017) 195–205, <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.11.033>.
- [67] G. Kor-Bicakci, C. Eskicioglu, Recent developments on thermal municipal sludge pretreatment technologies for enhanced anaerobic digestion, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 110 (2019) 423–443, <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.05.002>.
- [68] EPE, 2020 Statistical Yearbook of Electricity: 2019 Baseline Year, 2020. <https://www.epe.gov.br/pt%0A>. <http://www.epe.gov.br>.
- [69] C.F. Matos, J.L. Paes, É.F.M. Pinheiro, D.V.B. de Campos, Biogas production from dairy cattle manure, under organic and conventional production systems, *J. Brazilian Assoc. Agric. Eng.* 37 (2017) 1081–1090.
- [70] A.H.M. De Abreu, P.S.D.S. Leles, J.M. Alonso, E.L.D.S. Abel, R.R. De Oliveira, Characterization of sewage sludge generated in Rio de Janeiro, Brazil, and perspectives for agricultural recycling, *Semin. Agrar.* 38 (2017) 2433–2448, <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n4Supl1p2433>.
- [71] A.L. Ferreira, Pesquisa revela vocação do norte fluminense para o plantio de grãos, *Embrapa*, 2021. <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/64381034/pesquisa-revela-vocacao-do-norte-fluminense-para-o-plantio-de-graos>. (Accessed 25 May 2022).
- [72] NPCT, Fertilizantes, 2017. <https://www.npct.com.br/npctweb/npct.nsf/article/BRS-3132%consumo>. (Accessed 5 July 2021).
- [73] K. Timonen, T. Sinkko, S. Luostarinen, E. Tampio, K. Joensuu, LCA of anaerobic digestion: emission allocation for energy and digestate, *J. Clean. Prod.* 235 (2019) 1567–1579, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.06.085>.
- [74] T. Campos, G. Chaer, P. dos S. Leles, M. Silva, F. Santos, Leaching of heavy metals in soils conditioned with biosolids from sewage sludge, *Floresta e Ambiente* 26 (2019) 1–10, <https://doi.org/10.1590/2179-8087.039918>.
- [75] F. Guilayn, M. Rouez, M. Crest, D. Patureau, J. Jimenez, Valorization of digestates from urban or centralized biogas plants: a critical review, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 19 (2020) 419–462, <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09531-3>.
- [76] C. Le Maréchal, C. Druilhe, E. Repérant, E. Boscher, S. Rouxel, S. Le Roux, T. Požévara, C. Ziebal, C. Houdayer, B. Nagard, F. Barbut, A.M. Pourcher, M. Denis, Evaluation of the occurrence of sporulating and nonsporulating pathogenic bacteria in manure and in digestate of five agricultural biogas plants, *Microbiol.* 8 (2019) 1–10, <https://doi.org/10.1002/mb3.872>.
- [77] EPE, Brazilian Energy Balance 2021 Year 2020, 2021. Rio de Janeiro, <https://www.epe.gov.br/pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/balanco-energetico-nacional-ben>.
- [78] E.M.M. Esteves, A.M.N. Herrera, V.P.P. Esteves, C. do R.V. Morgado, Life cycle assessment of manure biogas production : a review, *J. Clean. Prod.* 219 (2019) 411–423, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.02.091>.
- [79] N.I.H.A. Aziz, M.M. Hanafiah, S.H. Gheewala, A review on life cycle assessment of biogas production: challenges and future perspectives in Malaysia, *Biomass Bioenergy* 122 (2019) 361–374, <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.01.047>.
- [80] W.G. Mezzullo, M.C. Mcmanus, G.P. Hammond, Life cycle assessment of a small-scale anaerobic digestion plant from cattle waste, *Appl. Energy* 102 (2013) 657–664, <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.08.008>.
- [81] M.C.P.P. Mathias, J.F.C.M. Mathias, Biogas in Brazil: a governmental agenda, *J. Energy Power Eng.* 9 (2015), <https://doi.org/10.17265/1934-8975/2015.01.001>.
- [82] C.L. Joppert, V.P. Garcilasso, M.M. Santos, A.S. Pereira, D. Perecin, M. Poveda, S. T. Coelho, The perspectives of biomethane to contribute to increase the natural gas supply in the state of São Paulo, *Eur. Biomass Conf. Exhib. Proc.* (2018) 1503–1511, <https://doi.org/10.5071/26thEUBCE2018-SBV.3.10>.
- [83] IBGE, Produção Agrícola Municipal, 2019. <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pa/m/tabelas>. (Accessed 20 October 2020).
- [84] Brazil Energy Programme – BEP (Brazil), Biogas in Brazil: Barriers and Recommendations for Sector Development, São Paulo, 2021. <https://i17.eco.br/wp-content/uploads/2022/11/RT01-2021.pdf>.
- [85] L.G.S. de Oliveira, Informing Systemic Policies to Promote Emerging Technologies: Fostering the Brazilian Biogas Innovation System, Utrecht University, 2022. <https://dspace.library.uu.nl/handle/1874/416882%0A>. <https://dspace.library.uu.nl/bitstream/handle/1874/416882/informing-systemic-policies-to-promote-emerging-technologies-fostering-the-bra-62746fc934deb.pdf?sequence=1>.
- [86] W. Kanda, H. Zanatta, T. Magnusson, O. Hjelm, M. Larsson, Policy coherence in a fragmented context: the case of biogas systems in Brazil, *Energy Res. Social Sci.* 87 (2022), 102454, <https://doi.org/10.1016/j.erss.2021.102454>.
- [87] T. Nevzorova, V. Kutcherov, Barriers to the wider implementation of biogas as a source of energy: a state-of-the-art review, *Energy Strategy Rev.* 26 (2019), 100414, <https://doi.org/10.1016/j.esr.2019.100414>.
- [88] P. Singh, A.S. Kalamdhad, A comprehensive assessment of state-wise biogas potential and its utilization in India, *Biomass Convers. Biorefinery.* 13 (2023) 12557–12579, <https://doi.org/10.1007/s13399-021-02001-y>.
- [89] T. Liu, G. Ferrarri, A. Pezzuolo, A. Alengebawy, K. Jin, G. Yang, Q. Li, P. Ai, Evaluation and analysis of biogas potential from agricultural waste in Hubei Province, China, *Agric. Syst.* 205 (2023), 103577, <https://doi.org/10.1016/j.agry.2022.103577>.
- [90] M.V. Aksay, A. Tabak, Mapping of biogas potential of animal and agricultural wastes in Turkey, *Biomass Convers. Biorefinery.* 12 (2022) 5345–5362, <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02538-6>.
- [91] W. Wang, K. Porninta, P. Aggarangsi, N. Leksawasdi, L. Li, X. Chen, X. Zhuang, Z. Yuan, W. Qi, Bioenergy development in Thailand based on the potential estimation from crop residues and livestock manures, *Biomass Bioenergy* 144 (2021), 105914, <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105914>.
- [92] IEA, Outlook for biogas and biomethane, Prospects for Organic Growth, 2020.
- [93] M.J. Stolarski, K. Warmiński, M. Krzyżaniak, E. Olba-Zięty, M. Akinca, Bioenergy technologies and biomass potential vary in Northern European countries, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 133 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110238>.
- [94] G. Ślusarz, D. Twaróg, B. Gołębiowska, M. Cierpiał-Wolan, J. Gołębiwski, P. Plutecki, The role of biogas potential in building the energy independence of the three seas initiative countries, *Energies* 16 (2023), <https://doi.org/10.3390/en16031366>.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/he

Sequential production of hydrogen and methane using hemicellulose hydrolysate from diluted acid pretreatment of sugarcane straw

Marina Tomasini ^{a,b}, Mariana de Oliveira Faber ^{a,b},
Viridiana Santana Ferreira-Leitão ^{a,b,*}

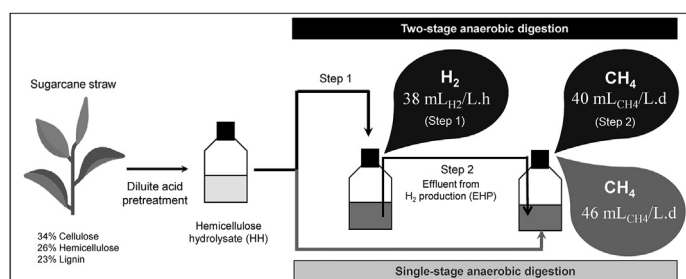
^a Laboratório de Biotecnologia, Instituto Nacional de Tecnologia (INT), Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTIC), Divisão de Catálise, Biotecnologia e Processos Químicos, CEP 20081-312, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Departamento de Bioquímica, CEP 21941-909, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

HIGHLIGHTS

- Hemicellulose hydrolysate is an attractive raw material for H₂ and CH₄ production.
- 1363.08 mL_{H₂}/L were obtained at the initial sugar concentration of 30 mM.
- Furfural and HMF affected the adaptive phase of archaea in methanogenesis.
- Higher productivity (40 mL-CH₄/L.d) and COD removal (91%) in two-stage AD.
- The overall energy potential in two steps was 33% higher.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 September 2022

Received in revised form

25 October 2022

Accepted 24 November 2022

Available online 28 December 2022

Keywords:

Two-stage anaerobic digestion

ABSTRACT

Sugarcane straw is not effectively used in the industry currently. However, sugarcane straw hemicellulose hydrolysate (HH) application as raw material for H₂ and CH₄ production is a promising alternative. In this work, the two-stage anaerobic digestion (TS-AD) approach led to 37.86 mL_{H₂}/L.h and 40.12 mL_{CH₄}/L.d, while the single-stage anaerobic digestion (SS-AD) generated 46.11 mL_{CH₄}/L.d. Hence, the two-stage process was energetically favorable than the single-stage by approximately 33%. Additionally, the comparison with standard medium (composed of glucose, xylose, and arabinose) applied as raw material indicated that although hydroxymethylfurfural and furfural from HH were not responsible for the decrease in H₂ production, they extended the adaptive phase of

* Corresponding author.

E-mail addresses: viridiana.leitao@int.gov.br, vsfleitao@gmail.com (V.S. Ferreira-Leitão).

<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.11.276>

0360-3199/© 2022 Hydrogen Energy Publications LLC. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Biohydrogen
Biogas
Dark fermentation
Anaerobic digestion

methanogenic archaea during the methanogenesis. Hemicellulose hydrolysate is an attractive raw material for two-stage anaerobic digestion.

© 2022 Hydrogen Energy Publications LLC. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

The sugar and alcohol sector is one of the drivers of the Brazilian economy, corresponding to 2% of the national GDP, which makes Brazil the largest sugarcane producer in the world [1]. Sugarcane production in the 2022/23 harvest is estimated to be 596 million tons, corresponding to the generation of approximately 93 million tons of straw, related to the harvest and processing of sugar and ethanol [2,3]. Almost 50% of the straw generated remains in the field, and part of the surplus is mixed with bagasse and burned for energy cogeneration; however, this practice does not harness the full potential of this lignocellulosic residue [4].

Several bioproducts have been studied by using sugarcane biomass [5,6] as raw material. First of all, the complex interaction among the lignocellulose fractions must be ruptured through a pretreatment step to enable the biotechnological use of cellulose, hemicellulose, or lignin [7]. Hemicellulose, also known as the C5 fraction, is the second largest compound in lignocellulose, which is a heterogeneous ramified polymer, composed mainly of pentoses [8,9]. Diluted acid pretreatment is one of the most studied pretreatments to solubilize the hemicellulose carbohydrates into their monomeric forms in the liquid medium [7,10,11]. C5 sugars are not readily metabolized by the conventional microbial strains of the ethanol industry, so to be used for this purpose, it is necessary to use genetically modified yeasts or to develop a separated ethanol production process through pentose-fermenting microorganisms [12]. Therefore, C5 fraction is less attractive for the 2G-ethanol production chain; nevertheless, hemicellulose might be used as a feedstock in different bioprocesses, such as the production of H₂ and CH₄ by anaerobic digestion [5,13–15].

In the recent decades, H₂ has been explored as a biofuel due to its high energy density, and it could also play a significant role in future carbon reduction [16]. Currently, hydrogen is mainly used in the industry for ammonia production, oil refining, and methanol production [17]. Besides H₂, methane might also be used as a promising fuel to replace compressed natural gas (CNG) [18]. Both gases could be applied in the heating, transport, and power industries.

Hydrogen and methane can be sequentially produced by dividing the anaerobic digestion into two distinct stages, namely acidogenic and methanogenic phases [19,20]. The acidogenic stage produces H₂, CO₂, and volatile fatty acids (VFA), such as acetic, butyric, propionic acids and alcohols, corresponding to the fermentation stage of anaerobic digestion. To separate that phase, the microbial consortium used for anaerobic digestion must be pretreated to inhibit H₂-consuming archaea, enabling H₂ accumulation [21]. The soluble metabolites from acidogenesis would be used as a carbon

source for methanogenic archaea in the next stage, in which the microbial consortium must be used without pretreatment to ensure that the methanogenic archaea remain metabolically active [21,22].

The interest in two-stage anaerobic digestion has been increasing because it reduces digestion time compared to CH₄ production in a single-stage process. The separation of the faster stage, hydrolysis-acidogenesis phase, from the slower stage, methanogenesis, is advantageous. In addition, the use of the most appropriate pH for each stage favors the entire process. This approach also avoids the overload of organic matter in the methanogenic phase [22–25].

This study evaluated H₂ production using hemicellulose hydrolysate from diluted acid pretreatment of sugarcane straw; furthermore, the liquid effluent of the fermentation step was used to produce CH₄ in two stages. The direct production of CH₄ was also assessed. The experiments were performed in batches to evaluate the biochemical aspects resulting from the increased concentration of carbohydrates and other analytes in the hemicellulose hydrolysate, such as the effects of increased VFA produced, system osmolarity, pH, metabolic pathway shift for solvent production, and catabolic repression. In addition, the influence of hydroxymethylfurfural (HMF) and furfural contained in hemicellulose hydrolysate was studied in comparative assays using standard sugars.

Methods

Chemical characterization of sugarcane straw biomass

The sugarcane straw was kindly supplied by Raizen (a Brazilian sugar and alcohol company). The biomass was milled in a cutting mill and the extractives quantified according to standard methodology “Determination of Extractives in Biomass” [26]. Extractive-free straw samples were submitted to an acid hydrolysis process in two steps in triplicate, as described in “Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass” [27].

Pretreatment of lignocellulose biomass

Diluted acid pretreatment (DAP) of sugarcane straw was conducted at 130 °C for 30 min, using 1.6% (v/v) H₂SO₄ with a solid:liquid ratio of 1:4 (w/v) [28]. After that, the biomass hydrolysate was manually pressed resulting in a liquid stream and the residual solid. The liquid fraction, also known as hemicellulose hydrolysate (HH), was vacuum filtered. The HH was analyzed according to the standard protocol for sugars and byproducts [29]. Prior to being employed as raw material

for H_2 and CH_4 production, the pH of the HH was adjusted to 5.5 by adding NaOH at 5 mol/L.

Inoculum

The anaerobic sludge used as inoculum was collected from an anaerobic digester in a municipal sewage treatment plant located in Rio de Janeiro, Brazil. The concentration of volatile suspended solids (VSS) in the anaerobic sludge was approximately 12,000 mg_{VSS}/L.

Before use as inoculum for H_2 production, the sludge was thermally pretreated at 65 °C for 30 min to reduce the metabolism of the methanogenic archaea and to select the spore forming H_2 -producing microorganisms.

Two-stage anaerobic digestion

Hydrogen production

The batch experiments were carried out in 100 mL glass flasks sealed with rubber lids to avoid contact with air. The working volume was 45 mL containing thermally treated anaerobic sludge (VSS added: 10,000 mg/L) and HH. Different initial concentrations of carbohydrates from HH were used in the fermentation medium to evaluate H_2 production (S1 = 9 mmol/L, S2 = 30 mmol/L, and S3 = 48 mmol/L). All assays were adjusted to pH 5.5 using NaOH 5 mol/L. The flasks were purged with N_2 for 45 s to ensure an anaerobic environment, incubated at 35 °C under agitation at 160 rpm. A standard medium (SM) containing only standard sugars (glucose, xylose, and arabinose) was also used comparatively to understand the effect of HMF and furfural on H_2 production in 24 h. Kinetic studies were carried out for 54 h applying S1, S2, and S3 using HH as raw material to evaluate the optimal condition of H_2 production. All experiments were performed in triplicate. The condition that led to higher H_2 production was selected and its liquid effluent was centrifuged at 5000 rpm for 10 min. Then, the supernatant was collected and used as raw material for methane production in a two-stage anaerobic digestion.

Methane production

The methanogenesis step was performed in a 45 mL static batch, using the raw anaerobic sludge as inoculum, and the effluent from H_2 production (EHP) as feedstock, using a COD:SSV ratio of 0.77:1, and pH 7.0.

Single-stage anaerobic digestion (SS-AD) was performed using HH as raw material as a comparative study with the methanogenic stage of TS-AD. It was applied the same conditions used in the methanogenesis step of TS-AD: volume, COD:SSV ratio, temperature, and initial pH (45 mL; 0.77:1; 35 °C; 7; without shaking). In addition, a standard medium (SM) containing the same concentration of sugars in the HH (30 mM - glucose, xylose, and arabinose) was also used as a comparative medium to SS-AD to analyze the effect of HMF and furfural over CH_4 production.

The flasks containing the media were purged with N_2 for 45 s and incubated at 35 °C for 35 days. All assays were performed in triplicate.

Kinetic analysis

The modified Gompertz equation (Equation (1)) was employed to estimate kinetic parameters of H_2 and CH_4 production [30].

$$H(t) = H_{max} \exp \left[-\exp \left[\frac{R_{max} \cdot \exp}{H_{max}} (\lambda_0 - t) + 1 \right] \right] \quad (1)$$

where H is the biogas production (mL/L); H_{max} is the maximum accumulated volume (mL/L); R_{max} is maximum rate of biogas production in mL/L.h or mL/L.d; t is the incubation time (hours or days); λ is the adaptive phase (h or d); and e is the Euler's constant (2.71828).

Energy potential from H_2 and CH_4 produced

The energy potential of TS-AD and SS-AD for HH and EHP were estimated by the relative density of H_2 and CH_4 (0.089 kg_{H₂}/m³_{H₂} and 0.72 kg_{CH₄}/m³_{CH₄}, respectively) and their respective lower calorific value (120 MJ/kg_{H₂}, 50 MJ/kg_{CH₄}) multiplied by the production of hydrogen (Equation (2)) and methane (Equation (3)) in specific volume (L_{H_2} /L, L_{CH_4} /L) [23,31,32]. $E (+)$ is the gas energy potential per day of anaerobic digestion (J/d).

$$E (+) H_2 = H_2 \text{ production} * [0.089 \text{ kg}_{H_2}/m^3_{H_2} * 1m^3_{H_2}/1000 L_{H_2}] * [120 \text{ MJ/kg}_{H_2}] \quad (2)$$

$$E (+) CH_4 = CH_4 \text{ production} * [0.72 \text{ kg}_{CH_4}/m^3_{CH_4} * 1m^3_{CH_4}/1000 L_{CH_4}] * [50 \text{ MJ/kg}_{CH_4}] \quad (3)$$

Analytical methods

The liquid fraction from acid pretreatment, effluent from H_2 production, and digested media were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC Shimadzu LC 10 AT). Samples from fermented and digested experiments were first centrifuged at 10,000 rpm for 10 min and the supernatants obtained were filtered through a 0.22 mm Millipore filter. The analytes were determined using an Aminex HPX-87H column (BioRad) maintained at 55 °C (Shimadzu column oven, model CTO-30A), and a Carb-H precolumn (Biorad). The analysis of carbohydrates (xylose, glucose, and arabinose) and ethanol was determined by a refractive index detector (RI) (Shimadzu, model RID-6A), while acids, HMF, and furfural were analyzed by UV–Vis detection at 210 nm (Shimadzu, model SPD-10AV). The mobile phase was composed of 5 mmol/L H_2SO_4 at a flow rate of 0.6 mL/min, according to Faber and Ferreira-Leitão (2016) [33].

The H_2 , CH_4 , and CO_2 concentrations were analyzed by gas chromatography on a Micro GC (Agilent Technologies 3000A), equipped with thermal conductivity detector (TCD), HP-PLOTU (3 m × 0.32 mm × 30 mm) and HP-PLOT Molecular sieve 5A (10 m × 0.32 mm × 12 mm) columns, heated at 60 and 100 °C, respectively. The injector temperature was set at 90 °C and the sample inlet temperature was 110 °C. Helium and nitrogen were used as the carrier gases for the HP-PLOT U and HP-PLOT molecular sieve 5A columns, respectively.

Chemical oxygen demand (COD) analysis of the liquid fraction was also measured according to the colorimetric method described in the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater [34].

Results and discussion

Chemical characterization of the sugarcane straw and the hydrolysate obtained after straw acid pretreatment

The chemical composition analysis of sugarcane straw performed on a dry-weight basis, presented the following average results: $29 \pm 1.9\%$ of cellulose, $23 \pm 1.4\%$ of hemicellulose, $20 \pm 0.79\%$ of lignin, $15 \pm 1.6\%$ of extractives, and $8 \pm 0.5\%$ of ashes. These values are within the range reported in the literature for this type of material, which are 29–44% cellulose, 23–31% hemicellulose, and 19–34% lignin [35,36]. The expected variation in the composition is related to different planting conditions, such as soil fertility, irrigation, climatic conditions at harvest, location, and cultivation cycles [13,37].

Ashes are inorganic reminiscent compounds obtained from the burning of biomass. Ash content above 7% affects biomass combustion, resulting in a decrease in calorific value and the generation of a large amount of waste and particulate matter [38]. The disadvantages energy cogeneration from straw compared to bagasse is the boiler encrustation related to inorganic compounds, such as SiO_2 , CaO , CL , K , and S [36,39]. Considering the process of sugarcane juice extraction, bagasse is a cleaner biomass than straw, containing approximately 2% of ashes [10,40]. Therefore, as mentioned before, the high ash amount in straw biomass causes problems of encrustation and less efficient generation of energy by burning.

The chemical characterization of the hemicellulose hydrolysate obtained after diluted acid pretreatment of raw sugarcane straw is presented in Table 1. In addition to the sugar composition, C5 and C6, Table 1 also includes the concentration of furanic compounds derived from sugar dehydration, namely furfural and HMF, and acetic acid. As the diluted acid pretreatment results in hemicellulose solubilization, xylose was the most abundant sugar in the hydrolysate

(224.87 mmol/L), as expected, corresponding to 72% of the total amount of sugar analyzed.

Glucose and arabinose concentrations in the hydrolysate were 45.63 mmol/L and 30.51 mmol/L, respectively. Thus, free pentoses represented 62% of all compounds analyzed. Based on the results obtained, the efficiency calculated for the solubilization of the hemicellulose fraction was 79%.

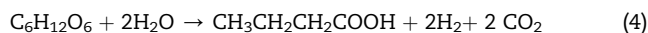
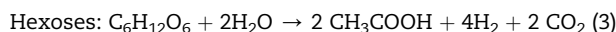
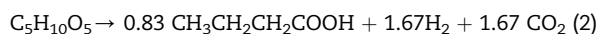
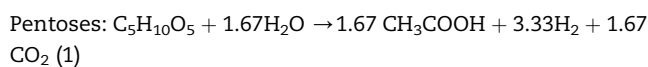
The hydrolysis reaction in the ether bonds from xylan increases due to pH reduction in the medium, and the carbohydrates are released in their monomeric form [23]. Sulfuric acid dissociation enhances the hydronium ions concentration in the medium (H_3O^+), which catalyzes the hydrolysis reaction in acetyl groups from hemicellulose in free acetic acid, the second most predominant compound in HH (138.72 mmol/L) [7]. Acetate, reported as a potential inhibitor of H_2 production, can penetrate the microbial cell membrane decreasing the intracellular pH and hindering ATP synthesis [41].

HMF is derived from glucose thermal degradation, while xylose and arabinose dehydration generates furfural [42]. Due to the high temperature of the pretreatment, fractions of both compounds might be converted into formic acid (36.50 mmol/L). Furanic compounds are described as inhibitory compounds for H_2 production in a concentration above 1 g/L, corresponding to 9.93 mmol/L of HMF and 10.41 mmol/L of furfural [43]. Previous studies reported that furanic compounds above 1 g/L inactivated several enzymes of the glycolytic pathway and damaged the microbial cell membrane [41,42]. The HMF and furfural concentrations recovered from the HH produced were approximately 5 and 7 mmol/L, respectively, and their effects on H_2 and CH_4 production are analyzed in section 3.2.

The hemicellulose fraction has been considered a promising raw material for two-stage anaerobic digestion [5,44]. Well-established concentrations of hexoses and pentoses can be easily consumed by microorganisms and result in energy for cell growth and substrate for synthesis of the expected products and byproducts. Moreover, acetic acid is a direct substrate for acetoclastic methanogenic archaea and could be converted into methane [19,32].

2- Hydrogen production using hemicellulose hydrolysate (HH)

Pentoses and hexoses from C5 fraction used as carbon sources for dark fermentation lead to the production of H_2 , CO_2 , along with acetic and butyric acids [41,45]; therefore, it is characterized as an acetic-butyric-type fermentation. The biological process is summarized by the following reactions [46,47]:



Reactions (1) and (3) refer to the conversion of pentoses and hexoses, respectively, into H_2 via acetic acid route, while reactions (2) and (4) represent H_2 production through butyric

Table 1 – Chemical characterization of the hemicellulose hydrolysate obtained by the diluted acid pretreatment of raw sugarcane straw.

Parameter	g/L $\pm$ SD	mmol/L $\pm$ SD
Glucose	8.22 ± 0.2	45.63 ± 1.0
Xylose	33.76 ± 0.2	224.87 ± 2.5
Arabinose	4.58 ± 0.5	30.51 ± 2.6
Acetic acid	8.33 ± 0.3	138.72 ± 2.3
Formic acid	1.68 ± 0.4	36.50 ± 3.8
HMF ^a	0.65 ± 0.01	5.15 ± 0.2
Furfural	0.68 ± 0.06	7.08 ± 0.6
pH	1.15	—
COD (mg/L)	$85,117 \pm 4630$	—

^a HMF: 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde. The values are the mean and standard deviation (SD) of the analysis of three samples ($n = 3$) from hemicellulose hydrolysate.

pathway. According to the reactions above, the maximum H₂ theoretical yield using pentoses as a carbon source is 3.33 mol/mol.

The effect of increasing the initial concentration of carbohydrates was analyzed in terms of hydrogen production and prediction. Fig. 1 presents the kinetic profiles of HH substrate consumption in S1 (Fig. 1A), S2 (Fig. 1B), and S3 (Fig. 1C) as well as H₂ production and prediction by the modified Gompertz equation in each condition.

The maximum yield and specific volume of H₂ produced in S1 was 1.28 mol H₂/mol carbohydrate and 305.60 mL_{H2}/L_{medium} in 18 h. S3 reached a yield of 1.48 mol H₂/mol carbohydrates and 1788.69 mL_{H2}/L_{medium} of H₂ in 48 h of fermentation. S2 resulted in the highest yield of 1.75 mol H₂/mol carbohydrates at 36 h of fermentation and a specific volume of H₂ of 1363.08 mL_{H2}/L_{medium}.

Although S1 and S2 had similar adaptive phases (6 h), the maximum H₂ production in S1 was achieved after 18 h (Fig. 1A) while in S2 was achieved after 36 h of fermentation (Fig. 1B). Glucose was the first sugar completely consumed, however xylose was the main carbohydrate in the media and its concentration was 4 fold-higher than glucose in the beginning of the process. It occurs due to the low levels of gene transcription for transport proteins and enzymes associated with xylose consumption when both xylose and glucose are present in the medium [48]. Glucose modulates transcription of transport proteins and enzymes associated with xylose consumption [49]. This phenomenon, called carbon catabolite repression, reduces or prevents the use of xylose in the presence of the preferred carbon source such as glucose. In S2, the initial xylose concentration was 3-fold higher than S1, which extended the time required for the xylose consumption and maximum H₂ production. However, H₂ production in S2 was 4-fold superior than S1 (Fig. 1).

Furthermore, Servinsky and co-workers (2018) demonstrate that *Clostridium acetobutylicum* tends to preferentially use arabinose in a mixed medium containing pentoses (arabinose and xylose), suggesting a hierarchy of pentose utilization. Arabinose leads to catabolic repression of xylose assimilation [49]. Thus, although xylose is the most abundant sugar in HH, it was the last sugar consumed, due to the catabolic repression mechanism and the carbohydrate transport system. The increase in substrate concentration from 30 mM (S2) to 48 mM (S3) also demonstrated a similar profile of substrate hierarchy consumption by inoculum (Fig. 1B and 1C).

The sugar transport systems in *C. acetobutylicum* for hexoses and pentoses are different, being ATP-binding cassette transporters (ABC) for the uptake of pentose sugars and phosphotransferase transporter system (PTS) for the uptake of hexoses [50]. Nevertheless, the metabolism of pentoses and hexoses starts simultaneously in this study. Pentoses catabolism via the phosphoketolase pathway has less enzymatic reaction than the glycolytic pathway, and although glucose may be the first carbohydrate assimilated by the cell, the initial consumption of pentoses and hexoses are the same because pentoses are metabolized in fewer reactions.

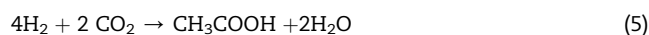
A small increase in the HH initial concentration impacts the efficiency of sugar consumption by microorganisms [5,51] and the time to achieve the maximum H₂ production. In

addition, enhancing the initial substrate concentration also increases the amount of soluble compounds, affecting the system osmolarity, which can cause disorders in the carbohydrates transport system and consumption [41].

Table 2 shows a comparative production of H₂ using HH and SM (composed of standard glucose, xylose, and arabinose). The SM compared with S1, S2 and S3 were analyzed in 18 h, 36 h, and 48 h of fermentation, respectively, the fermentative time of the highest H₂ production in each system.

There was total consumption in both HH and SM media in the lowest initial carbohydrates concentration. However, in S2 and S3 even in longer fermentation times an amount of carbohydrates remained unconsumed, showing that both media composition (HH versus SM), and substrate concentration (S2 versus S3) might disturb the microbial metabolism.

In S1 and S2 the H₂ production using HH was respectively 305.60 mL/L and 1363.08 mL/L while in SM was 204.66 mL/L and 637.36 mL/L. In the same systems, acetic acid formation was higher in SM, compared to HH. Since all carbohydrates were consumed in 18 h and 36 h using SM, H₂ could have been first produced in SM and then consumed for acetate formation via homoacetogenesis in these systems. The Wood-Ljungdahl pathway describes this behavior, in which H₂ is consumed as an electron donor by microorganisms responsible for homoacetogenesis for acetic acid production (Reaction 5) [52].



It occurs under stress conditions or after substrate depletion, resulting in decreases of H₂ and CO₂ yield on dark fermentation [53]. The accumulated volume of CO₂ in SM was also lower than in HH, indicating CO₂ consumption in SM: S1 (SM = 235.81 mL/L; HH = 425.34 mL/L), S2 (SM = 652.75 mL/L; HH = 1087.81 mL/L) and S3 (SM = 970.95 mL/L; HH = 1146.52 mL/L). Considering that the difference in CO₂ concentration between HH and SM was due to its consumption in homoacetogenesis, in S1 1.68 mM of acetic acid could be produced, in S2 8.61 mM and S3 3.44 mM.

In S3, both H₂ and acetic acid production were similar using HH or SM media, this could have occurred due to the incomplete metabolism of carbohydrates in SM. Probably, in longer fermentative assays, similar effect of the homoacetogenesis observed in S1 and S2 could be observed in S3.

In this study, the enhancement of the initial substrate concentration in the systems simultaneously increased furanic compounds and acetic acid that come from biomass pretreatment, which turn media composed by HH more complex compared with SM. However, HH media showed greater production and yield of H₂ compared to SM, which demonstrates no negative impacts related to HMF and furfural from the raw material.

Furfural and HMF have been described as potential inhibitors of H₂-producing microorganisms. According to Nasr et al. (2014) and Quéméneur et al. (2012), impacts on H₂ yield and production could be observed at concentrations higher than 8 mmol/L of HMF and 11 mmol/L of furfural, which decreases the H₂ yield by approximately 70% [43,54]. The concentration of furanic compounds in HH was 5.15 mmol/L for HMF and 7.08 mmol/L for furfural (Table 1), lower than the

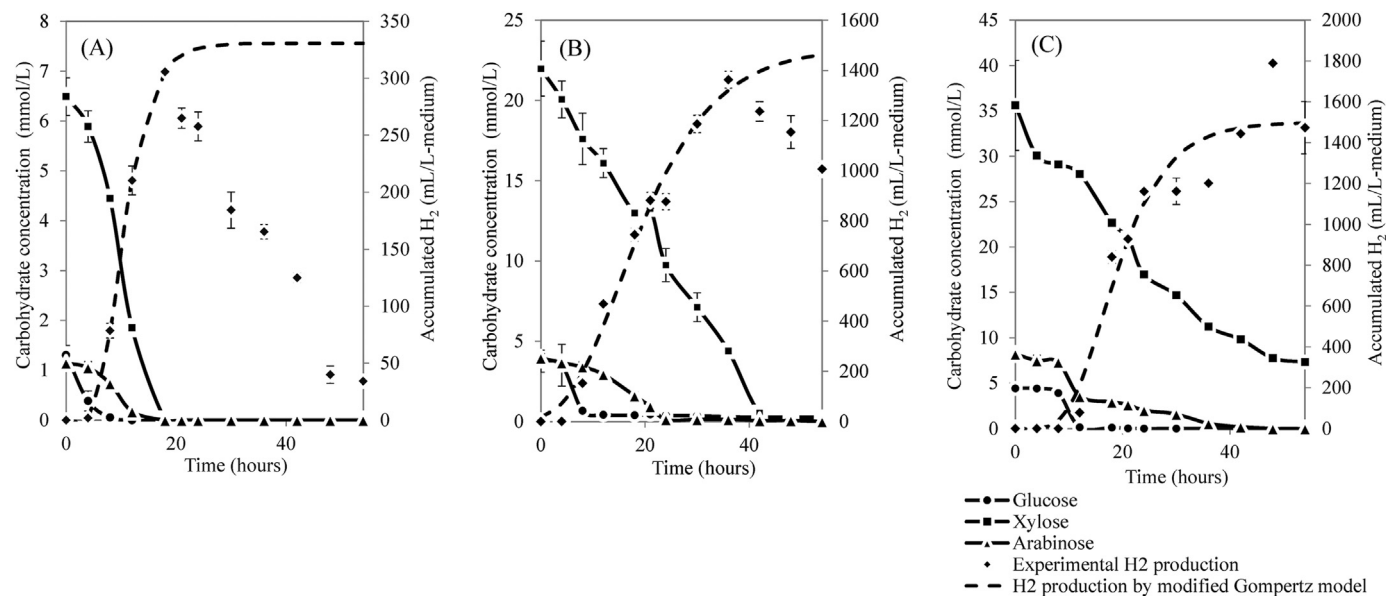


Fig. 1 – Hydrogen production using hemicellulose hydrolysate (HH). Kinetic profile of substrate consumption, experimental H₂ production, in specific volume, and predicted H₂ production by the modified Gompertz equation. Initial carbohydrate concentration in S1 = 9 mmol/L (A), S2 = 30 mmol/L (B), and S3 = 48 mmol/L(C). Estimated parameters by modeling the experimental data of H₂ production by Gompertz equation: S1 = 330.60 mL/L (H_{max}); 35.33 mL/L h (Rm); 6 h (λ); 0.80 (R^2); S2 = 1493.80 mL/L (H_{max}); 54.97 mL/L h (Rm); 6 h (λ); 0.98 (R^2); S3 = 1500.65 (H_{max}); 84.92 mL/L h (Rm); 10 h (λ); 0.96 (R^2).

Table 2 – Comparative evaluation of accumulated H₂ production, using media containing HH (hemicellulosic hydrolysate) or SM (standard medium) applying three different initial concentrations of carbohydrates. Substrate consumption and the concentration of metabolites and main components are also showed. No methane amounts were detected during the fermentation process, evidencing satisfactory inhibition of methanogenic archaea promoted by the pretreatment of anaerobic sludge.

System	S1		S2		S3	
Initial carbohydrates concentration	9 mmol/L		30 mmol/L		48 mmol/L	
Fermentation time (h)	18		36		48	
Medium	HH	SM	HH	SM	HH	SM
Substrate consumption (%)	100	100	84	100	79	86
Final pH	5.3	5.3	4.7	4.7	4.8	4.3
H ₂ Productivity (mL/L.h)	16.98	11.78	37.86	17.70	37.26	29.19
H ₂ yield (mL/g _{CO₂})	138.29 ± 31	120.96 ± 27	177.16 ± 40	91.53 ± 21	152.51 ± 35	127.46 ± 29
H ₂ yield (mol _{H₂} /mol _{carbohydrates}) ^a	1.28 ± 0.01	0.86 ± 0.03	1.75 ± 0.08	0.83 ± 0.02	1.48 ± 0.01	1.20 ± 0.02
H ₂ production (mL/L) ^a	305.60 ± 3.3	204.66 ± 7.7	1363.08 ± 33.5	637.36 ± 14.2	1788.69 ± 13.3	1401.37 ± 26.1
CO ₂ production (mL/L) ^a	425.34 ± 13.6	235.81 ± 4.5	1087.81 ± 21.4	652.75 ± 16.2	1146.52 ± 25.4	970.95 ± 27.2
Final Acetic acid (mmol/L) ^{a,b}	9.23 ± 1.1	6.06 ± 0.2	18.59 ± 1.1	12.87 ± 0.4	31.36 ± 0.7	15.44 ± 2.4
Acetic acid production (mmol/L) ^b	4.29 ± 0.7	6.06 ± 0.2	7.69 ± 0.7	12.87 ± 0.4	12.55 ± 1.6	15.44 ± 2.4
Butyric acid production (mmol/L) ^a	6.40 ± 0.4	4.12 ± 0.2	17.17 ± 0.8	15.79 ± 0.1	21.17 ± 0.01	17.68 ± 2.2
Ethanol production (mmol/L)	4.20 ± 0.01	2.45 ± 0.3	4.03 ± 0.6	4.71 ± 0.2	4.73 ± 0.2	2.76 ± 0.2
Initial HMF (mmol/L) ^a	0.12 ± 0.04	0	0.51 ± 0.05	0	0.74 ± 0.05	0
Initial Furfural (mmol/L) ^a	0.31 ± 0.01	0	0.66 ± 0.06	0	0.91 ± 0.2	0

^a Mean ± Standard deviation (n = 3).

^b Initial acetic acid concentration: 5.64, 10.90, and 18.81 mmol/L; for media containing respectively 9, 30, and 48 mmol/L of carbohydrate.

values considered inhibitory for dark fermentation. Thus, the biomass pretreatment conditions allowed the depolymerization of sugars with low formation of inhibitory compounds, avoiding the need for an additional detoxication step. However, in addition to furanic compounds, acetic acid from HH can delay the adaptive phase of microorganisms by enhancing the system osmolarity, decreasing the rate of carbohydrates consumption in the assays using HH. It will be discussed in section 3.4.2 in single-stage anaerobic digestion using hemicellulosic hydrolysate or the standard medium.

The profiles of soluble metabolites produced during dark fermentation using HH are shown in Fig. 2. In S1 (Fig. 2A), S2 (Fig. 2B), and S3 (Fig. 2C) it can be observed the kinetic profiles of H₂ and CO₂ production, along with acetic and butyric acids formation. Ethanol, HMF, furfural, propionic and formic acids were also evaluated in these systems. Acetic acid, butyric acid, and ethanol were the main soluble products after 54 h of fermentation. The accumulation of these compounds was expected in the systems due to the absence of non-spore-forming microorganisms in the medium, such as methanogenic archaea, which were inhibited in the sludge pretreatment step and would convert VFA and alcohols into CH₄ [55].

S1 medium achieved the maximum yield in 18 h (305.6 mL/L). After that, H₂ dropped down along with CO₂ consumption and acetic acid formation (Fig. 2A), indicating a homoacetogenic activity (Reaction 5).

Most homoacetogenic microorganisms in the fermentation system belong to the genus *Clostridium*, which is the same genus as many of the H₂-producing microorganisms. As these bacteria are spore forming, they are not eliminated during the sludge pretreatment and can be reactivated when the conditions are reestablished [56]. Identifying and controlling homoacetogenesis is a massive challenge when mixed cultures are used as inoculum, since H₂ consumption occurs

simultaneously with its production in these systems. In a batch mode reactor, until 43% of H₂ in the reactor can be consumed by homoacetogenics [53].

In S1, H₂ consumption was followed by acetic acid generation; 3.38 mmol/L of acetic acid was produced and 9.33 mmol/L of H₂ was consumed between 18 h and 42 h of fermentation. Considering that all the H₂ consumed were directed to homoacetogenesis, 2.33 mmol/L of acetic acid would be formed. The maximum H₂ production predicted by the Gompertz equation in S1 was 330.60 mL_{H₂}/L (Supplementary Material). Since this model does not consider the effects of homoacetogenesis, S1 had an accumulative deficit of 25 mL H₂/L, which was probably consumed for acetic acid synthesis due to the quick H₂ accumulation in the liquid medium.

A different pattern was observed in S2, in which higher hydrogen production was achieved at 36 h (1363.08 mL/L) and its consumption started subsequently, with a H₂ decrease of 13.78 mmol/L until 54 h of fermentation, while only 0.78 mmol/L of acetic acid was produced in the same period. In other words, acetic acid production was insignificant compared to the H₂ consumption. The accumulated volume of H₂ in S2 predicted by the Gompertz model was 1493.80 mL/L, showing a cumulative deficit of 130.72 mL_{H₂}/L that apparently was not directed to homoacetogenesis. In S3, no effects of homoacetogenesis were observed in the time interval evaluated, probably due to the interruption of the assay at 54 h; thus the highest H₂ volume accumulated was achieved in 48 h of fermentation (1788.69 mL/L). There was low H₂ (10.44 mmol/L) and acetic acid (13.38 mmol/L) consumption (Fig. 2C), however longer fermentation time would be required to explain that. It is worth mentioning that besides S1, S2, and S3 had different initial carbohydrates concentrations, they also had different initial acetic acid concentrations (S1 = 5.64 ± 0.44 mmol/L

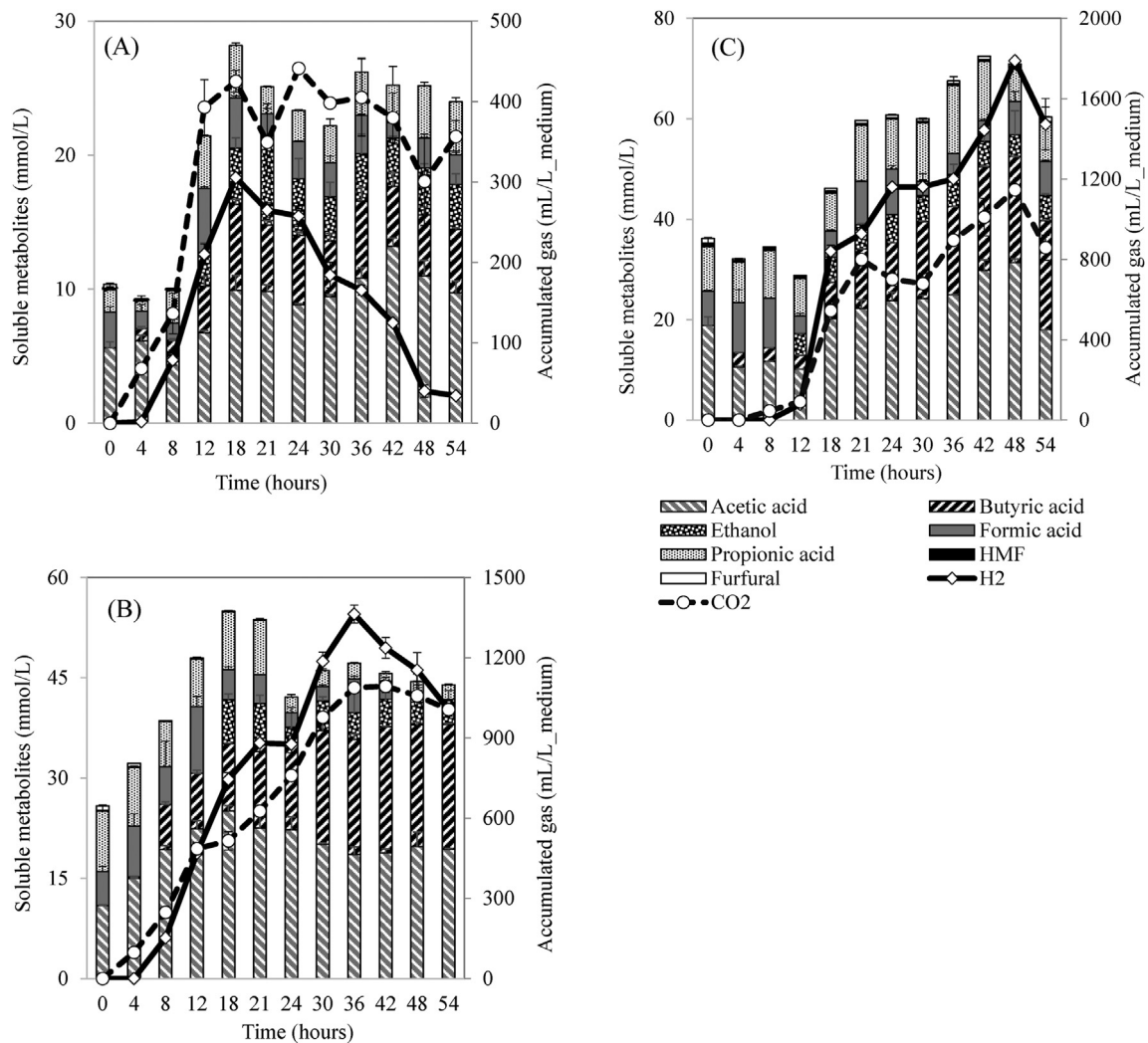


Fig. 2 – Hydrogen production using hemicellulose hydrolysate (HH). Kinetic profile of H_2 production and main soluble metabolites applying initial carbohydrate concentration in $S1 = 9$ mmol/L (A), $S2 = 30$ mmol/L (B), and $S3 = 48$ mmol/L (C).

(Fig. 2A), $S2 = 10.90 \pm 0.12$ mmol/L (Fig. 2B), and $S3 = 18.81 \pm 1.75$ mmol/L (Fig. 2C)). Increasing the initial HH concentration in the systems delayed both production and consumption of H_2 in $S2$ and $S3$. Therefore, the homoacetogenesis observed in $S1$ could also be observed in $S2$ and $S3$ systems in longer fermentation times.

The reaction between acetate and H_2 (Reaction 6), catalyzed by CoA-transferase to acetyl-CoA, result in ethanol production, throughout dark fermentation [57].



Enhancement of hydrogen partial pressure caused by its supersaturation in the liquid makes changes in the microbial pathway [58], and may cause the H_2 consumption to produce acetate throughout homoacetogenesis. Other metabolic pathways such as propionic, and formic acids production can also occur. Increasing organic acids concentration lead to microbial intracellular pH decreasing, reducing or interrupting substrate consumption and H_2 production [41]. In low pH media, non-dissociated forms of acetic and butyric acids may

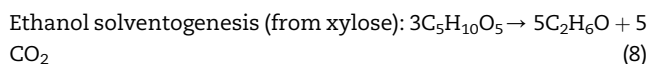
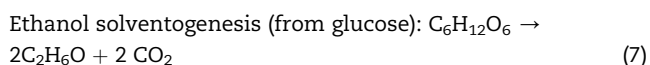
promote an increase of osmolarity in the cytoplasm and activate essential enzymes for solventogenesis, triggering the production of acetone, ethanol, and butanol [41]. Therefore, organic acids can interfere in H_2 production, damaging the metabolism and cell growth of microorganisms. Previous results reported in the literature showed that acetic acid has a negative effect on H_2 yield at concentrations higher than 11.8 mmol/L, while for acetic and butyric acids together in the medium the value is 19 mmol/L [59,60]. In this study, due to the acetyl groups present in the straw biomass, there is acetic acid in the initial composition of $S1$, $S2$ and $S3$ media, demonstrated in Fig. 2 (A) and 2 (B), and Fig. 2 (C), respectively. These concentrations increased during fermentation, due to the metabolic reactions described above (1–4).

Enhancement of acetic and butyric acids in the medium decreases the pH, leading to H_2 consumption and synthesis of ethanol [61]. In $S1$, ethanol production started in 12 h of fermentation and the highest production was 6.12 ± 0.44 at 21 h along with the beginning of H_2 consumption. In $S2$ the ethanol production was higher in 18 h (6.60 ± 0.86 mmol/L) and the greatest production in $S3$ was 7.45 ± 0.30 mmol/L at

36 h of fermentation. All systems had simultaneous accumulation of H_2 , and production of ethanol, acetic, and butyric acids but this phenomenon was less observed in S1.

The optimal pH range for dark fermentation of hemicellulose using consortium of microorganisms is 5–6.5 [62]. However, fermentation at initial acidic conditions, in addition to facilitating the pH conditioning step after acid pretreatment of lignocellulose is also appropriate for ethanol-type fermentation [63]. Ethanol was detected in all systems evaluated. Metabolic targeting of the fermentation process for ethanol production also rose due to the high H_2 partial pressure. NAD(P)H formed by consumption of H_2 , a product of acetic-butyric pathway, carries electron reduction of Acetyl-CoA into ethanol by acetaldehyde dehydrogenase and ethanol dehydrogenase (ELBESHBISHY et al., 2017; MORAES et al., 2019; YANG; WANG, 2018). Antonopoulou and co-workers (2008) also observed this behavior in dark fermentation in the pH range from 4.7 to 5.5 using hemicellulosic fraction of sorghum as raw material, achieving a concentration of 13.76 mmol/L of ethanol; in that study manure was the inoculum and the biomass was hydrothermally pretreated [64]. Carrillo-Barragen (2019) and collaborators evaluated several pH ranges in the fermentation media using different types of inoculum (manure, rumen, and anaerobic sludge) and the consequent ethanol production; ethanol was the main soluble product in fermentation media using anaerobic sludge as inoculum in pH 5.5 showing a production of 41 mmol/L, superior to fermentation applying manure (22 mmol/L) and rumen (12 mmol/L) [63].

Xylose is the main carbohydrate in the systems S1, S2, and S3 and up to 40% of this pentose can be consumed by the phosphoketolase pathway and acetyl-P and converted to ethanol and acetate by *Clostridium* [65,66]. Reactions 7 [64] and 8 [57] show the production of ethanol using glucose and xylose as substrates:



H_2 is produced during sugar metabolism and it could be also consumed for ethanol generation. Supposing that the H_2 consumption rate was lower than the H_2 production rate, it would be observed a hydrogen accumulation in the biogas even though part of this gas was used in another reaction.

Propionic acid was also observed in the beginning of the process, possibly due to the degradation of organic complex compounds in the anaerobic sludge. In addition, propionic acid is a common intermediate of sugars metabolism in medium with high H_2 accumulation [67]. Its consumption observed in S2 (Fig. 2 (B)) is probably related to anaerobic oxidation of H_2 and acetate production. Formic acid is also a substrate for anaerobic bacteria [68]. The catalysis reaction of formic acid to H_2 is carried out by the FHL (formate-hydrogenlyase) complex [69], and its biosynthesis depends on the acid concentration in microbial cells. According to Yoshida et al. (2005), a formic acid concentration of around 25 mmol/L is required to be used as a substrate by microorganisms [70]. The formic acid concentrations in S1 (2.65 ± 0.40 mmol/L), S2

(5.12 ± 0.80 mmol/L), and S3 (6.85 ± 0.22 mmol/L) were constant for 54 h of fermentation, with no significant consumption. Therefore, due to the low concentration in the systems and the prioritization of other carbon sources by the microorganisms, formic acid only contributed to the increase in the osmolarity of the fermentation medium.

Furfural and HMF were completely consumed in S1 (0.31 ± 0.01 mmol/L) and S2 (0.66 ± 0.06 mmol/L) (Fig. 1 (A), and (B), respectively). Some gram-negative bacteria are able to prevent and repair the damage caused by furanic compounds, such as *Escherichia coli* and *Thermodesulfovibrio* sp, which are present in sewage sludge and can degrade furan compounds and use it as a carbon source during the growth phase [71,72]. Thus, some of the microorganisms could assimilate furanic compounds. In S3, the furfural concentration at 54 h of fermentation (0.94 ± 0.08 mmol/L) was statistically equal to the initial (0.91 ± 0.2 mmol/L), showing that it was not consumed.

In S1, the highest H_2 production was achieved after 18 h of fermentation (305.60 mL H_2 /L), corresponding to a yield of 1.28 mol H_2 /mol carbohydrates. However, it was still lower than the yields obtained in both S2 and S3 (Table 2). In S2, H_2 production and yield was higher than S1 and S3 although the carbohydrates were not totally consumed in 36 h. Comparing HH with SM (Table 2), the enhancement of the initial substrate concentration consequently increased the initial acetic acid concentration from HH. Besides the furanic compounds, acetic acid from HH increased system osmolarity and can also contribute to delay the adaptive phase of microorganisms, decreasing the rate of carbohydrates consumption. In S3, the sugars available were not completely assimilated in 54 h of fermentation, and 15% of the substrate was not consumed by microorganisms, probably due to the higher initial concentration of carbohydrates (48 mM). In this condition, xylose was part of the residual sugar in the medium. The impacts were mainly in the uptake of carbohydrates, in which the excess of substrate in the system provided catabolic repression and could have influenced the symporter system [73,74]. Although S2 demonstrated a shift route to ethanol-type fermentation and a limitation in the H_2 production, the best fermentation results were obtained in this condition, achieving the maximum volumetric production of 1363 mL H_2 /L in 36 h and a yield of 1.75 mol H_2 /molcarbohydrates as showed in Table 2.

Based on the different parameters analyzed, such as substrate consumption, H_2 production, yield, and productivity, the condition applied in S2 was selected for the subsequent experiments for CH_4 production (section 3.3). Table 3 summarizes the results reported in the literature related to H_2 production using hemicellulose fractions obtained from acid, hydrothermal and steam explosion pretreatments of different types of biomasses compared to this study. The use of straw for H_2 production is not trivial, but it has been emerging as potential raw material. It is important to mention that the results obtained in this study were superior to the previous studies reported in the literature containing equivalent carbohydrate concentrations, compared to the production applying pure or mixed culture of microorganism as an inoculum.

The decrease of the partial pressure of H_2 by increasing the headspace volume could be a strategy to improve system stabilization and H_2 production. In addition to that, the

Table 3 – Comparative studies on H₂ production using hemicellulose fractions.

Biomass	Fraction	Biomass pretreatment	Inoculum	Initial carbohydrates concentration (mmol/L)	H ₂ production (mL/L)	Y _{P/S} (mol H ₂ /mol carbohydrates)	Reference
Sugarcane bagasse	Hemicellulose	Hydrothermal	Anaerobic sludge	7	472	1.44	Soares et al. 2019
Sugarcane bagasse	Hemicellulose	Diluted acid	Anaerobic sludge	9	352.22	1.55	DE SA et al. 2020
Sugarcane bagasse	Hemicellulose	Steam explosion	Anaerobic sludge	63	1982	1.59	Thungklin et al. 2018
Sugarcane bagasse	Hemicellulose	Diluted acid	Elephant dung	70	1314.65	0.84	Fangkum e Reungsang, 2010
Cashew apple bagasse	Hemicellulose	Diluted acid	Clostridium roseum ATCC 17797	108	126	0.10	SILVA et al., 2018
Sugarcane straw	Hemicellulose	Diluted acid	Anaerobic sludge	9	305.60	1.28	This work
Sugarcane straw	Hemicellulose	Diluted acid	Anaerobic sludge	30	1363.08	1.75	This work
Sugarcane straw	Hemicellulose	Diluted acid	Anaerobic sludge	48	1789	1.48	This work

removal of H₂ from the medium during fermentation has demonstrated positive impacts on overall yield [75], and a continuous system could decrease the impacts of organic acid accumulation, such as increased osmolarity in the system, caused by the high content of soluble metabolites in the medium. Hence, it can reduce damaging effects on H₂ production.

Therefore, through the results obtained in the conditions studied, the experimental condition applied in S2 was the most appropriate for H₂ production via dark fermentation. Moreover, this work demonstrated the great potential of hemicellulose fraction and its positive use associated with mixed cultures of microorganisms for H₂ production. Moreover, the furanic compounds from the biomass pretreatment, as shown in Table 2, did not affect the system. Thus, this is a promising approach to add value to the C5 fraction, integrating sugarcane straw into the biorefinery, which is a biomass not fully explored in the sugarcane industry due to the impurities associated with its nature.

Methane production

Methanogenic stage of two-stage anaerobic digestion (TS-AD) was performed using the effluent from H₂ production, EHP collected at 36 h, as raw material for the second step. The COD:SSV ratio of S2 condition (0.77:1) was applied. Comparatively, the single-stage anaerobic digestion (SS-AD) used both hemicellulosic hydrolysate (SS-AD HH) or the standard medium (SS-AD SM). In the SS-AD HH and SS-AD SM, the initial sugar concentration of 30 mM was directly digested. Standard medium composed of only standard sugars (30 mM) was comparatively digested with HH, in SS-AD, to understand the influence of HMF and furfural on biogas production.

Methanogenic stage of two-stage anaerobic digestion

Since the COD removal in H₂ production is low, the acidogenesis and methanogenesis phase separation is a strategy to increase the overall biogas production by energy recovering from the fermentation stage. In S2, the COD removal was only 10% due to the accumulation of VFA and ethanol in the liquid phase during the fermentation process, such as acetic acid, a by-product of sugar degradation and a direct substrate for acetoclastic methanogenic archaea [76,77]. Moreover, as observed in Fig. 2 (B), furanic compounds were totally consumed in fermentation stage, promoting some level of medium detoxification for methanogenesis.

The soluble metabolites produced in the first stage (butyric, formic, propionic acids, and ethanol), and non-consumed carbohydrates can be converted into CH₄ by methanogenic archaea in the second stage. Fig. 3A shows CH₄ accumulation during the methanogenesis stage, the prediction CH₄ by the modified Gompertz equation and the concomitant consumption of VFA and ethanol.

As shown in Fig. 3A, the maximum volume of CH₄ accumulated was 908.8 ± 52.1 mL/L after 35 days of AD, corresponding to a yield of 119.3 ± 6.84 mL_{CH₄}/g_{COD}. Most of the initial metabolites were consumed in 21 days. The difference in CH₄ production until 35 days was only 7%. Indicating that the production could be interrupted in 21 days of AD with specific volume accumulated of 842.46 ± 53.9 mL_{CH₄}/L_{medium}, 110.59 ± 6.97 mL_{CH₄}/g_{COD} of yield, and a 91% COD reduction (Fig. 3B).

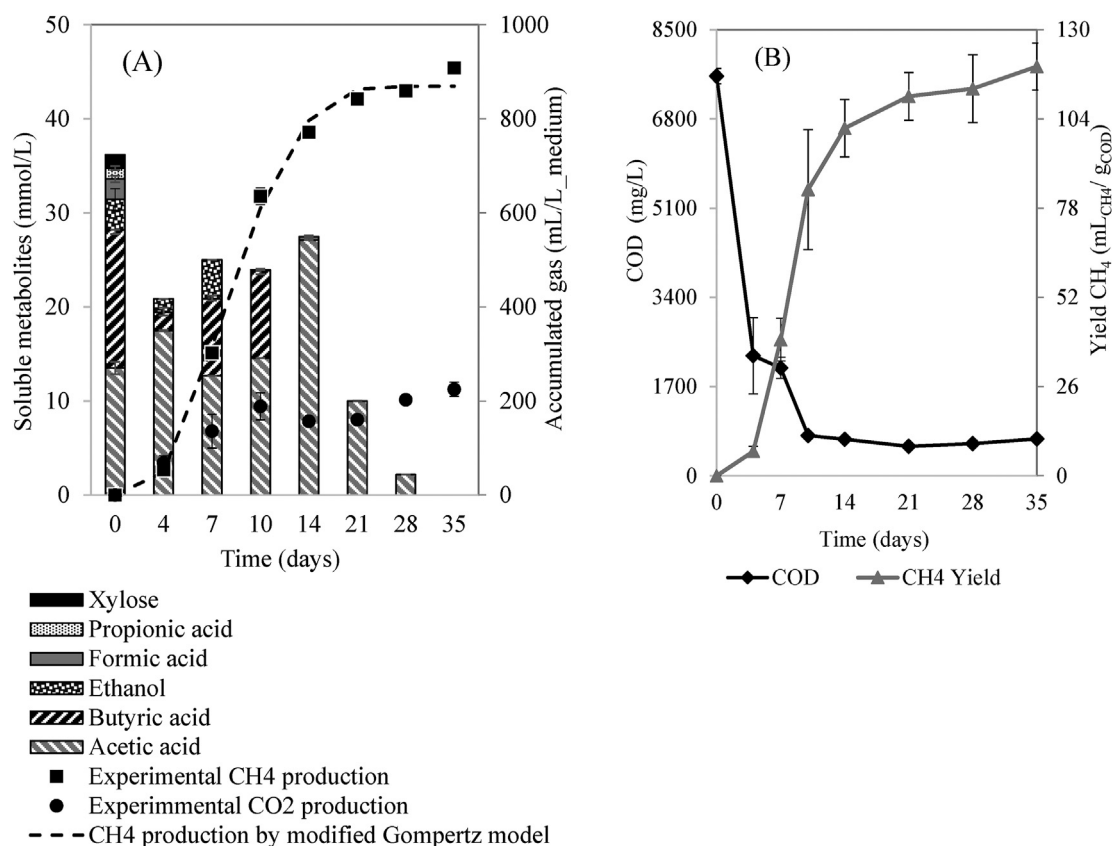
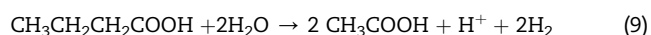


Fig. 3 – Two-stage CH₄ production, metabolites concentration, and predicted CH₄ production by the modified Gompertz (A), CH₄ yield and COD profile along the second stage of anaerobic digestion using the effluent from HH dark fermentation (B). Estimated parameters by modeling the experimental data of CH₄ production by Gompertz equation: 869.56 mL/L (H_{max}); 111.74 mL/L d (R_m); 4 h (λ); 0.99 (R²).

Initially, xylose, ethanol, propionic acid, butyric acid, and formic acid were gradually consumed, culminating in an acetic acid accumulation and biogas generation. From 14th day onward CH₄ and CO₂ were formed through acetoclastic methanogenesis. Acetate and H₂ can be produced from xylose (Reaction 1) and butyric acid (Reaction 9), while formic acid (Reaction 10) can be oxidized to H₂ and CO₂ [78,79]. However, H₂ was not detected in the methanogenic stage of TS-AD probably due to its quick consumption by homoacetogenic bacteria and hydrogenotrophic methanogenic archaea to produce acetate (Reaction 5) and CH₄ (Reaction 11), respectively [80]. This study was carried out without medium agitation to decrease the gas transfer from the liquid to the gas phase, which makes H₂ available for these microorganisms [22]. Although CO₂ is a direct substrate in the hydrogenotrophic pathway, it is also produced in acetate route for CH₄ production (Eq. (12)).



All metabolites initially produced were gradually consumed along with biogas production. In 35 days of AD, none of the initial metabolites was measured. Therefore, to continue the anaerobic digestion for more than 35 days would not bring relevant gains to the system.

Single-stage anaerobic digestion using hemicellulosic hydrolyzate or the standard medium

Fig. 4 A shows the total consumption of carbohydrates, and the accumulation of VFA in the first 4 days of AD, accompanied by a slight CH₄ production. This is characteristic of the acidogenesis step of AD, in which carbohydrates are converted into soluble organic compounds such as VFA, alcohols, H₂, and CO₂. In the same period, AD using SM (Fig. 4C) presented a CH₄ accumulated 56.8% higher than the HH medium, which contains sugars, VFA, and furanic compounds. This result could be due to the composition of each raw material, being HH more complex than SM. According to Siegert and Banks (2005), the concentration of organic acids higher than 4 g/L provides inhibitory effects on AD [81]. The acids analyzed here were acetic, formic, butyric, and propionic, which achieved the maximum concentration on the 7th day of AD in both SM and HH, accounting for around 3 g/L, ie, not exceeding the amount mentioned as inhibitory. However,

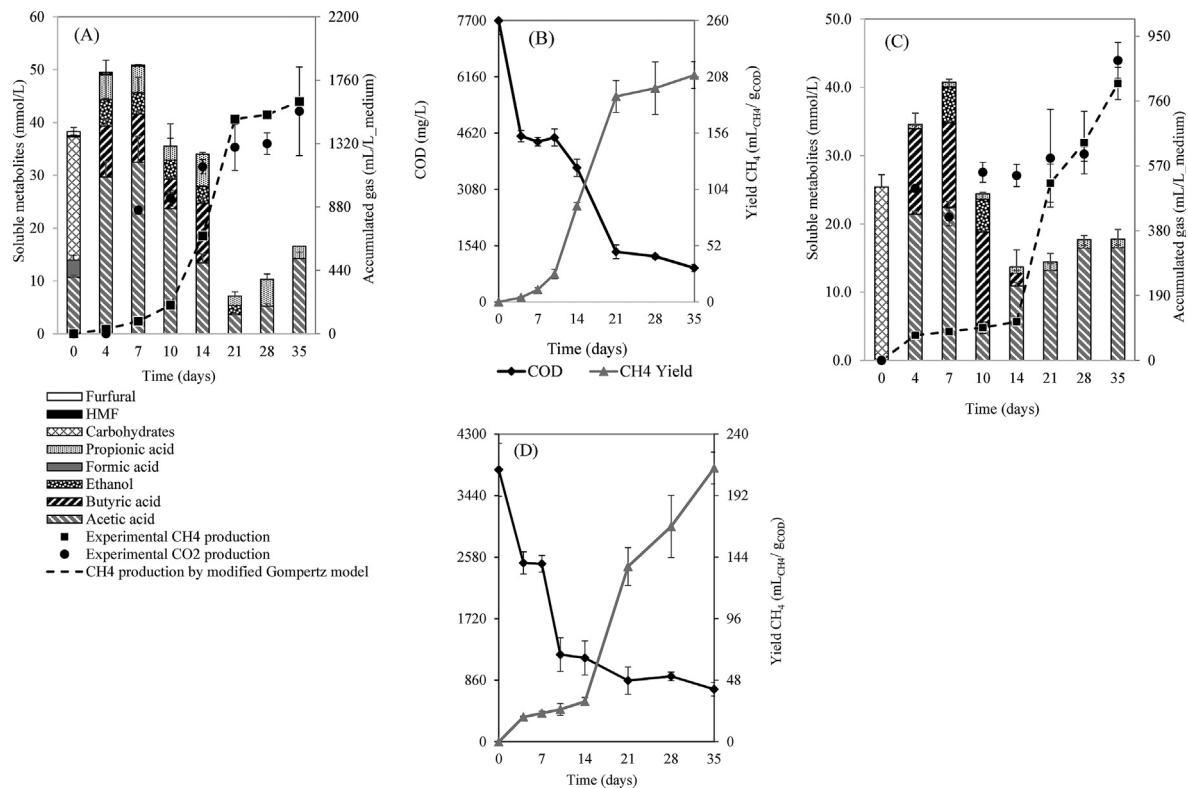


Fig. 4 – Single-stage CH_4 production. Experimental CH_4 production, consumption profiles of the metabolites, and predicted CH_4 production by the modified Gompertz associated with the anaerobic digestion using the hemicellulosic hydrolyzate (A) or the standard medium (C). CH_4 yield associated with the COD in hemicellulosic hydrolyzate (B) and standard medium (D). Estimated parameters by modeling the experimental data of CH_4 production by Gompertz equation: SS-AD HH = 1611.50 mL/L (H_{max}); 152.97 mL/L d (R_m); 9 h (λ); 0.99 (R^2); SS-AD SM = 972.75 mL/L (H_{max}); 36.57 mL/L d (R_m); 8 h (λ); 0.97 (R^2).

as previously described, a high concentration of acids can influence the metabolism of methanogenic archaea. As observed in Fig. 4A and C, HH and SM used as raw material in SS-AD promoted rapid accumulation of VFA due to the fast consumption of sugars in the acidogenesis step. Then, these VFA produced has slower consumption in methanogenesis compared to its formation in acidogenesis [82].

As mentioned before, HH is more complex than SM. HH has an initial concentration of acetic acid (10.72 ± 0.38 mmol/L), HMF (0.46 ± 0.04 mmol/L) and furfural (0.77 ± 0.06 mmol/L) derived from the acid pretreatment, which could be related to the slower CH_4 production rate compared to SM. HMF and furfural were unable to interfere in H_2 production, although the carbohydrate consumption rate was lower in fermentation using HH when compared to SM (Table 2). The effects of

HMF and furfural on CH_4 production were clear during the adaptive phase (Fig. 4A). The results obtained and some previous studies available in the literature suggest the interference of HMF and furfural in the growth phase of methanogenic microorganisms, as they are less tolerant to these compounds than H_2 -producing organisms [42,83]. Therefore, the initial production phase in HH is slower than in SM (Fig. 4A and C). At the end of AD, the microbial community consumed furanic compounds in the medium, since microorganisms such as *Clostridium* spp. and *Lactobacillus* spp. can convert furfural into furfuryl or furanoic alcohol and use them as a substrate for methane production [82,84]. Phenolic compounds (not quantified) from lignocellulosic biomass can also negatively impact AD [85]. After the 14th day, HH and SM systems exhibited a significant rise in CH_4

Table 4 – Comparative evaluation of CH_4 production using EHP (Effluent from hydrogen production), HH (hemicellulosic hydrolyzate), or SM (standard medium) as raw material and its respective production volume (mL), yield (mL CH_4 /g COD or mL CH_4 /mol carbohydrates), productivity (mL/L.d) and COD reduction.

Raw Material	Initial COD (g/L)	Production (mL/L)	Yield (mL CH_4 /g COD)	Yield (mL/mol carbohydrates)	Productivity (mL/L.d)	COD reduction (%)
EHP	7.6 ± 0.1	842.46 ± 54	110.59 ± 6.9	—	40.12	91
HH	7.7 ± 0.6	1612.55 ± 13	209.58 ± 1.6	60.18 ± 0.4	46.11	88
SM	3.8 ± 0.1	811.42 ± 47	213.45 ± 12	31.93 ± 1.9	23.18	80

^a Mean $\pm$ Standard deviation ($n = 3$).

Table 5 – Comparative studies of two-stage or single-stage anaerobic digestion using agro-industrial wastes.

Biomass	Raw Material	Inoculum	Operation process	Single-stage	Operation process	Two-stage		References
				CH ₄		H ₂	CH ₄	
Coffee husks	Hemicellulose	Anaerobic sludge	Batch	91.1 mL/g _{COD}	Batch	55.8 mL/g _{COD}	284.3 mL/g _{COD}	Santos et al. 2018
Grains	Vinasse	Anaerobic sludge	Batch	250 mL/g _{SSV}	Batch	14.8 mL/g _{SSV}	274 mL/g _{SSV}	Fu et al. 2017
Cheese	Cheese whey	–	Continuous	31.9 mL/g _{COD}	Continuous	4.2 mL/g _{COD}	37.2 mL/g _{COD}	Antonopoulos et al. 2008
–	Standard xylose + yeast extract	Anaerobic sludge		–	Batch	179 mL/g _{COD}	202.5 mL/g _{COD}	Cheng et al. 2012
Sugarcane bagasse	Hemicellulose	Anaerobic sludge		–	Batch	3.3 mL/g _{COD}	24.4 mL/g _{COD}	Thungklin et al. 2018
Agave tequila vinasse	bagasse hydrolysate	Anaerobic sludge	Continuous	–	Continuous	124 mL/g _{COD}	320 mL/g _{COD}	Corona et al. 2018
Sugarcane bagasse	Molasse	Anaerobic sludge		–	Semi-continuous	1.4 mL/g _{SSV}	17.7 mL/g _{SSV}	Park et al. 2010
Sugarcane bagasse	Hemicellulose	Sludge + manure			Batch	170 mL/g _{COD}	246.4 mL/g _{COD}	Adarne, 2017
Sugarcane bagasse	Hemicellulose	Raw sludge	Batch	173 mL/g _{COD}	Batch	43.8 mL/g _{TOC}	340 mL/g _{COD}	Baeta 2016
Sugarcane straw	Hemicellulose	Anaerobic sludge	Batch	209.6 mL/g _{COD}	Batch	117.2 mL/g _{COD}	110.6 mL/g _{COD}	This study
Sugarcane bagasse	Sugarcane bagasse	Activated sludge	Batch	247.6 mL/g _{SSV}				Ali et al. 2017
Sugarcane bagasse	Sugarcane bagasse	Anaerobic sludge	Batch	132 mL/g _{SSV}				Zou et al. 2018
Sugarcane bagasse	Liquid waste from alkaline and oxidative pretreatments	Anaerobic sludge	Batch	273 mL/g _{COD}				Bittencourt et al. 2019
Sugarcane bagasse	Residue from hydrothermal pre-treatment	Anaerobic sludge	Batch	358 mL/g _{COD}				Buitrón et al. 2019
Sugarcane straw	Hemicellulose	Anaerobic sludge	Batch	316.1 mL/g _{COD}				Sanchez-Herrera et al. 2018
Sugarcane straw	Cellulose	Anaerobic sludge	Batch	342.7 mL/g _{COD}				Sanchez-Herrera et al. 2018
Sugarcane straw	Sugarcane straw	Anaerobic sludge	Batch	231 mL/g _{SSV}				Janke et al. 2017
Filter cake	Filter cake	Anaerobic sludge	Batch	231 mL/g _{SSV}				Janke et al. 2017

production and, consequently, showed a high consumption of VFA (Fig. 4A).

The maximum specific volume of CH₄ accumulated using HH was 1612.6 ± 12.68 mL_{CH₄}/L, with a yield of 209.58 ± 1.65 mL_{CH₄}/g_{COD} (60.18 ± 0.39 mL_{CH₄}/mol_{carbohydrates}) and 88% reduction of COD (Fig. 4B), while in the assay using SM composed only of sugar standard, the maximum volume of accumulated CH₄ was 811.42 ± 47.2 mL_{CH₄}/L, with a yield of 213.45 ± 12.40 mL_{CH₄}/g_{COD} (31.93 ± 1.86 mL_{CH₄}/mol_{carbohydrates}) and 80% reduction of COD (Fig. 4D). The SM presented a higher COD yield because this system has less initial organic load than the HH. Thus, the yield was also calculated on a molar basis of carbohydrates for comparison. The difference in CH₄ production between the two systems is due to the initial acetic acid in HH, which acts as an additional substrate for CH₄ production.

Table 4 summarizes the conditions employed to produce CH₄ in the methanogenic stage of TS-AD using EHP and SS-AD with HH or SM as raw materials and their respective production, yields, and productivity.

The results clearly demonstrated that compounds from HH, such as formic acid, HMF, and furfural, can negatively affect the CH₄ production in the beginning of AD, as after its total consumption an increase in CH₄ production can be observed. Therefore, this study showed the potential of hemicellulosic fraction obtained from sugarcane straw pretreated with diluted acid for CH₄ generation. Although the sequential process resulted in a lower yield (110.59 mL_{CH₄}/g_{COD}) compared with the SS-AD (209.58 mL_{CH₄}/g_{COD}), the productivity of TS-AD (40.12 mL_{CH₄}/L.d) was similar to SS-AD (46.11 mL_{CH₄}/L.d), as the methane production in TS-AD can be interrupted at the 21st day. Table 5 shows comparative studies of methane production directly and sequentially from different biomasses.

It is important mentioning the EHP generated in this study presented lower residual sugar and a higher amount of substrates not directly consumed by microorganisms when compared to HH, which is carbohydrate-rich, facilitating some steps of microbial metabolisms, such as cell growth [86]. In addition, CH₄ production sequentially to H₂ production resulted in 91% COD reduction, while SS-AD HH resulted in 88% of COD removal. However, in SS-AD, the energy potential for CH₄ produced per day of anaerobic digestion would be 60 J/d, while in TS-AD, the overall energy potential (H₂ + CH₄) would be 90 J/d, approximately 33% higher than SS-AD.

The major advantages of the TS-AD were: sequentially production of two gases of industrial interest, reduction of retention time in 14 days, which represents a gain in productivity, and higher energy potential for CH₄ produced per day of anaerobic digestion. Furthermore, the acidogenesis stage played a detoxification role of raw material (EHP) for the sequential production of CH₄, enabling a faster CH₄ accumulation, greater stability of the process, and energy recovery in the fermentation phase. TS-AD was considered successful in literature reports, however, the techno-economic analysis of the overall system needs to be deeply studied to analyze the capital cost to produce the two gases sequentially.

Conclusion

Hemicellulose hydrolysate is an attractive raw material for two-stage anaerobic digestion. Higher H₂ yield and volumetric production were obtained in the condition tested in S2 (30 mM – sugar concentration), which represents 4 times more H₂ when compared to S1 (9 mM – sugar concentration). HMF and furfural were not inhibitory compounds of H₂ production, however, impacted the substrate assimilation by the methanogenic microorganisms. The two-stage anaerobic digestion resulted in 91% COD removal and a CH₄ production rate of 40.12 mL/L.d. The two-stage anaerobic digestion overall energy potential was 33% higher than those of the single-stage process.

Author contribution

Marina Tomasini contributed through the conception and design of the experiments, the collection, assembly, analysis and interpretation of data and the drafting of the manuscript, besides performing all the experiments.

Mariana de Oliveira Faber contributed with the analysis and interpretation of the data, the critical revision and editing of the manuscript.

Viridiana Santana Ferreira-Leitão was responsible for fundraising and contributed with the design of the experiments, drafting of the manuscript, analysis and interpretation of the data, and the critical revision of the manuscript regarding its coherence and scientific contribution.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior grant numbers 88882.331356/2019–01, 88887.600289/2021–00, by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), grant numbers 429529/2018-0 and 306619/2019-9, and by Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) grant number 26/210.694/2021.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.11.276>.

REFERENCES

- [1] FAO. World production of sugarcane. FAOSTAT; 2020.
- [2] Okuno FM. Recolhimento e qualidade da palha. Work Result Do Proj SUCRE; 2017.
- [3] Conab CN de A. Acompanhamento da Safra Brasileira - cana-de-açúcar. Bol Safra 2022/23 Primeiro Levantamento. v. 9, p. 15–17, 2022. <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>.
- [4] Watanabe MDB, Morais ER, Cardoso TF, Chagas MF, Junqueira TL, Carvalho DJ, et al. Process simulation of renewable electricity from sugarcane straw : techno-economic assessment of retro fit t scenarios in Brazil. J Clean Prod 2020;254:120081. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120081>.
- [5] de Sá LRV, Faber M de O, da Silva AS, Cammarota MC, Ferreira-Leitão VS. Biohydrogen production using xylose or xylooligosaccharides derived from sugarcane bagasse obtained by hydrothermal and acid pretreatments. Renew Energy 2020;146:2408–15. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.08.089>.
- [6] Vandenbergh LPS, Valladares-Diestra KK, Bittencourt GA, Zevallos Torres LA, Vieira S, Karp SG, et al. Beyond sugar and ethanol: the future of sugarcane biorefineries in Brazil. Renew Sustain Energy Rev 2022;167:112721. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112721>.
- [7] da Silva AS, Sobral Teixeira RS, Oliveira R de, Santana V, de Barros R da RO, Antonieta M, et al. Sugarcane and woody biomass pretreatments for ethanol production. Sustain Degrad Lignocellul Biomass - Tech Appl Commer 2013;3. <https://doi.org/10.5772/53378>.
- [8] Ferreira-Leitão VS, Cammarota MC, Aguiaras ECG, de Sá LRV, Fernandez-Lafuente R, Freire DMG. The protagonism of biocatalysis in green chemistry and its environmental benefits. Catalysts 2017;7. <https://doi.org/10.3390/catal7010009>.
- [9] Qaseem MF, Shaheen H, Wu AM. Cell wall hemicellulose for sustainable industrial utilization. Renew Sustain Energy Rev 2021;144:110996. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.110996>.
- [10] Moutta R de O, Cristina Silva M, Reis Corrales RCN, Santos Cerullo MA, Ferreira-Leitão VS, da Silva Bon EP. Comparative response and structural characterization of sugarcane bagasse, straw and bagasse-straw 1:1 mixtures subjected to hydrothermal pretreatment and enzymatic conversion. J Microb Biochem Technol 2013;1. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.s12-005>.
- [11] Rajendran K, Drielak E, Varma VS, Muthusamy S, Kumar G. Updates on the pretreatment of lignocellulosic feedstocks for bioenergy production – a review. Biomass Convers Biorefinery 2018;8:471–83. <https://doi.org/10.1007/s13399-017-0269-3>.
- [12] Nijland JG, Shin HY, Waal PP de, Klaassen P, Driessen AJM. Increased xylose affinity of Hxt2 through gene shuffling of hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. Int J Lab Hematol 2016;38:42–9. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>.
- [13] Ali S, Shah TA, Afzal A, Tabassum R. Exploring lignocellulosic biomass for bio-methane potential by anaerobic digestion and its economic feasibility. Energy Environ 2018;29:742–51. <https://doi.org/10.1177/0958305X18759009>.
- [14] Silva FG, Ferreira-Leitao VS, Cammarota MC. Strategies for increasing the biohydrogen yield in anaerobic fermentation of xylose. Environ Nat Resour Res 2019;9:32. <https://doi.org/10.5539/enrr.v9n3p32>.
- [15] Ribeiro FR, Passos F, Gurgel LVA, Baêta BEL, de Aquino SF. Anaerobic digestion of hemicellulose hydrolysate produced after hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse in UASB reactor. Sci Total Environ 2017;584–585:1108–13. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.170>.
- [16] Yang G, Wang J. Various additives for improving dark fermentative hydrogen production: a review. Renew Sustain Energy Rev 2018;95:130–46. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.07.029>.
- [17] IEA IEA. Global hydrogen review. Int Energy Agency Rep; 2021.
- [18] Baena-Moreno FM, Rodríguez-Galán M, Vega F, Vilches LF, Navarrete B. Review: recent advances in biogas purifying technologies. Int J Green Energy 2019;16:401–12. <https://doi.org/10.1080/15435075.2019.1572610>.
- [19] Santos LC dos, Adarme OFH, Baêta BEL, Gurgel LVA, Aquino SF de. Production of biogas (methane and hydrogen) from anaerobic digestion of hemicellulosic hydrolysate generated in the oxidative pretreatment of coffee husks. Bioresour Technol 2018;263:601–12. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.037>.
- [20] Adarme OFH, Baêta BEL, Lima DRS, Gurgel LVA, de Aquino SF. Methane and hydrogen production from anaerobic digestion of soluble fraction obtained by sugarcane bagasse ozonation. Ind Crop Prod 2017;109:288–99. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.040>.
- [21] Magrini FE, Almeida GM De, Soares M, Fuentes L, Ecthebehere C, Beal LL, et al. Effect of different heat treatments of inoculum on the production of hydrogen and volatile fatty acids by dark fermentation of sugarcane vinasse. Biomass Convers Biorefinery 2021;11:2443–56.
- [22] Corona VM, Razo-Flores E. Continuous hydrogen and methane production from Agave tequilana bagasse hydrolysate by sequential process to maximize energy recovery efficiency. Bioresour Technol 2018;249:334–41. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.032>.
- [23] Bittencourt GA, ElisBarreto da S, Brandão RL, Baêta BEL, Gurgel LVA. Fractionation of sugarcane bagasse using hydrothermal and advanced oxidative pretreatments for bioethanol and biogas production in lignocellulose biorefineries. Bioresour Technol 2019;292:121963. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121963>.
- [24] Dos Santos SB, Oliveira M De, Cristina A, Collac DA, Cristina E, Aguiaras G, et al. Sequential hydrogen and methane production using the residual biocatalyst of biodiesel synthesis as raw material. Int J Hydrogen Energy 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.04.172>.
- [25] Parthiba KO, Trably E, Mehariya S, Bernet N, Wong JWC, Carrere H. Pretreatment of food waste for methane and hydrogen recovery: a review. Bioresour Technol 2018;249:1025–39. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.105>.
- [26] Sluiter A, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, Sluiter A, et al. Determination of extractives in biomass. 2005. <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42619.pdf>.
- [27] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. 2012. <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf>.
- [28] Moutta RO, Chandel AK, Rodrigues RCLB, Silva MB, Rocha GJM, Silva SS. Statistical optimization of sugarcane leaves hydrolysis into simple sugars by dilute sulfuric acid catalyzed process. Sugar Tech 2012;14:53–60. <https://doi.org/10.1007/s12355-011-0116-y>.
- [29] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D. Determination of sugars , byproducts , and degradation products in liquid fraction process samples laboratory analytical procedure (LAP) issue date : 12/08/2006 determination of sugars , byproducts , and degradation products in liquid fraction proce. 2008. <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42623.pdf>.

- [30] Barrera-Quintero V, Davila-Gomez JA, Rizo Acosta P, Hernandez-Rojas ME, Baez-Pimiento S. Gompertz equation's first and second derivatives for kinetics analysis of batch dark fermentation on bio-hydrogen production. *Eur J Eng Res Sci* 2017;2:18. <https://doi.org/10.24018/ejers.2017.2.11.509>.
- [31] Chandra R, Takeuchi H, Hasegawa T. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes : a review in context to second generation of biofuel production. *Renew Sustain Energy Rev* 2012;16:1462–76. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.11.035>.
- [32] Thungklin P, Sittijunda S, Reungsang A. Sequential fermentation of hydrogen and methane from steam-exploded sugarcane bagasse hydrolysate. *Int J Hydrogen Energy* 2018;43:9924–34. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.04.056>.
- [33] Faber M de O, Ferreira-Leitão VS. Optimization of biohydrogen yield produced by bacterial consortia using residual glycerin from biodiesel production. *Bioresour Technol* 2016;219:365–70. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.141>.
- [34] APHA APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. *Am Public Heal Assoc* 2017;23:1689–99. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- [35] de Sales AN, de Souza AC, Moutta R de O, Ferreira-Leitão VS, Schwan RF, Dias DR. Use of lignocellulose biomass for endoxylanase production by *Streptomyces termitum*. *Prep Biochem Biotechnol* 2017;47:505–12. <https://doi.org/10.1080/10826068.2016.1275015>.
- [36] Menandro LMS, Cantarella H, Franco HCJ, Kölln OT, Pimenta MTB, Sanches GM, et al. Comprehensive assessment of sugarcane straw: implications for biomass and bioenergy production. *Biofuels, Bioprod Biorefining* 2017;11:488–504. <https://doi.org/10.1002/bbb.1760>.
- [37] Moro MK, Sposina Sobral Teixeira R, Sant'Ana da Silva A, Duarte Fujimoto M, Albuquerque Melo P, Resende Secchi A, et al. Continuous pretreatment of sugarcane biomass using a twin-screw extruder. *Ind Crop Prod* 2017;97:509–17. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.051>.
- [38] Soares C, Dg Duft DC, Pe Mantelatto FO, Guizelini P, Trez C, Leal M. Sugarcane trash processing and burning alternatives. *Proc Int Soc Sugar Cane Technol* 2019;30:157–64. <https://lnbr.cnpem.br/publicacoes-cientificas/>.
- [39] Vassilev SV, Baxter D, Andersen LK, Vassileva CG. An overview of the chemical composition of biomass. *Fuel* 2010;89:913–33. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2009.10.022>.
- [40] Baêta BEL, Lima DRS, Adarme OFH, Gurgel LVA, Aquino SF de. Optimization of sugarcane bagasse autohydrolysis for methane production from hemicellulose hydrolyzates in a biorefinery concept. *Bioresour Technol* 2016;200:137–46. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.003>.
- [41] Elbeshbishy E, Dhar BR, Nakhla G, Lee HS. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. *Renew Sustain Energy Rev* 2017;79:656–68. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.075>.
- [42] Tan Z, Li X, Yang C, Liu H, Cheng JJ. Inhibition and disinhibition of 5-hydroxymethylfurfural in anaerobic fermentation : a review. *Chem Eng J* 2021;424:130560. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130560>.
- [43] Quéméneur M, Hamelin J, Barakat A, Steyer JP, Carrre H, Trably E. Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures. *Int J Hydrogen Energy* 2012;37:3150–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.11.033>.
- [44] Hu B Bin, Li MY, Wang YT, Zhu MJ. Enhanced biohydrogen production from dilute acid pretreated sugarcane bagasse by detoxification and fermentation strategy. *Int J Hydrogen Energy* 2018;43:19366–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.08.164>.
- [45] Okolie JA, Nanda S, Dalai AK, Berruti F, Kozinski JA. A review on subcritical and supercritical water gasification of biogenic, polymeric and petroleum wastes to hydrogen-rich synthesis gas. *Renew Sustain Energy Rev* 2020;119:109546. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109546>.
- [46] Abdul PMMd, Jahim J, Harun S, Markom M, Hassan O, Mohammad AW, et al. Biohydrogen production from pentose-rich oil palm empty fruit bunch molasses: a first trial. *Int J Hydrogen Energy* 2013;38:15693–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.05.050>.
- [47] Wang H, Xu J, Sheng L, Liu X, Lu Y, Li W. A review on bio-hydrogen production technology. *Int J Energy Res* 2018;42:3442–53. <https://doi.org/10.1002/er.4044>.
- [48] Nakagawa BTG. Análise do perfil transcricional de *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* DSM14923 durante fermentação em hidrolisado lignocelulósico. *Diss Mestr Em Genética e Biol Mol* 2017;88.
- [49] Servinsky MD, Renberg RL. Arabinose-induced catabolite repression as a mechanism for pentose hierarchy control in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Mol Biol Physiol* 2018;3:1–16.
- [50] Zhao Z, Xian M, Liu M, Zhao G. Biochemical routes for uptake and conversion of xylose by microorganisms. *Biotechnol Biofuels* 2020;1–12. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-1662-x>.
- [51] Jianlong W, Wan Wei. The effect of substrate concentration on biohydrogen production by using kinetic models. *Sci China, Ser B: Chem* 2008;51:1110–7. <https://doi.org/10.1007/s11426-008-0104-6>.
- [52] Jonge N De, Struckmann J, Thygesen N, Vedel M, Kofoed W, Lund J. Environment Wood-Ljungdahl pathway utilisation during in situ H₂ biomethanation. *Sci Total Environ* 2022;806:151254. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151254>.
- [53] Saady NMC. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation : unresolved challenge. *Int J Hydrogen Energy* 2013;1–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.122>.
- [54] Nasr N, Gupta M, Elbeshbishy E, Hafez H, El Naggar MH, Nakhla G. Biohydrogen production from pretreated corn cobs. *Int J Hydrogen Energy* 2014;39:19921–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.10.004>.
- [55] Ács N, Szuhaj M, Wirth R, Bagi Z, Maróti G. Microbial community rearrangements in power-to-biomethane reactors employing mesophilic biogas digestate. *Energy Res* 2019;7:1–15. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2019.00132>.
- [56] Carosia MF, Reis CM dos, Menezes CA de, Sakamoto IK, Varesche MBA, Silva EL. Homoacetogenesis : new insights into controlling this unsolved challenge by selecting the optimal C/N ratio , C/P ratio and hydraulic retention time. *Process Saf Environ Protect* 2021;145:273–84. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.08.009>.
- [57] Mockaitis G, Bruant G, Guio SR, Peixoto G, Foresti E, Zaiat M. Acidic and thermal pre-treatments for anaerobic digestion inoculum to improve hydrogen and volatile fatty acid production using xylose as the substrate. *Renew Energy* 2020;145:1388–98. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.06.134>.
- [58] Castelló E, Nunes Ferraz-Junior AD, Andreani C, Anzola-Rojas M del P, Borzacconi L, Buitrón G, et al. Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: possible causes and solutions. *Renew Sustain Energy Rev* 2020;119. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109602>.
- [59] Ginkel SW Van, Logan B. Increased biological hydrogen production with reduced organic loading 2005;39:3819–26. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.07.021>.
- [60] Siqueira MR, Reginatto V. Inhibition of fermentative H₂ production by hydrolysis byproducts of lignocellulosic

- substrates. *Renew Energy* 2015;80:109–16. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.01.070>.
- [61] Akhlaghi N, Najafpour-darzi G. A comprehensive review on biological hydrogen production. *Int J Hydrogen Energy* 2020;45:22492–512. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.06.182>.
- [62] Osman AI, Deka TJ, Baruah DC, Rooney DW. *Critical challenges in biohydrogen production processes from the organic feedstocks*. *Biomass Convers Biorefinery*; 2020.
- [63] Carrillo-barragan P, Bowler B, Dolfing J, Sallis P, Gray ND, Carrillo-barragan P. Enrichment and characterisation of a mixed-source ethanologenic community degrading the organic fraction of municipal solid waste under minimal environmental control. *Front Microbiol* 2019;10:1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00722>.
- [64] Antonopoulou G, Gavala HN, Skiadas IV, Angelopoulos K, Lyberatos G. Biofuels generation from sweet sorghum : fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. *Bioresour Technol* 2008;99:110–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.048>.
- [65] Liu L, Zhang L, Tang W, Gu Y, Hua Q, Yang S, et al. Phosphoketolase pathway for Xylose Catabolism in *Clostridium acetobutylicum* revealed by ¹³C metabolic flux analysis. *J Bacteriol* 2012;194:5413–22. <https://doi.org/10.1128/JB.00713-12>.
- [66] Finneran KT, Popovic J. Solvent production from xylose. *Appl Microbiol Biotechnol* 2018;102:8707–15. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9254-4>.
- [67] Wang Y, Li L, Wu C, Zhao Z, Meng L. The influence of hydrogen concentration in sparging gas on hydrogen production and consumption via anaerobic fermentation. *Am Soc Agric Biol Eng* 2017;60:607–12. <https://doi.org/10.13031/trans.12113607>.
- [68] Roger M, Brown F, Gabrielli W, Sargent F, Roger M, Brown F, et al. Efficient hydrogen-dependent carbon dioxide reduction by *Escherichia coli* report efficient hydrogen-dependent carbon dioxide reduction by *Escherichia coli*. *Curr Biol* 2018;28:140–145.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.050>.
- [69] Lamont CM, Kelly L, Pinske C, Buchanan G, Palmer T, Sargent F. Expanding the substrates for a bacterial hydrogenlyase reaction. *Microbiology* 2017;163:649–53. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000471>.
- [70] Yoshida A, Nishimura T, Kawaguchi H, Inui M. Enhanced hydrogen production from formic acid by formate hydrogen lyase-overexpressing *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:6762–8. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6762>.
- [71] Zhang Y, Han B, Ezeji TC. Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural (HMF) by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 during butanol fermentation. *N Biotech* 2012;29:345–51. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.09.001>.
- [72] Wierckx N, Koopman F, Ruijsenaars HJ, De Winder JH. Microbial degradation of furanic compounds: biochemistry, genetics, and impact. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;92:1095–105. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3632-5>.
- [73] Grimmier C, Held C, Liebl W, Ehrenreich A. Transcriptional analysis of catabolite repression in *Clostridium acetobutylicum* growing on mixtures of d-glucose and d-xylose. *J Biotechnol* 2010;150:315–23. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.09.938>.
- [74] Servinsky MD, Kiel JT, Dupuy NF, Sund CJ. Transcriptional analysis of differential carbohydrate utilization by *Clostridium acetobutylicum*. *Microbiology* 2010;156:3478–91. <https://doi.org/10.1099/mic.0.037085-0>.
- [75] Junior ADNF, Pages C, Latrille E, Bernet N, Zaiat M, Trably E. Biogas sequestration from the headspace of a fermentative system enhances hydrogen production rate and yield. *Int J Hydrogen Energy* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.02.064>.
- [76] Appels L, Baeyens J, Degève J, Dewil R. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Prog Energy Combust Sci* 2008;34:755–81. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2008.06.002>.
- [77] Cheng J, Song W, Xia A, Su H, Zhou J, Cen K. Sequential generation of hydrogen and methane from xylose by two-stage anaerobic fermentation. *Int J Hydrogen Energy* 2012;37:13323–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.06.049>.
- [78] Vecchi NT, Agneessens LM, Feilberg A, Ottosen LDM, Kofoed MVW. In situ biomethanation: inoculum origin influences acetate consumption rate during hydrogen addition. *Bioresour Technol Reports* 2021;14. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100656>.
- [79] Tedsree K, Li T, Jones S, Chan CWA, Yu KMK, Bagot PAJ, et al. Hydrogen production from formic acid decomposition at room temperature using a Ag–Pd core–shell nanocatalyst. *Nat Nanotechnol* 2011;6:302–7. <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.42>.
- [80] Jensen MB, Ottosen LDM, Kofoed MVW. H₂ gas-liquid mass transfer : a key element in biological Power-to-Gas methanation. *Renew Sustain Energy Rev* 2021;147:111209. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111209>.
- [81] Siegert I, Banks C. The effect of volatile fatty acid additions on the anaerobic digestion of cellulose and glucose in batch reactors. *Process Biochem* 2005;40:3412–8. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.01.025>.
- [82] Schnürer A, Jarvis A. *Microbiology of the biogas process*. *Book* 2018;1–168.
- [83] Fagbohungebe MO, Herbert BMJ, Hurst L, Ibeto CN, Li H, Usmani SQ, et al. The challenges of anaerobic digestion and the role of biochar in optimizing anaerobic digestion. *Waste Manag* 2016. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.11.028>.
- [84] Buitrón G, Hernández-juárez A, Hernández-ramírez MD, Sánchez A. Biochemical methane potential from lignocellulosic wastes hydrothermally pretreated. *Ind Crop Prod* 2019;139:111555. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111555>.
- [85] Wang F, Yi W, Zhang D, Liu Y, Shen X, Li Y. Anaerobic co-digestion of corn stover and wastewater from hydrothermal carbonation. *Bioresour Technol* 2020;315:123788. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123788>.
- [86] Rawoof SAA, Kumar PS, Vo DN, Subramanian S. Sequential production of hydrogen and methane by anaerobic digestion of organic wastes : a review. *Environ Chem Lett* 2020. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01122-6>.

20. IMPORTANT ASPECTS AND OPPORTUNITIES ON FUELS AND CHEMICALS PRODUCTION CONSIDERING THE LOCAL BIOMASS AND RESIDUES AVAILABILITY

Carolina Reis Guimarães ¹, Ayla Sant'Ana da Silva ^{1,2}, Daniel Fasheun ^{1,2}

Denise M.G. Freire ², Elba P.S. Bon², Erika Cristina G. Aguiéiras ^{2,3}, Jaqueline Greco
Duarte^{2,4}, Marcella Fernandes de Souza⁵, Mariana de Oliveira Faber ^{1,2}, Marina Cristina
Tomasini ^{1,2}, Roberta Pereira Espinheira ^{1,2} Ronaldo Rodrigues de Sousa ¹, Ricardo
Sposina Sobral Teixeira ², Viridiana S. Ferreira-Leitão ^{1,2}

¹National Institute of Technology, Ministry of Science, Technology and Innovation,
Avenida Venezuela, 82, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, CEP 20081-312.

² Federal University of Rio de Janeiro, Department of Biochemistry, Rio de Janeiro, RJ,
Brazil, CEP 21941-909.

³Federal University of Rio de Janeiro, Campus UFRJ - Duque de Caxias Prof. Geraldo
Cidade, Duque de Caxias, RJ, CEP: 25.240-005, Brazil

⁴ SENAI Innovation Institute for Biosynthetics and Fibers, SENAI CETIQT, Rio de
Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

⁵Ghent University, Faculty of Bioscience Engineering, Gent, Belgium

20.1 Introduction

Global primary energy consumption increases yearly, and in 2019, 84% of total consumed energy was obtained from fossil fuels (Statistical Review of World Energy, 2021). The uncontrolled use of this type of resource results in increased carbon dioxide emissions and environmental problems, which motivates nations to seek solutions through environmental treaties. In 2015, the Paris Agreement, a United Nations treaty, was created to reduce greenhouse gas emissions and control the increase in global temperature from 2020 (Christensen; Olhoff, 2019, Höhne et al., 2019). Therefore, the production of fuels and chemicals from renewable sources stands out as a viable way to achieve the goals established in this agreement and has become a priority in the energy policy strategies of several countries (Straathof, 2013; Straathof and Bampouli, 2017; Saravanan et al., 2020; Lin and Lu, 2021).

Within this scenario, Brazil stands out for its production of biofuel and replacement of fossil fuels. The history of biofuel production in Brazil started at the beginning of the 1970s, with the creation of the National Fuel Alcohol Program (*Pro-álcool*). The program was focused on ethanol production from sugarcane, also known as first-generation ethanol (1G) (Saravanan et al., 2020). Initially, the program predicted the mandatory blend of 20% ethanol (E20) to gasoline or the use of 100% ethanol (E100) in cars equipped with special engines. Currently, the Brazilian legislation establishes that the government can fix the blend of ethanol to gasoline between 18 and 27%. The percentage is determined by the government according to the legislation of each state and market factors.

The increased demand for renewable liquid fuels and the emergence of cars with flex-fuel engines (compatible engines with any ethanol/gasoline blend) promoted the progress of fuel technology obtained from biomass, also known as second-generation ethanol (2G). In 2019, over 94% of new cars licensed in Brazil were flex-fuel (Anfeva, 2020) and 69.5% of the entire light vehicle fleet was made up of vehicles with this type of engine (Sindipeças, 2020).

Second-generation ethanol has a great potential to replace fossil fuels partially and aggregate value to agricultural waste, as it is usually obtained from lignocellulosic biomass, which is composed of cellulose, hemicellulose, and lignin. This is a complex, heterogeneous and recalcitrant material; therefore, the biggest challenge for this technology is biomass deconstruction. The use of enzymes to hydrolyze that material has

been beneficial because it shows high specificity, low energy consumption and chemical products, and the generation of less toxic waste (Binod et al., 2011).

Beyond bioethanol, biodiesel, another renewable fuel was implemented in the Brazilian energy matrix, through the creation of the National Program of Production and Use of Biodiesel (PNPB). The program initially provided a mandatory blend of 2% (B2) of biodiesel to diesel until 2008 (Ribeiro and Silva, 2020). Currently, the mandatory blend is 13% (B13), with an expectation of an increase to 15% in the coming years (MME, 2020).

Biodiesel, composed of monoalkyl esters produced from vegetable oils or animal fats, has similar properties to petro-diesel. Its burning results in lower emissions of particulates, CO, SO_x, and aromatic hydrocarbons (Robles-Medina et al., 2009). Currently, the predominant technology for biodiesel production is alkaline transesterification with methanol. However, this type of production presents several difficulties, such as the generation of large amounts of highly alkaline effluents, generating enormous environmental impact, the formation of glycerol contaminated with alkaline catalyst, and the difficulty in recovering the catalyst. In addition, this route requires high-quality raw materials, being responsible for some 80% of the final costs of biodiesel production (Demirbas, 2007; Pourzolfaghar et al., 2016; Robles-Medina et al., 2009; Sharma et al., 2008).

Therefore, innovation for biodiesel production is centered on the transition of biocatalysis processes, using lipases as a biocatalyst and, more recently, microbial processes. The use of lipases or whole cells in biodiesel production has the advantage of relatively simple downstream processing steps to purify biodiesel and glycerol. In addition, enzymatic processes allow the use of cheaper raw materials, which contain high levels of FFA (free fatty acids) and water, as lipases can catalyze esterification and transesterification reactions (Aguieiras et al., 2013, 2017; Souza et al., 2009; Zeng et al., 2017; Zheng et al., 2020).

In addition to the forms mentioned above, ethanol and biodiesel can be produced using microalgae. These organisms are viable biomass sources to produce biofuels, also known as third-generation (3G) (Lin and Liu, 2021). The production of ethanol or biodiesel depends on the type of microalgae. Some species of microalgae, when grown under stress, accumulate lipid. These can later be used in the production of biodiesel. Other microalgae species are rich in carbohydrates, which can be used to produce ethanol and other chemical compounds (Souza et al., 2020).

Beyond the liquid fuels from biomass, studies of the production of biogas, such as hydrogen and methane, should not be neglected. The production of these gases occurs in a process called anaerobic digestion (AD). This technology is considered a viable technology for treating organic waste through the action of microorganisms with subsequent generation of bioenergy and fertilizers (Holm-Nielsen et al., 2009; Mao et al., 2015). Several materials rich in organic matter can be used as raw materials for AD, such as wastes and effluents generated in the production chains of ethanol and biodiesel (Dawood et al., 2020). In addition, anaerobic digestion leads to a reduction in the emission of greenhouse gases, a reduction of pathogens through sanitization, and the final residue could be used as fertilizer (Holm-Nielsen et al., 2009; Mao et al., 2015).

Last but not least, the search for more sustainable and ecological processes based on the circular economy is needed for the most different production chains, not only in the biofuel sector. In a biomass-based chemical industry, biomass can be exploited directly or as a source of platform molecules, such as those obtained by the petrochemical industry (Soccol et al., 2011; Straathof, 2013; Straathof and Bampouli, 2017). According to Straathof (2013), in 2013 there were already at least 22 types of industrial or pilot-scale chemical production processes from biomass, including the synthesis of different classes of compounds: hydrocarbons, alcohols, carbohydrates, carboxylic acids, esters, amines, and amino acids.

In summary, the production of biofuels, bioenergy, and biochemicals from biomass is of great interest to support Bioeconomy development and to achieve the goals of environmental treaties. Considering the massive generation of agricultural residues, such as lignocellulosic and oleaginous residues in Brazil annually, their processing through sustainable technologies is a strategic aspect. Figure 20.1 summarizes some opportunities considering the integration of the sugar and oil biorefinery, mainly fostered by biofuels production chains. The large amount of fuels required in the current society drives the development of new technologies, however, the concept and the exploitation of biorefineries is still a potential. This chapter will cover the production of bioethanol and biodiesel from biomass (plant and microalgae), besides biogas and chemical products, focusing on microbial and enzymatic approaches.

Although the opportunity for the biorefinery so far, has resulted mainly from the demand for fuel, the next steps and the most effective transition to the use of electric and hydrogen cars in the market are still being defined in different world markets, and also in Brazil (Noussan et al., 2021). It is clear that Brazil has favorable conditions to give a huge

contribution to the decarbonization of the local and world economy, and the country also has enormous potential for the establishment of a Bioeconomy. As an example, but without any intention of exhausting the theme, the figure below contemplates an integrated sugar and oil biorefinery, envisioning two major processes that use renewables in Brazil, the production of ethanol and biodiesel, generating large volumes of products. It will be a natural transition for the diversification of products in these two production chains. The fuel sector is changing, and the chemical industry is still in deficit (ABIQUIM, 2021)

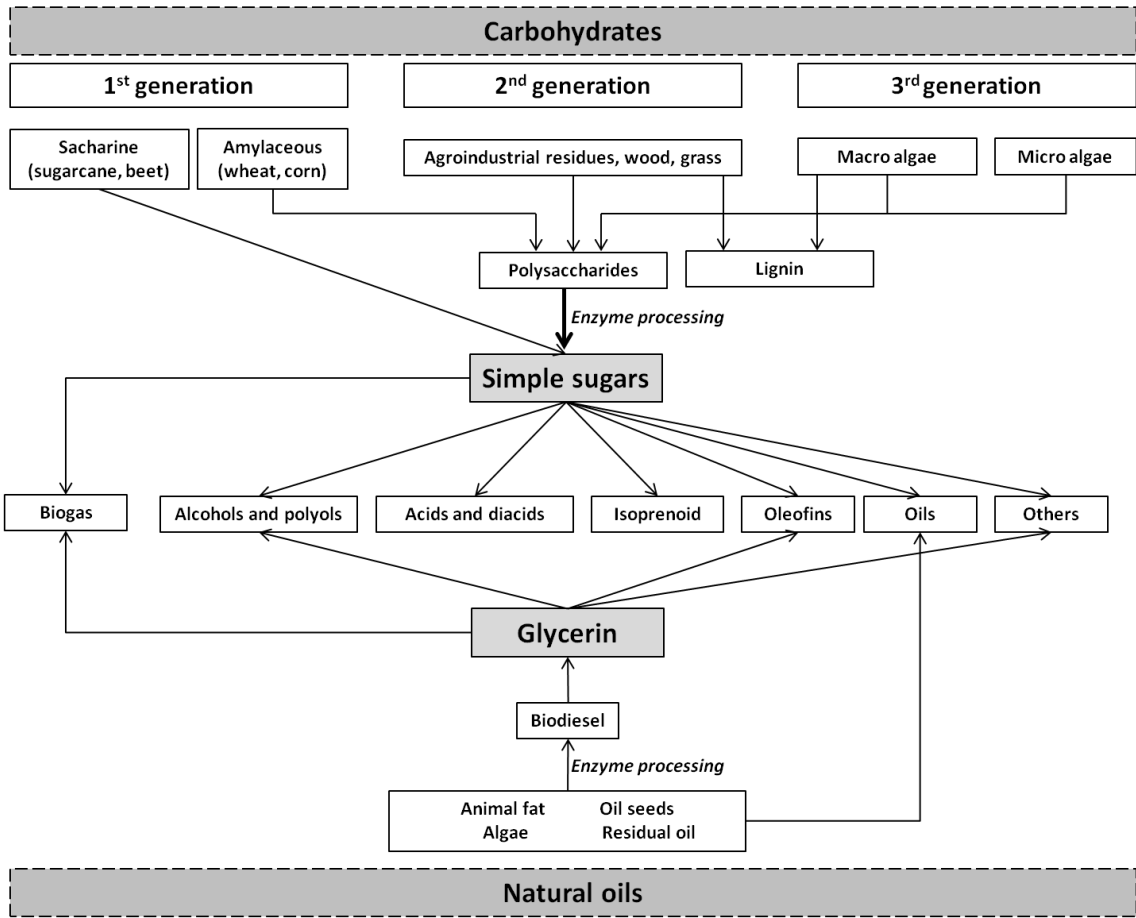


Figure 20.1. Sugar and oil biorefinery integration

20.2 Brazilian Current Production and Processing of Lignocellulosic Sugarcane Biomass

Around 589 million tons of agricultural residues are produced annually in Brazil, e.g. sugarcane straw and bagasse, soybean straw, maize stover and cob, rice straw, and several residues from fruit production (Araújo et al., 2019). Among those, the residues from sugarcane cultivation are still the most represented, a consequence of the production of 1G ethanol and sugar. Indeed, Brazil is the world's largest producer of sugarcane, reaching a harvest of 654.8 million tons in 2020/21, which was used for the production of approximately 32.8 billion liters of ethanol and 41.25 million tons of sugar (CONAB, 2021). Most commercial sugarcane varieties have an average bagasse and straw yield of 140 kg each per ton of milled sugarcane (dry basis) (Pippo et al., 2011). Thus, considering these numbers, it is estimated that approximately 183 million tons of bagasse and straw (dry weight) were produced in the 2020/21 harvest in Brazil.

A priori, the bagasse was used for energy self-sufficiency of the plants, producing steam in boilers to feed the industry equipment. However, with the development of high-pressure boilers (Dias et al., 2012), electricity cogeneration from sugarcane biomass became a profitable strategic option of bioenergy source in Brazil (Chandel et al., 2019; Watanabe et al., 2020). The bioelectricity from sugarcane biomass increased from 4 to 7% of Brazil's total electricity between 2010 and 2020 (Bujan, 2020; Watanabe et al., 2020; Brasil, 2020 a,b). Over the recent years, the sugarcane straw has become available in large quantities in the field due to the transition from manual to mechanical harvesting, pushed by the elimination of straw burning before sugarcane harvesting (Franco et al., 2018; Gonzaga et al., 2019; Watanabe et al., 2020). Such transition resulted in increased sugarcane straw availability, which represents not only a great opportunity for second-generation ethanol production and bioelectricity cogeneration, but also a new challenge to map the best destination and processing. The agronomic and environmental implications of straw sugarcane removal from the field, the appropriate amount of removal, and their potential for electricity production have recently been studied by the Sugarcane Renewable Electricity Project (SUCRE) (Carvalho et al., 2016; Gonzaga et al., 2019; Sampaio et al., 2019 and Watanabe et al., 2020). Interestingly, considering the use of 50% of the straw, an additional 35 Terawatt-hour (TWh) could be exported to the Brazilian grid yearly (SUCRE, 2017). Besides, as the bioelectricity from sugarcane is generated during sugarcane harvesting in the dry season –when the hydroelectric reservoirs are at low levels– it complements the hydroelectric generation (Carpio and Souza, 2017).

Although sugarcane biomass bioelectricity generation is a profitable residue management process, it does not hamper the cellulosic ethanol technology implementation. The coproduction (bioelectricity and cellulosic ethanol) following the level of aversion to risk of the sugarcane industry, would represent, according to Carpio and Souza (2017), the best scenario of biomass use. The next topics will focus on the production of cellulosic ethanol, presenting the main process steps and the perspectives on biomass processing for composites and chemicals production.

20.2.1 Cellulosic Ethanol: Worldwide Production and Feedstock Description

Cellulosic ethanol is an alternative for the diversification of energy sources and decarbonization of the transport sector, due to the reduction in greenhouse gas (GHG) emissions when compared to fossil-based fuels and conventional (starch and sugar) ethanol. One of the major challenges is to degrade the highly recalcitrant lignocellulosic biomass into simple carbohydrates at the industrial scale. Among the options available for biomass conversion into simple sugars, enzymatic hydrolysis has been the technology chosen by the commercial plants that produce cellulosic ethanol (Padella et al., 2019).

Cellulosic ethanol technology has been under development for many years, and its commercial production in Brazil only became reality in 2014. However, since 2015, the production capacity remains unchanged (127 million liters). The production follows the same pattern, as in 2020/21 the estimated production is 32 million liters, similar to 2019/20 (30 million liters) (Barros, 2020). In the European Union (EU), the production capacity is currently 60 million liters, and although the capacity could increase to 240 million liters in 2020, the actual production is expected to be no more than 50 million liters (Flash et al., 2020). A similar production number was observed in the United States (US). In 2019, 15.5 million gallons (60 million liters) of liquid cellulosic biofuel were produced, and according to the projection of the Environmental Protection Agency (EPA), the production will continue to be around 15 million gallons (Environmental Protection Agency (EPA), 2020).

20.2.2 Lignocellulosic Biomass Components and Biomass-Degrading Enzymes

20.2.2.1 Composition of Lignocellulosic Materials

Lignocellulosic biomass is mainly composed of cellulose, hemicellulose, and lignin but can also contain small amounts of pectin, proteins, extractives, and ash. Typically, the distribution of biomass components is 30–50% cellulose, 20–35% hemicellulose, and 15–35% lignin, depending on their origin.

Lignin is an aromatic macromolecule present in all vascular plants and is known to bind physically/chemically to cellulose and hemicelluloses by covalent bonds. Lignin is not evenly distributed in the cell wall; it is absent in the primary cell wall, found in high concentration in the cell corner middle lamella followed by compound middle lamella, and found in low amount in secondary wall regions (Gellerstedt and Henriksson, 2008; Wang et al., 2017). The presence of lignin in the plant cell wall provides the plant tissue with stiffness, impermeability, and resistance to microbial and mechanical attacks (Grabber, 2005; Mishra et al., 2007). Consequently, lignin imposes one of the main limiting factors on the enzymatic attack of biomass carbohydrates (cellulose and hemicellulose) by hindering the access of enzymes to the substrates and/or promoting unproductive adsorption of cellulases through charged and uncharged interactions (Zhu et al., 2008; Kumar et al., 2012; Wang et al., 2017; Yoo et al., 2020). The influence of lignin on cellulose conversion has recently been discussed in lignocellulosic biomass conversion reviews (Zoghلامي and Paës, 2019; da Silva et al., 2020). Lignin is formed by the polymerization of phenyl-propane alcohols, namely *p*-coumarilic, coniferilic, and synapilic alcohols, which differ in structure, depending on the type of plant (Laurichesse and Avérous, 2014). In coniferous (softwood) trees, lignin consists almost exclusively of coniferilic alcohol, with small amounts of *p*-coumarilic alcohol. In hardwoods, both coniferilic and synapilic alcohols are present, while in monocots, such as sugarcane, all three alcohols are present as lignin precursors (Fengel and Wegener, 1984; Sjöström, 1993; Sakakibara and Sano, 2001; Yu et al., 2014).

The hemicelluloses are branched/unbranched heteropolymers with low molecular weight, having a degree of polymerization of 80–200 (Peng et al., 2012; Mota et al., 2018). Hemicelluloses could be divided into four major classes, namely xylans, mannans, xyloglucans, and mixed-linkage β -glucans (Qaseem et al., 2021). Hemicellulose may include pentoses (xylose and arabinose), hexoses (mannose, glucose, galactose), and/or uronic acids (glucuronic and galacturonic acids), which are connected to each other

mainly through β -(1 $\rightarrow$ 4) glycosidic linkages but also by β -(1 $\rightarrow$ 3), β -(1 $\rightarrow$ 6), α -(1 $\rightarrow$ 2), α -(1 $\rightarrow$ 3), and α -(1 $\rightarrow$ 6) glycosidic bonds in branches. Other sugars such as rhamnose and fucose may also be present in small amounts, and the sugars' hydroxyl groups may be partially replaced by acetyl groups (Gírio et al., 2010). The variety of linkages and branching, as well as the presence of different monomer units, contribute to the structural complexity of hemicellulose, which thus requires a complex enzyme system for its degradation (Mota et al., 2018). However, as the hemicelluloses are amorphous and have little physical strength, their hydrolysis is easier than the hydrolysis of cellulose. Many studies have reported hemicellulose removal for improving cellulose enzyme accessibility and hydrolysis rate (Leu and Zhu, 2013; Lv et al., 2013; Kruyeniski, 2019). Due to the variety of components in its structure, hemicellulose is considered a promising alternative for replacing fossil resources with many important fuels and biopolymers (Isikgor and Becer, 2015; Zhou et al., 2017; Dulie et al., 2021; Qaseem et al., 2021).

Cellulose is the most abundant organic polymer in nature and the major constituent of plant cell walls, with an annual production estimated at 1.5×10^{12} tons (Klemm et al., 2005). Cellulose is defined as a linear polymer consisting of glucose residues connected by type β -(1,4) glycosidic linkages. The formation of β -(1,4) glycosidic bonds requires that adjacent residues be positioned 180° relative one to another, forming cellobiose units (O'Sullivan, 1997). The degree of polymerization of plant cellulose ranges from 500 to 15,000 d-glucose residues, depending on its location in the primary or secondary cell wall (Albersheim et al., 2011). The linear character observed in cellulose chains allows adjacent chains to be positioned close to each other (Dufrense, 2012). Thus, cellulose chains are aligned in strands forming organized fibrils.

Cellulose microfibrils contain crystalline and amorphous regions. The crystalline regions consist of highly ordered cellulose molecules derived from the organization of cellulose chains linked by hydroxyl groups to form intra- and intermolecular hydrogen bonds in different arrangements (Djahedi et al., 2015), while the molecules are less ordered in the amorphous regions (Park et al., 2010). The crystalline regions are more recalcitrant to enzymatic attack, while the amorphous regions are more readily hydrolyzed (Cao and Tan, 2005; Van Dyk et al., 2012). Not only the cellulose crystallinity index but also the degree of polymerization (DP) affects cellulose recalcitrance, as celluloses with low DP are usually more easily hydrolyzed (Meng et al., 2017; Mattonai et al., 2018).

20.2.2.2 Cellulose-Degrading Enzymes

The typically reported enzyme for complete cellulose degradation into glucose comprises three main activities: cellobiohydrolases (CBHs – EC 3.2.1.91 and EC 3.2.1.176), endoglucanases (EGs – EC 3.2.1.4), and β -glucosidases (BGLs – EC 3.2.1.21) (Chandel et al., 2012; Cao and Tan, 2002; Singh et al., 2021). This cellulase enzyme consortium is classified under the glycoside hydrolase (GH) family, which mainly hydrolyze the glycosidic bond between two or more carbohydrates (cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html). According to the currently accepted model of *Trichoderma reesei* cellulases action, EGs randomly hydrolyze internal glycosidic bonds in amorphous regions of cellulose, creating new chain ends and releasing oligosaccharides. CBHs act mainly in the crystalline part of cellulose, removing cellobiose units from the reducing and nonreducing free chain ends. EGs and CBHs act synergistically, as EGs create new chain ends for CBH action and CBHs create more substrate for EGs by disrupting the crystalline substrate and/or exposing previously inaccessible less ordered substrates (Al-Zuhair, 2008; Sukumaran et al., 2021). EGs and CBHs are described to have a carbohydrate binding module (CBM), which helps in substrate binding and keeps the catalytic domain (CD) (responsible for hydrolysis reaction) closer to the substrate (Nakamura et al., 2016; Singh et al., 2021; Sukumaran et al., 2021). Interestingly, CBHs from GH family 7 show a processive cellulose degradation, or in other words, work through successive hydrolytic catalytic reactions without dissociation from the cellulose chain (Nakamura et al., 2016; Uchiyama et al., 2020). Ultimately, the cellobiose released by CBHs is hydrolyzed by BGLs to glucose. BGLs can also, to a lesser extent, hydrolyze other small cello-oligosaccharides to glucose (Kostylev and Wilson, 2012). As BGLs are inhibited by their end product (glucose), new improved commercial cellulase preparations, such as Novozymes' Cellic series and Dupont's Accelerase, present engineered BGLs for increased glucan conversion and reduced product inhibition (Cannella and Jorgensen, 2014). For more information, the effect of sugars and degradation products derived from biomass on enzyme efficiency (including commercial enzymes) and cellulose conversion has recently been reviewed on lignocellulosic biomass conversion under low and high solids conditions (da Silva et al., 2020).

Cellulases can be produced by bacteria and fungi, but aerobic fungi have been preferred due to their versatile substrate utilization and high production level (Srivastava et al., 2018). Cellulases are in high demand, as they are used in numerous industries, and

occupy the third position in the enzyme global market, after amylases and proteases (Sajith et al., 2016; Singh et al., 2021). Due to their importance, the improvement of cellulolytic enzymatic cocktails has been continuously studied (Karp et al., 2021). In addition to these hydrolytic enzymes, many cellulolytic microorganisms produce enzymes that can degrade crystalline cellulose through an oxidative mechanism of action (Zifcakova and Baldrian, 2012; Dixit et al., 2019). Although studies on cellulose degradation date to the early 1950s, it was only in 2010 that studies demonstrated the ability of metalloenzymes, now known as lytic polysaccharides monooxygenases (LPMOs), to disrupt crystalline cellulose, and thus to complement the glycoside hydrolases by functioning as endoenzymes that cleave crystalline cellulose surfaces, creating new chain ends for CBH action (Laurent et al., 2019; Sukumaran et al., 2021). It has been shown that LPMOs are copper-dependent monooxygenases that oxidize polysaccharides at C1 and/or C4, starting a chain breakage (Harris et al., 2010; Vaaje-Kolstad et al., 2010; Hemsworth et al., 2013). LMPOs were incorporated into commercial cellulases, such as Cellic[®] CTec 2 and CTec3 (Novozymes), within a few years after their discovery, as they were proven to boost cellulose degradation (Horn et al., 2012). The addition of LMPOs to commercial enzyme cocktails adds a new variable to cellulose hydrolysis, as those enzymes require oxygen. To benefit from LMPOs' boosting activities, processes must be designed to avoid any competition with dissolved oxygen, preferably by conducting the hydrolysis step separately from fermentation (Cannella and Jorgensen, 2014). For more information, the improvement of enzyme blends containing LPMOs on lignocellulose conversion at high solid conditions has been recently reviewed (da Silva et al., 2020).

20.2.2.3 Hemicellulose-Degrading Enzymes

Enzymatic depolymerization of hemicellulose is commercially attractive due to the requirement of mild conditions, low formation of toxic degradation products, and its diverse sugar composition. Different plants have different types of branched/unbranched hemicelluloses, composed of two to six monosaccharides, which may be acetylated or methylated. Due to its heterogeneity, multiple enzymes with distinct specificities acting synergistically and/or sequentially are needed for the conversion of each type of biomass (Juturu and Wu, 2013; Juturu et al., 2014; Qaseem et al., 2021). The prerequisite for the

conversion of hemicellulose to value-added chemicals is its depolymerization, which may require endoxylanase (EC 3.2.1.8), β -xylosidase (EC 3.2.1.37), α -arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), α -glucuronidase (EC 3.2.1.139), endo-1,4-mannanase (EC 3.2.1.78), β -mannosidases (EC 3.2.1.25), acetyl xylan esterase (EC 3.1.1.72), and feruloyl xylan esterase (EC 3.1.1.73) (Juturu and Wu, 2013; Sukumaran et al., 2021, Qaseem et al., 2021). These enzymes can be classified based on their substrate specificities as glycoside hydrolyses (GHs) or carbohydrate esterases (CEs). For example, grasses, such as sugarcane, have arabinoxylan as a major hemicellulose component, and their complete degradation requires an enzyme mixture containing xylanases, which catalyzes the hydrolysis of 1,4- β -D-xylosidic linkages in xylan, β -xylosidases, which catalyzes the hydrolysis of xylo-oligosaccharides and xylobiose into xylose, and α -arabinofuranosidase hydrolyze arabinan side chains attached to the xylan backbone to arabinose (Sorensen et al., 2007; Sweeney and Xu, 2012).

The requirement of hemicellulases for lignocellulosic biomass hydrolysis is strongly dependent on the type of pretreatment used to reduce the biomass recalcitrance. As some pretreatments, as such hydrothermal, remove the hemicellulose content almost completely, the need for hemicellulases is reduced in those cases. However, the trend in new commercial plants for cellulosic ethanol production is to use low-severity pretreatments to reduce capital cost and toxic waste generation (Harris et al., 2014). Pretreatments conducted in lower-severity conditions tend to leave more hemicellulose in the biomass material, thus requiring the incorporation of hemicellulases in commercial enzymatic pools, as hemicellulose remains linked to cellulose and act as a physical barrier for cellulose-degrading enzymes. Several studies have shown a significant increase in cellulose hydrolysis or reduced requirement of cellulases, by adding hemicellulases in enzyme mixtures for the hydrolysis of pretreated biomass (Tabka et al., 2006; García-Aparicio et al., 2007; Xu et al., 2019)

Thus, commercial enzymes for the hydrolysis of lignocellulosic materials, such as the Cellic enzymes series, offer the option of mixing cellulases and hemicellulases for a better hydrolysis response. Although the application sheet of Cellic CTec2 describes the product as a mixture of aggressive cellulases, high levels of BGLs, and hemicellulases, the manufacturer also offers the option of mixing Cellic CTec2 with HTec2, which is described as a product rich in endoxylanases with high specificity to soluble hemicellulose, with a cellulase background. A dose-response test through the addition of Cellic HTec2 to CTec2 in comparison to CTec2-only dose is recommended when

pretreatment results in a feedstock that would benefit from additional hemicellulose degradation. Cellic HTec3, which is the new generation enzyme, is described as a hemicellulases complex that contains endoxylanases and β -xylosidases activities for effective hemicellulose conversion. The manufacturer describes this product as highly effective for the hydrolysis of liquid process streams rich in xylan-oligomers to xylose, and the conversion of soluble and insoluble hemicellulose in pretreated biomass slurries.

20.2.3 Difficulties and Perspectives of Cellulosic Ethanol Production

The commercial production of cellulosic ethanol increased in the last few years, nonetheless, it is far away behind the expected. The processes required to produce cellulosic ethanol are inherently more complex than sugar/starch ethanol production. First of all, before enzymatic hydrolysis can be conducted, the key obstacle of biomass recalcitrance needs to be addressed by performing a pretreatment step to improve the accessibility of cellulose to hydrolytic enzymes. Major efforts have been made towards improving the pretreatment step, and several methods have been developed (e.g., steam explosion, diluted-acid, and hydrothermal pretreatments). The choice of pretreatment technology depends mainly on the biomass type, however, studies and experts agree that the steam explosion is one of the most cost-effective, as it removes the lignin and hemicellulose, provides high glucose yields, and results in low environmental impact (Alberts et al., 2016; Chandel et al., 2019). Thus, the pretreatment step that was previously considered the main limitation in cellulosic ethanol production is nowadays of lower impact when compared to other factors. A similar pattern is observed in the efforts made to improve the fermentation process, as the development of new yeast strains has been copiously studied during the last few years (Chandel et al., 2019).

Divergently, enzyme production continues to be a critical technology step that still impairs the economic feasibility of cellulosic ethanol production. Although the enzyme cost reduced from \$3.00 per gallon in 2001 to about \$0.40 in 2020, according to the U.S. Department of Commerce, for cellulosic ethanol to reach competitiveness, the enzyme cost should be at least \$0.05 per gallon (Osborne, 2020). Reducing the enzyme cost is incredibly challenging, as in the current market only one company, Novozymes[®], produces industrially effective cellulases.

Besides the enzyme costs, the enzymatic hydrolysis step under industrial-scale poses technical issues, as the solids loading can directly affect the ethanol yield. To reach distillation feasibility –ethanol concentrations above 4% (w/w)– (Zacchi and Axelsson, 1989; Varga et al., 2004), the concentration of the glucose syrup must be around 80-100 g.L⁻¹, and, by extension, the amount of solids required during enzymatic hydrolysis has to be increased. High-solids enzymatic hydrolysis (at least 15% of solids) is mandatory to reach cellulosic ethanol feasibility, however, technical issues are faced when working in this condition. The high viscosity of the media hampers the enzymatic catalysis due to many factors, e.g., mass transfer limitation, product inhibition, and water constraint (da Silva et al., 2020).

The beginning of cellulosic ethanol developments occurred in a scenario where macro- and microenvironmental factors contributed to triggering the technology establishment, where oil prices were rising, the world was facing a financial crisis, and the climate change consensus was pressuring governments to seek sustainable energy options. However, the cellulosic ethanol industry faced several challenges due to the dramatic drop in oil prices in the second half of 2014 and uncertainty about the political support for biofuels. Global new investment in renewable power and fuels increased 5% from 2018 to 2019 (RENEWABLES 2020 GLOBAL STATUS REPORT, 2020). However, those investments have been increasing due to the wind and solar power sector, and indeed, the biofuels sector lost 10% of investments from 2018 to 2019. This is a reflex of the lack of effective policies in the vast majority of the countries, and although the global transport sector has the second-highest share of total final energy consumption, it remains the sector with the lowest penetration of renewables and continues to rely heavily on fossil fuels (IEA, 2018). Another important factor that has hindered most of the investments in this sector is the global COVID-19 pandemic. In Brazil, “the expected negative impact in the Brazilian Otto-cycle fuel consumption (gasoline and ethanol) in the next couple of years, forced Ministry of Mines and Energy to propose the review of compulsory targets.”

The price of cellulosic ethanol in the US decreased from \$ 5 per gallon in 2001 to about \$ 2.65 in 2020 (Osborne 2020). And the effective communication of the benefits and lessons learned to the public and policy makers will be essential for the full development of this growing industry. As the example of the state of California, which has harsh policies, as the Low Carbon Fuel Standard (LCFS) over the use of biofuels (Storlak, 2018). Another example is the instruments based by RenovaBio Program in

Brazil, e.g., the Decarbonization Credits (CBio) (Barros, 2020). However, to reach a competitive status with starch ethanol in the US, it is estimated that cellulosic ethanol should cost \$1.07 per gallon, which means that more efforts are demanded toward the investments in this sector (Osborne 2020). Thus, renewable-based policies are important to boost the investments in R&D for the development of the processes that are still not cost-effective; as the on-site production of enzymes, to diminish the enzyme costs; and the coproduction of different chemical feedstocks alongside the cellulosic ethanol to increase the economic feasibility of the industrial production of cellulosic ethanol (Zhao and Liu, 2019; Rosales-Calderón and Arantes, 2019; Chandel et al., 2019).

20.2.4 Enzyme-Based Initiatives for Ethanol Production at Commercial Scale

Although Brazilian initiatives to stimulate cellulosic ethanol production have been made in the last few years (e.g. investments from the Brazilian Development Bank for the construction of cellulosic ethanol facilities), recently those investments have been drastically reduced mainly by the technical issues in the plants that hindered the full implementation of this technology in Brazil. Indeed, other types of ethanol production feedstock have been emerging, like corn, which is abundant and generally cheap. Since 2014, corn starch ethanol production has been increasing in Brazil to attend to the demand for biofuels required by Brazilian policies during the summer rainy season when sugarcane is not available. Since then, its production has been higher than cellulosic ethanol production. According to the Brazilian Corn Ethanol Union (*União Brasileira de Etanol do Milho* - UNEM), the total corn ethanol production in 2020/21 is estimated as 2.5 billion liters, which represents an increase of 1.17 billion liters when compared to 2019/20 (Bini, 2020).

Brazil has two commercial-scale facilities for the production of ethanol from sugarcane biomass: Bioflex, in the state of Alagoas, from Granbio (82 million liters production capacity) and Raizen – Costa Pinto Unit in the state of Sao Paulo (42.2-million liters production capacity). GranBio built its first unit in Alagoas with the technology based on the pretreatment developed by PROESA of the BetaRenewables (company Group M&G). The enzymes are from Novozymes, and the yeasts were developed by DSM (GranBio, 2014). GranBio started operation in September 2014 and due to technical difficulties in the pretreatment stage, they resumed the cellulosic ethanol production operations in 2016 (Susanne, 2016; Kennedy, 2019). Granbio is currently diverting the

biomass to the thermoelectric plant and in 2020 it announced a strategic alliance with NextChem to license its patented technology for the production of cellulosic ethanol (GranBio, 2020). Raizen – Costa Pinto Unit is the only one producing cellulosic ethanol at a relatively large scale. Raizen, a company based on the merger of Shell and Cosan, in partnership with Iogen Corporation, in November 2014, began the operation of its biomass-to-ethanol facility in Piracicaba, São Paulo, using Iogen Energy's technology (RAIZEN, 2014; IOGEN, 2015). The company also signed an agreement with Novozymes regarding the development of enzyme technology for 2G ethanol production (UNICA, 2014). In 2016, the company announced reductions in its cellulosic ethanol investment due to low gasoline prices (Jim, 2016), and strategically, since 2019, it has been supplying cellulosic ethanol to O Boticário, one of the biggest beauty and cosmetics companies in Brazil (Vital, 2021).

The cellulosic ethanol production downturn is worldwide. The plants Beta Renewables, DowDuPont, Abengoa, and POET-DSM have announced bankruptcy, a break, and switched the energy matrix, respectively (Scott, 2018; Lane, 2017; Erin, 2016; Bomgardner, 2019). Even though the industrial production of cellulosic ethanol became a reality, it is clear that the cost-effectiveness of the production is still impracticable. Incentives and investments ended up being reduced due to fear of the persistent high cost linked to its production. Thus, solutions for lowering the costs must be developed and tested to once again the investments return to arise. Indeed, the projections indicate a worldwide demand for ethanol. In this sense, Raízen announced the construction of a second cellulosic ethanol facility by 2023. According to Marcelo Eduardo Martins, the investor relationship vice-president of the group, the new facility will meet the growing international demand for the product (Reuters Staff, 2021).

20.2.5 Perspectives on the Use of Microalgae as Sources of Fermentable Sugars

Algae are simple photosynthetic organisms with no roots, stems, or leaves (Andersen, 2013). They are responsible for half of the world's photosynthetic activity, with a large part occurring in the oceans (Falkowski and Raven, 2007). Due to the great diversity of species, varying between microscopic (microalgae) and macroscopic (macroalgae), there is no consensus on the definition of this group of organisms.

When comparing the use of algae to agricultural crops for obtaining bioproducts, they have several advantages over the latter: i) high photosynthetic efficiency; ii) do not require arable land; iii) do not need freshwater; iv) do not present seasonality (Sayre, 2010). Moreover, both macro- and microalgae have been shown to grow on wastewater (Ge and Champagne, 2017; Nagarajan et al., 2020) and the CO₂ required for their growth can be obtained from industrial plants, with the flue gas line being diverted to the aqueous culture medium (Cheah et al., 2014). These alternatives would minimize the production costs and offer additional advantages for algae production; however, they are still in the research phase and have not been applied on the industrial scale for biomass production for further recovery of bioproducts.

Regarding the Brazilian prospects for microalgae technology, Brazil has a high global solar irradiation in any region of its territory, of 4200–6700 kWh/m², which is higher than for most countries in the European Union, at 900–1850 kWh/m². Moreover, as a great part of its territory is located near the equator, Brazil has an even distribution of sunlight throughout the year (Pereira et al., 2017). Recent studies have identified more than 3000 algae species in Brazil, with two endemic genera and 52 endemic species (Bicudo and Menezes, 2010). Therefore, Brazil has enormous potential for growing microalgae, a potential thus far hardly explored.

Studies on the use of microalgae as sources of biomolecules for fuel and chemicals production have been increasing in recent decades. Historically, the idea of using algae as an energetic feedstock dates back to the end of the 1950s and was furthered by the 1970s oil crisis (Chen et al., 2009). From 1978 to 1996, the US Department of Energy invested US\$ 25 million in a program on the study of algal fuels, achieving great advances in this field (Waltz, 2009). As some species of microalgae, when cultivated under metabolic stress, can accumulate higher amounts of lipids as an energy reserve (Brindhadevi et al., 2021; Mata et al., 2010), they have been mostly studied for biodiesel production. However, carbohydrate-rich algae have also been gaining attention in the last decade as a potential source of fermentable sugars for the production of ethanol and other biochemicals. Indeed, as observed for lipid accumulation, certain microalgae species, under metabolic stress, increase their intracellular carbohydrate content, making them more attractive as a feedstock for obtaining high-concentration sugar syrups (Souza et al., 2020). Common algae, such as species belonging to the *Chlorella* genus, can accumulate between 10% and 80% of carbohydrates depending on the cultivation conditions (Souza

et al., 2020, 2017). Table 20.1 presents the biochemical composition of different starch-accumulating microalgae.

Table 20.1. Content of carbohydrates (starch content shown in parentheses), lipids, and proteins of several microalgae species.

Species	Carbohydrates (starch) (%)	Lipids (%)	Proteins (%)	Reference
<i>Arthrospira platensis</i>	~ 60	~ 5	~ 25	(Markou et al., 2013)
<i>Chlamydomonas fasciata</i>	n.d. (43.5)	n.d.	30.4	(Asada et al., 2012)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	59.7 (43.6)	n.d.	9.2	(Choi et al., 2010)
<i>Chlorella variabilis</i>	53.9 (37.8)	24.7	19.8	(Cheng et al., 2013)
<i>Chlorella vulgaris</i>	50.4 (31.3)	11.6	23.3	(Ho et al., 2013)
<i>Dunaliella salina</i>	32	6	57	(Becker, 2007)
<i>Mychonastes homosphaera</i>	76 (55)	14	6	(Mota et al., 2018; Souza et al., 2017)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	35 (28)	23	30	(Mota et al., 2018; Souza et al., 2017)

n.d. – not determined

Carbohydrates in microalgae can be found in the cell wall (Scholz et al., 2014; Takeda, 1988), and as intracellular starch (Brányiková et al., 2011; Souza et al., 2017). Since the cell wall of microalgae only accounts for a small part of their dry weight, i.e. between 3-6% (Scholz et al., 2014; Takeda, 1991), the intracellular starch can be considered the main potential source of fermentable sugars in these microorganisms. Nevertheless, the cell walls play an important part in this technology, as they act as a physical barrier that needs to be ruptured before accessing the intracellular starch for further processing the biomass into fermentable sugars (Günerken et al., 2015).

Starch is an insoluble and semi-crystalline glucose polymer whose fundamental unit is maltose, a glucose dimer with an α -1,4 bond. This polymer consists of two distinct fractions, amylopectin, and amylose. Amylose consists of a linear maltose chain without branches, while amylopectin also has α -1,6 bonds, branching its structure (Takeda et al., 1987). Starch molecules stored intracellularly are always found in the form of granules (Buléon et al., 1998), as shown in Figure 20.2. These granules are formed mainly due to the presence of amylopectin. The chains originating from the branches align and form double helices, giving rise to the crystalline sections of the starch chains, which are insoluble and responsible for the collapse of the structure in granular format. The chain

fractions close to the branching points are part of the amorphous sections of the polymer (Imberty et al., 1991).

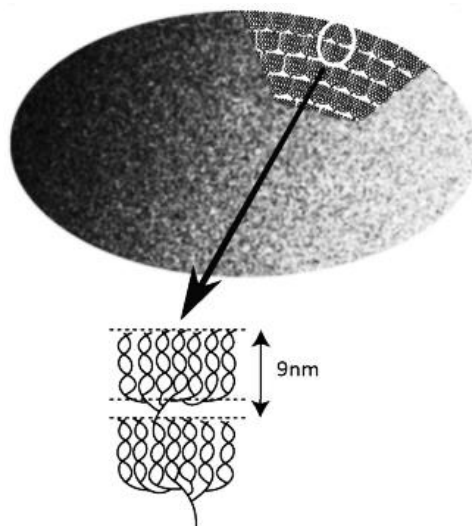


Figure 20.2. Starch granule with emphasis on the formation of double helices in the amylopectin chains (Ball et al., 2011).

Due to this crystalline nature, starch in its native form is not easily degraded. However, when heated, the starch undergoes a gelatinization process (Ratnayake and Jackson, 2008), which results in the disorganization of the crystalline fractions, and becomes more susceptible to hydrolysis by amylases (Slaughter et al., 2001). Several factors determine the extent and rate of hydrolysis of starch granules, including granule size and morphology and the ratio of amylose and amylopectin present (Svihus et al., 2005). In general, hydrolysis of amylopectin-rich starches is faster than that of amylose-rich starches (Tester et al., 2006).

For the complete hydrolysis of starch, several enzymes are required. The main ones are α -amylases (EC 3.2.1.1), β -amylases (EC 3.2.1.2), and amyloglucosidases (EC 3.2.1.3), which act on α -1,4 bonds; the first acts internally in the depolymerization of the chains, releasing dextrins, while the others act from the non-reducing terminals, releasing maltose and glucose, respectively. Other enzymes, called isoamylase (EC 3.2.1.68) and pullulanase (EC 3.2.1.41), hydrolyze α -1,6 bonds, acting on the branches and helping the action of the former.

In a well-established corn ethanol industry, corn starch undergoes two subsequent stages of enzymatic hydrolysis to generate glucose syrup. The first stage consists of liquefaction, in which commercial α -amylase from thermoresistant bacteria of the genus *Bacillus* is used at temperatures of 90 to 110 °C; at this temperature, the starch is also gelatinized. Then, there is the saccharification stage, with the action of fungal amyloglucosidases at 60-70 °C (Sánchez and Cardona, 2008). Although this process is well established, it generates high energy costs. An alternative is the hydrolysis of starch at low temperatures, without the prior need for a gelatinization step. Several amylases have already been described as being able to digest starch *in natura*, without the need for this step; however, in general, greater amounts of enzymes are required than for the hydrolysis of gelatinized starch (Robertson et al., 2006).

As the microalgal starch processing industry still does not exist, there is no established process for its hydrolysis, with the existing research studies varying between using or not a gelatinization step (Souza et al., 2020). Moreover, as mentioned before, there is usually the need for a cell wall disruption step either simultaneously or before the enzymatic hydrolysis of the intracellular starch, which also varies between studies. Table 20.4 shows the different treatments and yields obtained in the main studies published in the area of enzymatic hydrolysis of microalgae for the production of glucose syrup.

As can be seen from Table 20.2, only milling has been used consistently in several studies for cell wall rupture, probably as this mechanic process is independent of cell wall composition and is guaranteed to work as long as enough energy is given during treatment. Even though enzymatic hydrolysis of the cell wall of microalgae has been explored as a method for cell wall disruption, this is highly dependent on the cell wall composition, being genera- or even species-specific (Gerken et al., 2013). For instance, Choi et al. (2010) reported the rupture of the cell wall of *Chlamydomonas reinhardtii* by treatment with commercial α -amylase rich in proteases, since the cell wall of this microalgae is composed of glycoproteins. Another study conducted with several enzymes concluded that the cell wall of *C. vulgaris* was susceptible to the action of chitinase, lysozyme, pectinase and pectinase (Gerken et al., 2013).

Table 20.2. Reported glucose yields for the enzymatic hydrolysis of starch-rich microalgae (as presented in Souza et al. (2020)).

Microalgae	Treatment	Solids loading	Glucose yield (reaction time)	Reference
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Proteases/Liquefaction	50 g/L	94 % (30 min)	(Choi et al., 2010)
<i>Chlorella</i> sp.	Milling/gelatinization	22 g/L	97 % (24 h)	(Maršáľková et al., 2010)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Sonication/autoclave	10 g/L	79 % (24 h)	(Ho et al., 2013)
<i>Chlorella variabilis</i>	Virus infection	4.25 g/L	43 % (120 h)	(Cheng et al., 2013)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Milling	100 g/L	79 % (72 h)	(Kim et al., 2014)
<i>Chlorella</i> sp.	Lipid extraction	50 g/L	93 % (3 h)	(Lee et al., 2015)
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	Milling/gelatinization	20 g/L	96 % (1 h)	(Chng et al., 2017)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Milling	100 g/L	91 % (4 h)	(de Farias Silva et al., 2018)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Milling	111 g/L	94 % (4 h)	(Souza et al., 2020)

In addition to the use of commercial enzymes, another approach that has been used is the co-culture of microalgae with bacteria or viruses that produce enzymes capable of degrading their cell wall. Cheng et al. (2013), for instance, used virus infection as a strategy to increase the hydrolysis yield of *Chlorella variabilis* starch by 80%. An innovative alternative that is still in the preliminary stage of studies is the use of enzymes from the algae itself in a process called autolysis, which occurs naturally during the cell division process. Some enzymes involved in this process have already been identified; however, the only work to induce autolysis in algae was carried out to mitigate the phenomena of red tide and overproliferation (Demuez et al., 2015).

20.3 Technical and Economic Prospects of Using Lipases in Biodiesel Production

20.3.1 Current Biodiesel production and perspectives

Biodiesel is composed of mono-alkyl esters, commonly methyl and ethyl esters, with similar properties to petro-diesel (Robles-Medina et al., 2009). Biodiesel is produced from vegetable oils or animal fats; its application has gained attention over the years as a potential substitute for crude oil-based diesel due to its implications in global

warming by reducing carbon monoxide emissions particulates, hydrocarbons, and sulfates. When blended with petro-diesel, the emissions reduction of the resultant fuel depends on the blend's composition. Besides, biodiesel can degrade at a much faster rate than petro-diesel. Biodiesel use has already been implemented in several countries worldwide (Almeida et al., 2021; Robles-Medina et al., 2009). Indonesia, Brazil, United States, and Germany are among the largest biodiesel producers in the world, totaling 24.1 billion liters produced in 2019. In the same year, Indonesia rose to be the world's largest biodiesel producer reaching nearly eight billion liters. The implementation of the Energy Policy Act of 2005 in the U.S., which provided tax incentives for certain types of energy, led to an increase in biodiesel production. Future projections estimate production levels of over 1 billion gallons of biodiesel by 2025 (<https://www.statista.com/statistics/271472/biodiesel-production-in-selected-countries/#statisticContainer>).

In Brazil, biodiesel production and use are mandatory since the creation of the National Program for Use and Production of Biodiesel (PNPB) in 2004, which was implemented by the law nº 11.097 of January 2005. The PNPB established a minimum percentage of biodiesel blended with crude oil diesel of 2%, named B2, in January 2008, which has increased over time (Ribeiro and Silva, 2020). B11 was adopted in September 2019; although the production capacity was 9.2 million m³ with forty-two authorized plants in operation, the national production achieved 5.9 million m³ (64% of the total capacity) in that year. However, the production was 10.3% superior to 2018 (ANP, 2020). Currently, Brazil uses B13 with perspectives to reach B14 on March 1st, 2022, and B15 on March 1st, 2023 (MME, 2020). Considering these perspectives, the Mines and Energy Ministry coordinates a group aiming to attend the Report of Consolidation and Validation Tests and Trials for the Utilization of B15 Biodiesel in Engines Vehicles by the definition of oxidation stability reference established by ANP Resolution nº 798, from August 1st, 2019. Moreover, the literature has been reported that blends up to B20 are adequate and compatible with most of the petro-diesel equipment available, including storing and distribution ones (Balat, 2011; MME, 2020).

Nowadays, the technology broadly adopted for biodiesel production is alkaline transesterification, using methanol as an acyl acceptor. This route presents some drawbacks – generation of large amounts of highly alkaline wastewater (with significant environmental impacts that impose additional handling costs), production of impure glycerol by-product (contaminated with alkaline catalyst), and laborious catalyst

recovery. Furthermore, the alkaline route requires high-quality and expensive raw materials that represent around 80% of the total biodiesel production costs, hindering the economic competitiveness of this biofuel (Demirbas, 2007; Pourzolfaghar et al., 2016; Robles-Medina et al., 2009; Sharma et al., 2008). Therefore, using low-cost feedstocks could make biodiesel more suitable for commercialization.

Lipases have been highlighted as powerful tools for synthesizing esters by biocatalysis to produce several products, including biodiesel. Biocatalysis can circumvent the drawbacks of chemical catalysis, and thus, several studies focus on developing new technologies in biodiesel production to increase its competitiveness in the international fuel market. Particular attention has been given to biocatalysis using lipases, and, more recently, bioprocesses using whole-cells as biocatalysts also emerged as a potential alternative. The use of lipases or whole-cells for biodiesel production requires relatively simple downstream processing steps to purify biodiesel. Besides, the by-product glycerol (without catalyst contamination) has better quality, and consequently, a higher value. Furthermore, enzymatic processes allow the use of cheaper raw materials that contain high FFA (free fatty acids) and water content, as lipases can catalyze both esterification and transesterification reactions (Aguieiras et al., 2013, 2017; Souza et al., 2009; Zeng et al., 2017; Zheng et al., 2020).

Lipases are versatile biocatalysts and can act in different functional groups and substrates, under several reaction conditions, in different chemical transformations, and with different transition states. Moreover, lipases show regio-specificity (the distinction between positions 1 and 3 of the triacylglycerols), specificity in terms of fatty acids and alcohol present in the synthesis/hydrolysis, and stereo-specificity. In general, these enzymes also show stability in the presence of organic solvents (Kapoor and Gupta, 2012). Typically, lipases are found in the environment, being produced by multicellular eukaryotes (animals and plants) and microorganisms in general, present in the three domains (Eukarya, Archaea, and Bacteria). Lipases of animal origin are responsible for the metabolism of lipids; in plants, they are present in the energy reserve tissues of several species (Sharma et al., 2001), and can also be found in the seeds of several angiosperms such as castor - *Ricinus communis* (Greco-Duarte et al., 2017), physic nut - *Jatropha curcas* (De Sousa et al., 2010), and others like sunflower (*Heliantus annuus L.*) and wheat (*Triticum aestivum L.*) (Barros et al., 2010).

Due to their advantages and versatility, lipases are among the most frequently used groups of enzymes in the industrial sector worldwide.

20.3.2 Biocatalytic production of biodiesel

The concepts of lipases and esterases are often mixed up since both enzymes are versatile and catalyze the same diversity of reactions. The definition of esterases compared to lipases is still widely discussed, and over the years, several studies have been carried out to distinguish them. Despite all efforts and criteria of distinction that have been proposed, no consensus has been reached in the scientific community. However, a reorganization was suggested only in a pragmatic way which divides the large group of carboxyl ester hydrolases into lipolytic esterases (LEst or lipases: E.C.: L3.1.1.1) and non-lipolytic esterases (NLEst: E.C.: NL3.1.1.1) (Romano et al., 2015).

A possible difference is in the concept that, by definition, the natural function of lipases is to catalyze the hydrolysis of ester bonds present in long-chain triacylglycerols (TAGs), releasing diacylglycerols (DAGs), monoacylglycerols (MAGs), glycerol, and fatty acids. There is no explicit definition for the term “long chain” triacylglycerol; however, the “standard substrates” for lipases are believed to be those whose chains contain more than 8 carbon atoms. It is important to note that lipases can hydrolyze esters of smaller chains, unlike esterases that only hydrolyze esters with chains whose size is less than 8 carbon atoms (Romano et al., 2015). Thus, it can be inferred that all reactions catalyzed by esterases can be catalyzed by lipases, but not all reactions catalyzed by lipases can be catalyzed by esterases. It is a common consensus that lipases are esterases that act on long-chain acylglycerols (Jaeger et al., 1999; Mancheño et al., 2003). Triacylglycerol is just one example compared to all other compounds that can be substrates for these enzymes, whether they are of low or high molar mass. The possible substrates for lipases vary and range from amides, thioesters, fatty acids, hydroxy fatty acids, and others.

Despite the efforts to rename the groups, the official nomenclature designated by the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB), in which lipases and esterases are within the EC 3.1.1 group whose classification is hydrolases, carboxylic ester or hydrolases, is still being evaluated. Esterases or carboxylesterases (EC 3.1.1.1) are systematically classified as carboxylic ester hydrolases as well as the group name, and lipases or TAGs lipases (EC 3.1.1.3) are systematically classified as triacylglycerol acylhydrolases. The natural function of these enzymes is, as stated above,

the hydrolysis in an aqueous medium of ester bonds releasing fatty acids and alcohol, as shown in Figure 20.3.

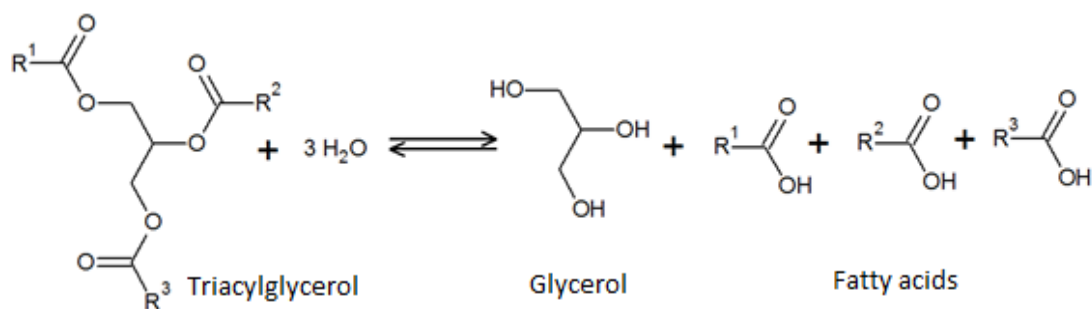


Figure 20.3. Hypothetical example of the natural reaction catalyzed by lipases and esterases. Hydrolysis of triacylglycerol are in direct sense of the reaction producing glycerol and fatty acids as products ($\text{R}^1 = \text{or} \neq \text{R}^2 = \text{or} \neq \text{R}^3 \mid \text{R}^1 < 8 \text{ carbon atoms}$).

However, in water-restricted environments, these enzymes can catalyze reverse synthetic reactions such as interesterification, transesterification, and esterification (Figure 20.4) (Jaeger and Reetz, 1998; Paques and Macedo, 2006; Sharma et al., 2001).

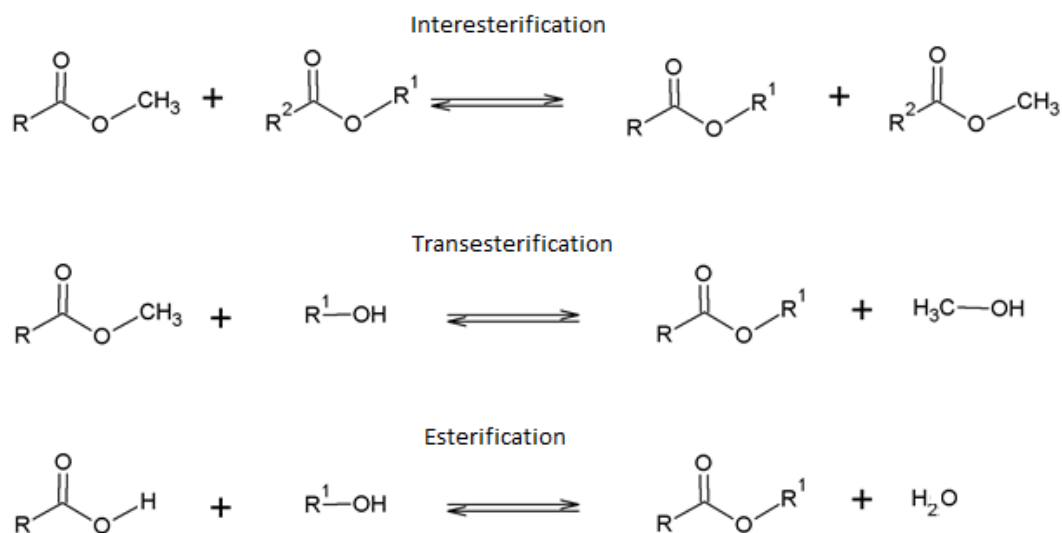


Figure 20.4. Example of synthesis reactions performed by lipases and esterases.

In this chapter, the majority of reports boarding the enzymatic biodiesel production treated the enzymes as lipases. In industrial production, greater emphasis is given to those enzymes produced by microorganisms since they have a shorter generation time and great versatility of operating conditions. Besides, they are easy to manipulate genetically, aiming to improve their production capacity and cultivation conditions, which increases their biotechnological interest (Pereira Jr. et al., 2008; Sharma et al., 2001). These enzymes are active for the transesterification of vegetable oils and other oils into fatty acid methyl esters (FAME) or fatty acid ethyl esters (FAEE). Moreover, literature also shows the enzymatic transesterification of oils with other acyl acceptors such as 1-propanol or 1-butanol (Ma et al., 2019), 2-propanol (Kumar et al., 2018), and enzymatic interesterification of oils with ethyl acetate (Kovalenko et al., 2015) all known as biodiesel in the literature.

20.3.3 Feedstocks used for Biodiesel Production

The evaluation of the feedstock to be used has utmost importance since the feedstocks significantly impact the production costs of biodiesel and bring some specificities for the process. Each country has specific quality requirements to produce and commercialize biofuels (Budzaki et al. 2017), and the feedstock needs to be adequate to match these requisites. The use of refined oils can facilitate the achievement of these requirements. However, the use of soybean oil, corn oil, or any oil whose grains are included in human feeding implies a discussion about competition between biofuel and food, and problems caused by monoculture in the ecosystem. In addition, the use of refined oils reduces the competitiveness of biodiesel compared to crude-oil diesel. Therefore, the utilization of alternative feedstocks can assure the future of this biofuel. Alternative feedstocks include non-edible and crude vegetable oils, grease and animal fats, microbial oils (e.g. from microorganisms and microalgae), and residual oils (e.g. deodorizer distillate from the process of refinement) (Table 20.3). The availability of these oils in each country will be the main choice-point to consider (Aarthy et al., 2014).

Palm and soybean oils are the main feedstocks used for biodiesel production worldwide. In the Brazilian context, through 2019, soybean oil remained the primary raw material for the B100 production, reaching 68.3% of the total, which means an increase

of 9% compared to 2018. Other feedstocks, which include canola oil, castor oil, corn oil, palm oil, peanut oil, sesame oil, sunflower oil, turnip oil, used frying oil, and other fatty materials, accounted for the second-largest amount used (16.5% of the total), followed by animal fat (14.1% of the total) and cotton oil (1.1%) (ANP, 2020).

The increasing use of waste oils is due to the significant contribution of the raw material's cost in biodiesel's total production costs. However, since waste oils contain >1% of FFA, their use in alkaline transesterification requires a pre-treatment step to avoid the formation of soaps as by-products, leading to an increase in the total cost. Besides, waste oils also contain high levels of water, reducing the yields of the reaction (Budžaki et al., 2017; Sharma et al., 2008). Considering the ability of lipases to convert both FFA and acylglycerols into esters (biodiesel), these biocatalysts become promising alternatives for obtaining biodiesel from these sources, with fewer pre-treatment steps.

Table 20.3. Examples of alternative feedstocks (waste oils and non-conventional oils) adopted for biodiesel production.

Non-conventional oils/ waste oils	References	Non-conventional oils/ waste oils	References
Karanja oil (<i>Milletia pinnata</i>)	Kumar et al. (2018)	Rapeseed oil deodorized distillate	Zeng et al. (2017)
Crambe oil (<i>Crambe abyssinica</i> Hochst)	Tavares et al. (2018)	Soybean oil deodorized distillate	Zheng et al. (2020) Souza et al. (2009)
Babassu oil (<i>Orbignya</i> sp.)	Molgero Da Ros et al. (2014)	Waste cooking oil	Tacias-Pascacio et al. (2017) Chesterfield et al. (2012) Waghmare and Rathod (2016)
Macauba oil (<i>Acrocomia aculeata</i>)	Aguieiras et al. (2014)	Palm fatty acid distillate	Kapor et al. (2017) Aguieiras et al. (2013) Chongkhong et al. (2009)
Garcinia Gummy-gutta oil	Subramani et al. (2018)	Algal oil	Prabakaran et al. (2019)
Neem oil (<i>Azadirachta indica</i>)	Aransiola (2012)	Yeast oil	Duarte et al. (2015)
Physic nut oil (<i>Jathropa curcas</i> L.)	De Sousa et al. (2010)	Animal fat	Toldra-Reig et al. (2020)

Feedstocks with high FFA content and lower cost have also been used for enzymatic biodiesel production, with conversions above 90% - crude vegetable oils (Aransiola, 2012; Kumar et al., 2018; Prabakaran et al., 2019), waste cooking oils and wastes from vegetable oil refining (Chesterfield et al., 2012; Collaço et al., 2020; Waghmare and Rathod, 2016; Zeng et al., 2017; Zheng et al., 2020, Guo et al., 2020), and

non-edible oils obtained from many plant species potentially available in a local area (Aguieiras et al., 2014; Arumugam et al., 2018; Subramani et al., 2018).

Microalgae are another alternative lipid source potentially applicable for biodiesel production. The microalgae lipid content varies from 1 to 70% but can be as high as 90%, depending on species and cultivation conditions. Common algae, including the genus *Chlorella*, presents lipid contents between 20 and 50% (Chisti, 2007; Mata et al., 2010). One factor that drove attention to microalgae as a feedstock for biodiesel production is their high oil yield per cultivated area. Palm, the most productive oleaginous land plant, has a yield of 5,950 liters of oil per hectare, while a microalga with 30% lipid content presents a yield of 58,700 liters per hectare (Chisti, 2007). The use of oleaginous organisms as a platform for efficient oleochemical production has been recently highlighted (Khoo et al., 2020; Marcon et al., 2019; Prabakaran et al., 2019).

Some issues have emerged regarding the oil extraction that requires cell disruption and treatment of the proteins, carbohydrates, and other by-products generated during the biosynthesis (Meng et al., 2009). Nevertheless, microbial oils also differ from most vegetable oils in the ratio of polyunsaturated fatty acids, resulting in biodiesel that could be more susceptible to oxidation (Meng et al., 2009; Salimon et al., 2012). However, promising results were obtained using immobilized lipases in enzymatic transesterification of oils extracted from *Chlorellas*, with yields of 98% (Li et al., 2007; Tran et al., 2012). Also, crude oil and microbial oil contain other minor components as phospholipids, that has shown an inhibitory effect on immobilized lipases (Li et al., 2013; Meng et al., 2009; Nordblad et al., 2016). Li et al. (2013) studied the effect of phospholipids in free lipases from *Aspergillus niger* during biodiesel production. The authors found out that free lipase exhibited better reuse stability, showing that free lipases could be promising for biodiesel production from crude oils.

Besides the challenges, the use of such alternative feedstocks for enzymatic biodiesel production opens several benefit pathways. The diversification of the oil crops used for biodiesel production contributes to the best use of regional resources and maintenance of biodiversity. Furthermore, after pressing the seeds to extract the oil, the by-product (cake) can be used as fertilizer for soil enrichment or as a substrate to produce enzymes and other valuable products by solid-state fermentation. The use of waste oils can diminish the discharge of oil-rich contaminated effluents, reducing the environmental impact caused by improper disposal of such oils. In both cases, the diversification of the sources enables the development of high-value products from low-value raw materials.

20.3.4 Enzymatic routes for biodiesel production

The biocatalytic route (using lipases or whole-cells as catalysts) can overcome some of the alkaline or acid catalysis difficulties in biodiesel synthesis. Lipases can catalyze biodiesel production by different routes – esterification (from FFA), interesterification/transesterification (from tri-, di-, and monoacylglycerols), or hydroesterification (hydrolysis followed by esterification using complex oily matrixes). Each of these enzymatic routes has specific features, as shown in Table 20.4. Besides, biocatalytic processes present gains related to the use of heterogeneous catalysis (enzyme immobilized on solid support acting in liquid reaction media) and milder conditions, which reduce costs and downstream steps.

Table 20.4. General Considerations About the Different routes for Biodiesel Production.

	Type of Catalyst	
	Chemical Homogeneous Catalysis	Biocatalysis (immobilized lipases)
Routes	Mild (alkaline) or high (acid) temperatures High conversions (>90%) Low-cost catalysts Acid/Alkaline wastewater Complex downstream and purification processes Catalysts usually can not be reused	Mild/low temperatures No-formation of hazardous wastes High conversions (>90%) High-cost biocatalysts Simple downstream Biocatalysts can be reused Possible inhibition of lipases by short-chain alcohols
Esterification	Applied only for acid catalysts FFAs of raw material are esterified to biodiesel Requirement of raw material with low water content Corrosion of the equipment by the acid catalyst	Raw material with high FFA content Enzymes have less sensibility to the water in the feedstock
Transesterification	Applied for alkaline catalysts Raw material with low FFA content (< 0.5%) and water content (<0.1–0.3%) Short reaction time (90 min); The high quality raw material can represent 70–95% of the final cost of biodiesel Crude glycerin contaminated with salts of catalyst neutralization post-reaction	Long reaction time (8-72h) Accumulation of glycerol on immobilization support Food-grade glycerol
Hydroesterification	Use of two different catalysts Standardization of the raw material – converting all acylglycerols into FFA	No limitations related to raw material quality Lipase used in hydrolysis, esterification (hybrid processes), or

Corrosion of the equipment by the acid catalyst	both steps (enzyme/enzyme hydroesterification) Food-grade glycerol
---	---

Esterification is a single-step process in which fatty acids and alcohols react, producing fatty acid methyl esters (FAME) or fatty acid ethyl esters (FAEE), and water. Alkaline catalysis is not adequate for esterification due to the reaction of alkalis with fatty acids (formation of soaps). The use of acid catalysis makes the process feasible but at rates lower than those observed with alkaline catalysis. Esterification reactions mediated by biocatalysts can be successfully carried out in solvent-free systems, attaining high conversions at intervals lower than 12 h (Talukder et al., 2010; Trentin et al., 2014; Mulalee et al., 2015; Aguiéiras et al., 2017; Collaço et al., 2020).

Lipases are susceptible to enzymatic inhibition by short-chain alcohols, whose effect may become quite significant for the process depending on the enzyme loading adopted. The use of a hydrophobic solvent in the reaction media can overcome this limitation. However, reactions with solvents have less volumetric productivity and are less advantageous, considering the complexity of the downstream operations required. In this sense, esterification in solvent-free systems can be performed through controlled feeding of alcohols in the reaction medium, a strategy that has been successfully adopted on a lab scale. Another possible strategy is interesterification, in which fatty acids react with an alternative acyl donor (such as methyl and ethyl formate or acetate, among others) rather than methanol or ethanol. Interesterification has the advantage of producing a co-product with a higher-added value than glycerine (Kashyap et al., 2019; Subhedar and Gogate, 2016). However, the costs related to these acyl donors should be considered.

Transesterification by alkaline catalysis is the most widely adopted process for biodiesel production. This process requires raw materials (triacylglycerols obtained from oilseed plants) with low free fatty acid levels to avoid saponification, a limitation not observed with biocatalysis. In this case, biocatalysis allows greater versatility of raw materials, including residual sources with high content of FFA. Transesterification generates glycerin as a by-product. The increase of the biodiesel volumes obtained via transesterification has caused an economic devaluation of glycerin due to its over-production. Thus, the use of dimethyl carbonate instead of methanol or ethanol has been investigated by some groups generating glyceryl carbonate as a by-product (Su et al., 2007; Zhang et al., 2010, Gharat and Rathod, 2013; Gu et al., 2015). Considering the

specificity and selectivity of lipases and their easy separation from the medium (when used in the immobilized form), the glycerin produced has a higher degree of purity (food-grade glycerol) than that obtained by conventional catalysis, with a high sale value.

Hydroesterification has been highlighted in recent years considering the use of residual raw materials or increase in value of the formed glycerin. Hydroesterification is a two-step process that involves the hydrolysis of acylglycerols (converting them to free fatty acids) and subsequent esterification. Glycerin is released during hydrolysis by lipases with a low degree of contamination (Meher et al., 2006; Pourzolfaghar et al., 2016), and the resulting fatty acids are esterified with the assistance of lipases to FAME/FAAE. Hydroesterification gains importance to valorize oily residues, such as waste cooking oil (WCO), which contains a non-standardized mixture of tri-, di- and monoacylglycerols, and free fatty acids. The hydrolysis process standardizes the raw material to fatty acids that can be further reacted with methanol or ethanol. Hydroesterification processes using residual or crude oils with high yields have been described in the literature (Watanabe et al., 2007; Talukder et al., 2010; Aguiéiras et al., 2014; Bressani et al., 2015; Tacias-Pascacio et al., 2017; Zheng et al., 2020). The use of biocatalysis can also complement the chemical catalysts in a hybrid process – enzymatic hydrolysis of the raw material and posterior chemical esterification (De Sousa et al., 2010) or non-enzymatic hydrolysis followed by lipase esterification (Soares et al., 2013). In addition, another possible strategy consists of applying the enzymatic esterification as a pre-treatment to reduce the acidity of the feedstock, with posterior alkaline transesterification (Nordblad et al., 2016).

The use of biocatalysts in biodiesel production processes also presents some constraints, mainly related to enzymatic activity (which impacts reaction rates), operational stability, and reusability (crucial parameters to the economic feasibility of the process). The literature describes great efforts in the last decades to address these issues, including the use of ionic liquids (Sunitha et al., 2007; Arai et al., 2010; de Diego et al., 2011; Liu et al., 2011; Abrahamsson et al., 2015, Merza et al., 2018), deep eutectic solvents (Abbot et al., 2007; Huang and Yang, 2014; Zhao et al., 2013; Hayyan et al., 2014, Kleiner et al., 2016), supercritical solvents (Madras et al., 2004, Rathore and Madras, 2007; Varma and Madras, 2007; Lee et al., 2011, Taher et al., 2020), reactions assisted by ultrasound or microwaves (Ji et al., 2006; Santos et al., 2009; Kumar et al., 2011; Veljković et al., 2012, Da Rós et al., 2014; Feiten et al., 2014; Gupta et al., 2020; Sáez-Bastante et al., 2015; Souza et al., 2016), and alternative reactors configuration,

mainly fixed-bed reactors (Andrade et al., 2019; Hama et al., 2007; Hama et al., 2011; Nie et al., 2006) with different degrees of feasibility in a large-scale context.

As lipases can catalyze different chemical reactions, such as hydrolysis, esterification/transesterification, amidation, and epoxidation, it is theoretically possible to integrate biodiesel production in a biorefinery context. Refining processes of vegetable oils (soybean or palm, for example) generate FFA-rich residual streams. These fatty acids can be converted into esters using lipases, producing biodiesel (in reactions with short-chain alcohols) and/or biolubricants (in reactions with medium/long-chain alcohols or polyalcohols). Residual biomasses, such as straws and fibers, can have their polymeric sugars deconstructed by specific enzymatic processes; the released sugars can also be reacted with fatty acids in reactions catalyzed by lipases to produce surfactants such as SFAE (sugar-fatty acid ester), widely adopted in the food industry. These residual biomasses can also be subjected to anaerobic fermentation processes, producing biohydrogen and biogas (H_2 and CH_4). The variety of compounds present in biomass can also lead to the exploration of compounds potentially applied as antioxidants and additives, enhancing biodiesel (or biolubricants) properties. These theoretical possibilities can be explored, considering all the advantages of enzymatic processes compared to conventional catalysts, and adding value to agro-industrial residues.

20.3.5 Enzymatic biodiesel: state of the art

Although biodiesel has been produced on a large scale in Brazil for at least two decades, there are no industrial plants that adopt enzymatic technologies or produce biodiesel from residual raw materials. Even in global terms, few examples of companies are currently using the biocatalytic route to obtain biodiesel, despite the notable scientific progress in this field and the abundant related literature available. In 2014, the American Blue Sun Energy Company inaugurated a commercial-scale plant with a production capacity of 135,500 m³ per year of biodiesel using enzymatic biodiesel technology developed by Novozymes (Novozymes, 2014). Moreover, Novozymes developed specific enzymes for biodiesel production – Eversa Transform – which has been tested and applied by different companies worldwide, as Spain-based Oleofat Trader S.L. and Aemetis Inc. (U.S.) that is currently producing enzymatic biodiesel in an industrial plant in India, using palm-oil derivatives as raw material. SRS Biodiesel (U.S.) describes in their

portfolio of technologies, enzymatic transesterification using solvents to produce biodiesel in different industrial plants in the United States. Enzymocore, an Israel-based company, has been developing enzymes for biodiesel production and producing enzymatic biodiesel on a commercial or pilot-scale since 2013 in South Korea, China, Peru, Germany, and Israel (<https://enzymocore.com/our-operations>).

Despite some potential technical challenges to be overcome – inhibition by methanol/ethanol, accumulation of glycerol on the surface of the immobilization support, lack of high operational stability and reuse capacity – the main obstacle to the widespread use of the biocatalysis for biodiesel production (as well as for other chemical commodities) is the cost of lipases. The cost of lipases exceeds the cost of other raw materials (including acid or alkaline catalysts) by several magnitude orders. In an economic assessment of enzymatic biodiesel production carried out by Sotoft et al. (2010), refined rapeseed oil cost was estimated at 0.61 euro/kg while the enzyme cost was estimated at 762.7 euro/kg. Serrano-Arnaldos et al. (2019) studied the economic aspects of long-chain fatty acids enzymatic esterification in which commercial lipase costs were estimated at 1300 euros/kg for Novozym 435 and 70 euros/kg for Lipozyme TL IM, while industrial-grade fatty acids costs were estimated below 10 euros/kg.

Fjerbaek et al. (2009) calculated the productivities from different studies of the literature. They compared the results with the productivities attained using alkaline catalyst (NaOH concentration of 1 wt.% based on the weight of oil), which presents a yield of 100 kg biodiesel per kg of catalyst. Productivity 74 times higher can be achieved using Novozym 435, considering lipase reuse (100 times) and using a by-product acid from refining vegetable oils as raw material. The study obtained an estimated cost of 0.14 dollars/kg ester in the enzymatic process against 0.006 dollars/kg ester for NaOH. If the cost of lipase was reduced to 44 dollars/kg, or if the enzyme could be reused for at least six years, the use of the biocatalyst could become economically viable. According to Nielsen et al. (2008), the maximum cost of the biocatalyst should be the same as a chemical catalyst (25 dollars/ton biodiesel). Thus, an enzyme cost of 12-185 dollars/kg could be feasible, depending on the productivity. Sotoft et al. (2010) found that enzymatic biodiesel plants using tert-butanol as solvent was economically unfeasible due to the costs of separation and solvent recovery units. Al-Zuhair et al. (2011) simulated an enzymatic biodiesel plant with a production capacity of 1 ton/h, using waste oil (0.02 dollars/Kg) as raw material, Novozym 435 as catalyst, and tert-butanol as solvent. The economic study indicated a payback period of four years, with a selling price of biodiesel of 0.86

dollars/kg. The economic feasibility of an enzymatic biodiesel produced from cooking oil (0.25 euro/Kg), using supercritical carbon dioxide as solvent and lipase Lipozyme TL I.M. (estimated cost of 800 euro/kg in this case), resulted in a biodiesel cost of 1.64 euro/L, which is not economically viable (Lisboa et al., 2014). Estimating enzyme reuse for 100 days, the biodiesel cost could be reduced to 0.75 euro/L.

One of the most common approaches for optimization studies in enzymatic syntheses of biodiesel is to determine the lowest enzyme loading. However, such reduced enzyme loadings increase the reaction time, causing potential negative impacts on lipase operational stability in stirred tank reactors. Another approach deals with the immobilization processes and the materials used, commonly polymers, to obtain more stable and active biocatalysts and, at the same time, reduce the costs with the materials used for immobilization. In this case, promising technologies currently study the use of residual materials of plant origin as immobilization support (Girelli et al., 2020). Solid enzymatic preparations, obtained from solid-state fermentation (SSF), in which lipases are spontaneously adsorbed onto the matrix used for SSF without the need for extraction and immobilization, are also studied (Aguieiras et al., 2017; Collaço et al., 2020). Another possibility is the study of highly active and stable lipases using engineered microorganisms. These developments deal almost exclusively with the technical aspects involved. Economic considerations are frequently overlooked or underestimated in this field despite the notable technological advances.

20.3.6 Perspectives for enzymatic biodiesel production

In summary, biodiesel has gradually become more relevant in the Brazilian energy matrix, following the same trend observed worldwide. Although biodiesel is already obtained from renewable sources, it is possible to obtain it in a more sustainable way than the current methods using biocatalysis. The advantages of biocatalysis include milder reaction conditions (energy savings in the process and lower emissions of greenhouse gases) and minimal production of harmful by-products (savings in wastewater treatment and reduced environmental risks). From a technological point of view, it is possible to produce biodiesel with high yields in different ways. However, the high biocatalysts costs still represent the most significant obstacle for biocatalysis to be considered in this context.

The versatility of lipases allows agro-industrial waste for biodiesel production, turning waste into valuable products. In association with other enzymatic technologies, lipases can be inserted in a biorefinery concept from oilseed crops, with biodiesel as one of their main targets, adding value to different residual biomasses generated in their processing. These products may be attractive for different productive chains, such as automotive, food, cosmetics, cleaning products. Strategies for obtaining more active and stable biocatalysts at lower costs have been studied. It is of utmost importance that the efforts of the research groups around the world be evaluated from an economic perspective, aiming to implement such technologies in a large-scale context.

20.4 Perspectives on Biomass Processing for Composites and Chemicals Production

As mentioned before, Brazil has favorable conditions to contribute to the local and world decarbonization of the economy, besides its enormous potential for the establishment of a bioeconomy. In addition, the fuel sector is changing, and the chemical industry is still in deficit (ABIQUIM, 2021). The use of biomass for chemicals and composites could be a great opportunity

Studies on the use of biomass to produce commodity chemicals, which were predominantly derived from fossil feedstocks such as crude oil and natural gas, received a lot of attention due to the global policy to reduce the dependence on fossil carbon sources and green-house gas emissions. Several chemicals can be produced via biochemical routes, which comprise enzymatic or microbial conversions. Interestingly, biochemical routes can be explored for both bio-based or fossil-based products. A very important example of enzyme-catalyzed commodity production is the hydration of acrylonitrile into acrylamide (Ashina and Suto, 1993; Straathof, 2013). In this case, the substrate is not a renewable material, which demonstrates the versatility of enzymes. However, the focus here is not only on biochemical routes but also on bio-based products, in other words, the use of renewable substrates, specifically lignocellulosic biomass or oleaginous materials, for biorefinery integration considering the biofuels chain in Brazil. Therefore, the main available substrates include the carbohydrates: sucrose, cellulose, hemicellulose, and their C6 and C5 monosaccharides; the lipid fractions: triglyceride and

derived glycerol; as well as all by-products and residues generated during the biofuel product processes.

In a biomass-based chemical industry, each available biomass substrate can be explored directly or as a source of platform molecules, and a great number of derived products are possible, simultaneously offering a great opportunity and an enormous challenge. Thomas et al. (2020) summarized the direct applications of nanocellulose (nano fibrillated and nanocrystals), which gained considerable attention as a nano-reinforcement for polymer matrices in various industries (medical and healthcare, packaging, paper and board, composites, printed and flexible electronics, textiles, filtration, rheology modifiers, 3D printing, aerogels and coating films) (Thomas et al., 2020, NanoCrystalline Cellulose, 2021). Few market players were positioned to produce cellulose nanocellulose at commercial or pre-commercial scale: CelluForce (Canada), Kruger Inc. (Canada), Fiberlean technologies (UK), American Process (USA), Forest Products Laboratory (FPL) (USA), Paper logic, Borregaard (Norway), Innventia (Sweden), Nippon Paper Industries (Japan), Oji Paper Industries (both Japan), Holmen Paper (Sweden), CTP/FCBA (France), and others (Blanco et al., 2018, Ho and Leo, 2021). As an example, CelluForce has a commercial plant capable to produce 300 tons annually of CelluForce NCC[®], a multi-functional material described to improve the performance of several materials, such as oil and gas, adhesives, paper, cement, plastics, composites, paints, coatings, personal care, health care, food and beverages and electronics (NanoCrystalline Cellulose, 2021).

Cellulose and hemicelluloses can also be modified with different functional groups to enhance their reactivity and functionality, and to be used for medicine, food, packing, and many other industries. Recently, Qaseem et al. (2021) reviewed the products manufactured in the industry by direct modification of hemicellulose by copolymerization, amidation, esterification, oxidation, among other reactions, and their application in the food, packing, healthcare, pharmaceutical, and textile industries. As a common example, modified xylans mixed with other compounds can be used as emulsifiers, wet-end additives, hydrogels, and dispersants packaging films (Alekhina et al., 2014, Xu et al., 2011, Qaseem et al., 2021).

Cellulose and hemicelluloses can initially be hydrolyzed to C6 and C5-sugars, which are versatile building blocks in the carbohydrate-based chemical industry. These sugars can be converted by chemical or enzymatic reactions. However, the most direct and economic way of converting carbohydrates into commodity chemicals is the

fermentation process (Paula et al., 2019, Straathof and Bampouli, 2017). Recent publications reviewed the pathways of producing several chemicals from cellulose (Sheldon, 2018, Artz and Palkovits, 2018) and hemicellulose (Qaseem et al., 2021) derived sugars. For example, hydrolysis of hemicellulose could produce many intermediate products, such as C6 and C5-sugars, which can be modified into many high-value polymers such as 5-hydroxymethylfurfural (HMF), xylitol, furfuryl, succinic acid, ethanol, butanediol, butanol, polyhydroxyalkanoates (PHA), and polylactates (PLA), among others (Qaseem et al., 2021). Interestingly, Straathof and Bampouli (2017) have made a ranking of 58 commodity chemicals based on the economic potential of bio-based production compared to petrochemical production. These authors used a simple model, with ethanol as a base case and consider only a few variables: feedstock prices, number of conversion steps, maximum yields per conversion step, and typical feedstock contribution to product price. The petrochemical industry is based on C2 to C4 chemicals (ethylene, propylene, butenes, syngas/methanol) and C6 to C8 aromatic compounds (benzene, toluene, xylene) as building blocks to a variety of products. These authors concluded that the production from carbohydrates is not competitive for platform chemicals such as ethylene, propylene, and benzene-toluene-xylene (BTX), as these chemicals can be produced more cheaply from petrochemical resources. Carbohydrates contain a lot of oxygen which is useless for the production of these base chemicals. On the other hand, the production from carbohydrates can be competitive when production from petrochemicals requires more steps and more oxidation. Among the best-ranked candidates for carbohydrate-based production are adipic acid, acrylic acid, 1,4-butanediol, and methyl methacrylate. These chemicals are relatively oxidized and require several petrochemical conversion steps starting from the base chemicals, thus can be produced competitively from carbohydrates if theoretical yields are approached and if processing is efficient.

In a recent review, Rosales-Calderon and Arantes (2019) emphasized the importance of developing a biorefinery, which produces, for example, ethanol and high-value chemicals from lignocellulose as a promising strategy to promote both carbohydrate-based biofuels and carbohydrate-based chemicals industries. These authors reviewed chemicals and materials with a Technology Readiness Level (TRL) of at least 8, which have reached a commercial scale and could be shortly or immediately integrated into a cellulosic ethanol process. According to Straathof (2013), there are at least 22 types of industrial or pilot-scale processes of biobased chemicals production by enzyme or cell

catalysis, including the synthesis of different classes of compounds: hydrocarbons, alcohols, carbohydrates, carboxylic acids, esters, amines, and amino acids. Tables 20.5 and 20.6 show some examples of platform molecules, products, applications, and stages of development.

New concepts around bio-based chemicals are emerging. Shanks and Keeling (2017) bring out a new concept of evolution of platform chemicals to bioprivileged molecules, which are biobased chemical intermediates that can be efficiently converted to a diversity of chemicals including drop-in replacements for petrochemical, as stated above, as well as novel molecules. Novel chemicals molecules from petrochemical building blocks have received little attention due to a constrained set of alkene and aromatic molecules leading to a limited number of possible transformations. So, it would be strategic to study novel chemical compounds derived from biological molecules, due to the diversity of biomolecule structures and to expand the universe of possible molecules beyond the scope of petrochemicals. The authors mention muconic acid, 5-hydroxymethylfurfural, and triacetic acid lactone as examples of bioprivileged molecules.

Table 20.5. Examples of products from C6-sugars, their main applications and stage of development (Ansoerge-Schumacher and Thum, 2013; Bozell and Petersen, 2010; Straathof, 2014; Straathof, 2017; Taylor et al., 2015; Rosales-Calderon and Arantes, 2019; MARKETSSANDMARKETS™, 2020).

Product	Application	Development Stage
1,2-Propanediol	Heat-transfer fluid, Cosmetics	Industrial
1,3-Propanediol	Polymers and cosmetic Industries	Industrial
1,4-Butanediol	Synthetic rubber, polymers, solvents and chemicals	Pilot
1,2-Butanediol	Precursor for polyester polyol or plasticizer; Used to produce adhesive resins or as solvent, coolant, refrigerant, hydraulic fluid, or fine chemical raw material	Industrial
1,4-Diaminobutane	Production of Nylon 4,6	Research
1,5-Diaminopentane	Production of Polyamides	Pilot
1-Butanol	Drop-in fuel	Industrial
1-Butyrolactone	Solvent	Research
1-Hexanol	Fragrances, Plasticizers	Research
1-propanol	Synthesis of n-propyl acetate	Research
2-Aminoethanol	Anticorrosive, detergent, gas sweetening	Research
2-Butanol	Precursor of amines and esters	Research
2,3-Butanediol	Used to manufacture printing inks, perfumes, fumigants, moistening and softening agents, explosives, plasticizers, foods, and pharmaceuticals	Industrial
3-Hydroxybutyric Acid	Monomer of Polyhydroxybutyrate	Research
3-Hydr	Precursor of Acrylic Acid	Pilot
6-Aminohexanoic Acid	Silicones	Research
Acetaldehyde	Chemical intermediate for various compounds	Industrial

Acetic Acid	Precursor for Vinyl Acetate, cellulose-based polymers, Acetic anhydride, Acetate salts. Used for foam rubber, cable insulation, wood gluing, emulsifiers, cement coatings, and desalination membranes	Industrial
Acetic anhydride	Esterification agent used in the preparation of modified food starch and acetylation of monoglycerides	Industrial
Acetone	Production of acrylic plastics, signs, lighting fixtures and displays, and Bisphenol A (BPA), and as a solvent in multiple products, such as paints, cleaning fluids, and adhesives	Industrial
Adipic acid	Production of Nylon 6,6	Research
Ascorbic Acid	Production of Vitamin C	Industrial
Butanol	Used in the manufacture of adhesives, sealant chemicals, paint additives, coating additives, plasticizer, and cleaning products	Industrial
Butanone	Used in paint and glues	Research
Butyric Acid	Cellulose acetate butyrate plastics	Pilot
Citric Acid	Food/beverage industry	Research
D-Gluconic Acid	Solvent for multivalent cations	Industrial
D-Mannitol	Sweetener	Research
Epoxyethane	Production of Ethylene Glycol	Research
Erythritol	Sweetener	Industrial
Ethanol	Fuel, Solvent, Beverages	Industrial
Ethyl acetate	Used in the production of inks, adhesives, car care chemicals, plastics, and as synthetic fruit essence, flavor, and perfume in the food industry	Industrial
Ethylene glycol	Manufacture of antifreeze, hydraulic brake fluids, industrial humectants, printer's inks, and in the synthesis of safety explosives, plasticizers, synthetic fibers	Industrial
Farnesene	Solvents, Surfactants, Resins, Adhesives	Industrial
Formaldehyde	Resins	Research
Formic Acid	Silaging	Research
Glycolic Acid	Cosmetics	Research
Glutamic acid	Use as thickener, humectant, cryoprotectant, drug carrier, biodegradable fibers, highly water absorbable hydrogels, biopolymer flocculants, and animal feed additives	Industrial
Hexanoic Acid	Fine Chemical	Research
Isobutanol	Mobile phase in thin-layer chromatography	Industrial
Isobutyraldehyde	Chemical intermediate for various compounds	Research
Isoprene	Synthetic rubber and Thermoplastic elastomer	Pilot
Isopropanol	Solvent and cleaning fluid	Research
Itaconic Acid	Synthesis of resins and chemicals	Industrial
Lactic Acid	Cosmetics, Leather industry	Industrial
L-Aspartic Acid/L-Arginine	Chemical commodity	Research
L-Glutamic Acid	Nylon 6; Use as thickener, humectant, cryoprotectant, drug carrier, biodegradable fibers, highly water absorbable hydrogels, biopolymer flocculants, and animal feed additives	Industrial
L-Lysine	Food industry	Industrial
L-Threonine	Chemical commodity	Industrial
L-Valine	Chemical commodity	Research
Malic Acid	Acidulant	Research
Methanol	Antifreeze agent, Solvent	Pilot
Methyl Chloride	Synthesis of polymers	Research
Phenol	Polycarbonates and resins	Industrial

Propanal	Chemical intermediate for various compounds	Research
Propionic Acid	Food preservation	Pilot
Pyruvic Acid	Fine Chemical	Research
Sorbitol	Used as sweetener, thickener, humectant, excipient, dispersant in food, cosmetic, and toothpaste, and vitamin C synthesis	Industrial
Styrene	Synthesis of polymers	Research
Succinic Acid	Building block for polymers; personal care products and food additives to large-volume applications such as biopolymers, plasticizers, polyurethanes, resins, and coatings	Industrial

Table 20.6. Examples of products from C5-sugars, fatty acids and fatty alcohols and glycerol, their main applications and stage of development (Ansorge-Schumacher and Thum, 2013; Bozell and Petersen, 2010; Straathof, 2014; IEA, 2020; METEX, 2020).

Platform Molecule	Products	Application	Development Stage
C5	Ethene	Polyethylene, Ethylene Oxide, Vinyl Chloride	Research
	Isobutene	Synthetic Resins, Adhesive Resins, Vitamins	Research
	Ethylene Glycol	Antifreeze agent, Production of Polyester	Research
	Xylitol	Sweetener	Industrial
	Acetic Acid	Vinyl Acetate, Acetic anhydride, Acetate salts	Research
	Furfural	Used in the recovery of lubricants from cracked crude, in the production of specialist adhesives, and as a flavor compound	Industrial
	Glycolic Acid	Cosmetics	Research
	2-aminoethanol	Anticorrosive, detergent, gas sweetening	Research
	1,2 propanediol	Heat-transfer fluid, Cosmetics	Research
Fatty Acids	Terminal Alkenes	Surface-active agents	Research
	FAME	Biodiesel	Industrial
	1-Hexanol	Fragrances	Research
	Glycerol	Biodiesel	Industrial
Fatty Alcohols	Butadiene	Synthetic rubbers and plastics	Research
Glycerol	1-propanol	Synthesis of n-propyl acetate	Research
	1,3-propanediol	Precursor for Polymers	Industrial
	3-hydroxypropionic acid	Precursor of Acrylic Acid	Pilot
	Butyric acid	Animal feed	Industrial
	Epichlorohydrin	Intermediate of epoxy resins and other derivatives	Industrial
	Propylene glycol	Heat-transfer fluid, Cosmetics	Industrial

Differently from the biomass' carbohydrate fraction, lipid fractions can be converted to a variety of relevant compounds with reduced steps of processing, mainly if the biocatalytic route is adopted. The most common uses of lipid fraction are food and

biofuels (biodiesel). Besides the direct application of triglycerides of edible oils in the food industry, triglycerides properties can be enhanced, via interesterification or partial hydrolysis, and designed for high-value applications, such as human milk fat and cocoa butter equivalents (Guerrand, 2017; Coelho et al., 2020). Non-edible oils, on the other hand, can be extensively explored for chemicals production. The hydrolysis of triglycerides generates free fatty acids, that can be esterified with different alcohols, sugars, amines, amides, and amino acids, to obtain an assort of important surfactants and emollients for cosmetics, pharmaceuticals, cleaning products, lubricants, plasticizers, and food additives (Basri et al., 2013; Abdelmoez and Mustafa, 2014, Sarmah et al., 2017). Moreover, to avoid competition between the destination of edible oils for food and chemicals, residual streams of edible oil refining may be used as a source of free fatty acids, that can be converted directly to biofuels, biolubricants, surfactants, and emollients. These approaches have been successfully explored by many different researchers in recent years, including the use of biocatalytic processes (Chaiyaso et al., 2006; Chong et al., 2007; Top, 2010; Zhang et al., 2016; Kapor et al., 2017; Fernandes et al., 2018; Musa et al., 2019, Marín-Suarez et al., 2019; Collaço et al., 2021).

Biocatalyzed processes for oleochemicals production have received increasing attention as cleaner alternatives to produce esters for different applications (Ansorge-Schumacher and Thum, 2013; Bozell and Peterson, 2010; Straathof, 2013; Khan and Rathod et al., 2015; Sarmah et al., 2017). Due to the specificity showed by lipases, a special class of hydrolytic enzymes, reactions between triglycerides or fatty acids with alcohols (or other acyl acceptors) can be carried out without forming undesirable by-products. This feature results in improved quality of products avoiding laborious purification processes, besides mild reaction conditions compared to conventional catalysis (Ansorge-Schumacher and Thum, 2013; Khan and Rathod et al., 2015; Sarmah et al., 2017). Important advances have been observed using lipases for obtaining flavors and aromas esters, emollients, biosurfactants, biofuels, and biolubricants derived from different biomass' lipid fractions, although the high cost of enzymes is still a drawback for the wide adoption of biocatalysis in this field.

Biomass lipid fraction is extensively adopted for biodiesel production. The most common biodiesel production process is transesterification – a reaction between triglycerides and methanol/ethanol – whose by-product is glycerol. Thus, glycerol is a raw material available in large quantities. Glycerol can be considered as a mini-sugar and consequently used in different fermentative processes. Currently, research is concentrated

on 1,3-propanediol (1,3-PDO) production (Bozell and Petersen, 2010; Straathof, 2013; Chen et al., 2018), however, other several products can be produced from glycerol processing, as by catalysis. Bio-based epichlorohydrin (EPI) is a competitive drop-in for oil-based EPI, obtained from glycerol in a process called epicerol (IEA, 2020); propylene glycol can be produced from glycerol hydrogenolysis, offering a reduction in greenhouse gas emissions compared to the oil-based process (Kaur et al., 2020).

Concerning the 1,3-PDO Industry, there is a trend to replace the chemical processes, traditionally performed by Shell and DuPont, for biotechnological ones. Initially, the bio-based 1,3-PDO producers used to apply GMO capable of convert glucose into glycerol, and then metabolize glycerol to 1,3-PDO through the fermentation process (Silva et al., 2014). Recently, METEX - NOOVISTA announced a new plant located in France to produce 1,3-PDO and butyric acid using glycerin from rapeseed oil as raw material, in a GMO-free process (Metex, 2020).

20.5 Biogas/Biomethane Production

Anaerobic digestion (AD) has been considered a viable technology for the treatment of organic waste materials and methane production. This process generates agricultural and environmental benefits, such as renewable energy vector production, organic waste treatment, greenhouse gas emission reduction, pathogen reduction through sanitation, and improved fertilization efficiency (Kougias and Angelidaki, 2018; Mucha et al., 2019; Atelge et al., 2020). For these reasons, the anaerobic digestion of organic waste has received great attention worldwide in recent years. The AD process promotes the degradation of organic material into biogas by microorganisms, in the absence of oxygen, implying significant advantages, such as low power demand, inexpensive nutrient requirement, moderate and stable sludge production, and high efficiency of both organic matter removal and biogas generation (Rajagopal et al., 2013; Sawatdeenarunat et al., 2019; Zamri et al., 2021). Several organic materials have been used as feedstock for AD, for instance, lignocellulosic biomass (Ferraro et al., 2020; Weide et al., 2020; Ghimire et al., 2021), municipal solid waste (Chynoweth and Pullammanappallil, 2020; Basinas et al., 2021), animal manure (Weide et al., 2020; Khan and Ahring, 2021), and food processing waste (Andriamanohiarisoamanana et al., 2020; Alrefai et al., 2020), among others. These feedstocks are usually available at small-scale biogas plants, which

avoid additional transportation costs and thereby render biogas production economically feasible (Naik et al., 2014; Yang et al., 2014).

The conversion of organic materials into biogas is generally performed by a consortium of microorganisms through a series of metabolic phases, namely hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis, and methanogenesis, in that order (Figure 20.5). The hydrolysis phase is usually the rate-determining step of the whole AD process. During this phase, undissolved complex organic materials, e.g., polysaccharides, proteins, and fats are broken down into simpler organic materials such as sugars, amino acids, and fatty acids. The hydrolytic bacteria involved are usually of the genera *Bacteriodes*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Propioni-bacterium*, etc. (Deublein and Steinhauser, 2008; Goswami, 2016), which secrete exoenzymes.

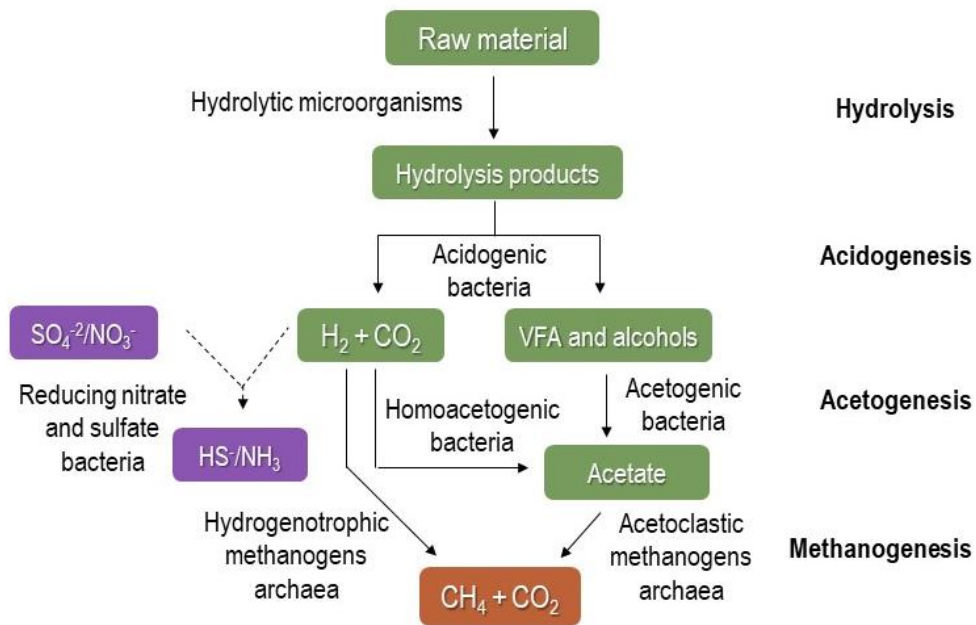


Figure 20.5. Anaerobic digestion steps: hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis, and methanogenesis. VFA: volatile fatty acid. (De Sá; Cammarota; Ferreira-Leitão, 2014).

Depending on the composition and structure of the organic matter, the hydrolysis stage may last from few hours to several days. Hence, many studies have been developed to perform the hydrolysis separately from the other phases of the AD, which allows independent control of the hydrolysis, reduce the time of the process and increase the availability of the substrates, thereby improving the overall AD process (Menzel et al.,

2020). This separation is especially necessary when lignocellulosic biomasses are the main carbon source. Different biomass pretreatment methods including physical (ball milling, wet disc, extrusion, microwave irradiation, steam-explosion, and liquid hot water), chemical (alkali and acidic), and biological (fungi, bacteria, and enzyme) pretreatments have been reported (Amin et al., 2017; Rajin, 2018; Yu et al., 2019; Ferdes et al., 2020; Atelge et al., 2020), which may be applied to enhance the 1st phase of the AD prior to the subsequent phases.

In the second phase of AD (acidogenesis), acidogenic bacteria (e.g. *Clostridium*, *Paenibacillus*, and *Ruminococcus*) use the simple compounds (monomers of sugars, amino acids, fatty acids) generated from the hydrolysis phase as substrates to produce volatile fatty acids (VFA) (e.g., acetate, propionate, and butyrate), alcohols, H_2 , and CO_2 . In the third phase (acetogenesis), homoacetogenic bacteria (*Clostridium*) convert H_2 and CO_2 into acetate, while acetogenic bacteria (*Moorella*, *Clostridium*, *Alkaliphillus*, *Caldanaerobacter*, *Thermoanaerobacter*) oxidize VFA and alcohols into acetate. Finally, in the methanogenic phase, methanogenic archaea (acetoclastic and hydrogenotrophic methanogens) convert H_2 , CO_2 , and acetate into CH_4 and CO_2 . The acetoclastic methanogens (*Methanosaeta*, *Methanosarcina*) produce methane through acetate decarboxylation, while the hydrogenotrophic methanogens (*Methanothermobacter*, *Methanoculleus*, *Methanosarcina*, *Methanococcus*, *Methanocaldococcus*) produce methane through H_2/CO_2 reduction. If nitrate and sulfate are present in the medium, some species of nitrate and sulfate-reducing bacteria use H_2 as the electron donor for ammonia and sulfide production, respectively (Chernicharo, 2007; Schnürer and Jarvis, 2018; Soares et al., 2019).

Besides biogas production, the digestate resulting from AD can be applied as biofertilizer in agriculture. However, the quality of the digestate is essential for its acceptance as a replacement for mineral fertilizers in crop production. On a general note, the digestate is rich in several nutrients, principally, nitrogen, phosphorous, and potassium, but low in carbon (Mucha et al., 2019; Logan and Visvanathan, 2019; Guilayn et al., 2020). The digestate quality varies with different factors, such as the characteristics of the feedstock material, microbial community, AD operational conditions, and the digestate processing techniques (Mucha et al., 2019; Logan and Visvanathan, 2019; Guilayn et al., 2020). Parameters that allow high-quality digestate are appropriate pH, nutrient and chemical content, and the absence of inorganic impurities and pathological contamination (Mucha et al., 2019).

Different methods such as pre-digestion, in-vessel cleaning, and post-digestion can be applied to improve the digestate quality without any negative effect on methane yield (Mucha et al., 2019; Logan and Visvanathan, 2019). The pre-digestion involves various chemical, mechanical, thermal, and enzymatic feedstock pretreatment techniques, while in-vessel cleaning systems are used to remove contaminants from the digester. The post-digestion involves a partial solid-liquid separation of digestate with volume reduction, or a complete separation of digestate into solid fibers, fertilizer concentrate, and pure water (Mucha et al., 2019; Logan and Visvanathan, 2019). AD digestate could also find further applications in algae cultivation, biopesticides, biosurfactants, biofuels, and biochar production (Mucha et al., 2019; Logan and Visvanathan, 2019; Baştabak and Koçar, 2020; Guilayn et al., 2020).

Several factors can affect the productivity and stability of the anaerobic fermentative system for biogas production, such as temperature, pH, carbon-to-nitrogen mass ratio (C:N ratio), redox potential, organic loading rate (OLR), and retention time. Temperature is one of the main factors affecting AD, as it directly influences the CH₄ yield. The growth rate of microorganisms is significantly affected by pH. For example, the growth rate of methanogenic archaea is greatly reduced at pH lower than 6.0 and higher than 8.0 (Mao et al., 2015). The C:N ratio affects the performance of the AD, as the anaerobic bacteria require a balanced nutritional medium for their growth and maintenance of a stable environment. According to the literature, a C:N range of 20–35 was considered to be the optimum condition for AD (Zahan et al., 2018; Kainthola et al., 2020; Ma et al., 2020; Nugraha et al., 2020; Dima et al., 2020).

The redox potential can be used as an indicator of the AD, as the growth of methanogenic archaea requires a low redox potential. This redox potential has been reported to range from –200 to –400 mV (Naik et al., 2014). The stability of the AD is dependent on the OLR and hydraulic retention time (HRT). When the OLR is high, the fermentative system may become unbalanced due to excessive production of volatile acids, leading to inhibition of the process. The same behavior is observed at short HRT. Thus, a low OLR and a long HRT provide the best strategy for achieving constant and maximal methane yields (Naik et al., 2014; Mao et al., 2015).

20.5.1 Enzymes applied to improve anaerobic digestion

As discussed earlier, hydrolysis, which is the first phase of AD limits the overall rate of the AD process. Enzymatic pretreatment is a biological pretreatment method used to improve methane production by speeding up the hydrolysis phase of AD by hydrolytic enzymes such as protease, lipase, α -glucosidase, α -amylase, cellulase, hemicellulases, xylanases, dextranases, and others (Sethupathy et al., 2020).

Hydrolytic enzymes are used to improve the reduction of the particle size of substrates and/or to reduce the crystallinity degree of the biomass. They can be added simultaneously to the substrate and inoculum in the biodigester (one-stage) or initially used to hydrolyze the substrate and then fed into the reactor (two-stage) (Navarro et al., 2020; Xu et al., 2021).

Thus, the choice of enzymes and the AD operating conditions are dependent on the type and composition of the feedstock material. For lignocellulosic feedstocks, hydrolysis has been performed using fungal hydrolytic enzyme mixtures (containing, cellulase, hemicellulase, xylanase, pectinase, and so on) for a more efficient one-stage or two-stage anaerobic digestion system. For example, Weide et al. (2020) studied the effects of different enzyme mixtures (Cellulase, xylanase, beta-glucanase, endo-pectinase) from *Trichoderma citrinoviride* Bisset on the biomethane yields in a single-stage anaerobic digestion of agricultural wastes (silage, straw, and animal manure), and observed an accelerated biomass degradation leading to an increase in methane yield. Specifically, for chicken manure, hay, and triticale straw, the increase in methane yield was between 8.1% and 21.2% (Weide et al., 2020). However, for the other feedstocks tested, such as grass and maize silage, maize straw, horse and cattle manure, and a mixture of cattle manure and maize silage, the increase in methane yield was only between 0.3% and 6.4% (Weide et al., 2020).

Garcia et al. (2019) evaluated the enzymatic pretreatment of lignocellulosic biomass 24 h before reactor feeding (two-stage condition). They observed an improvement in the degradation performances of the feedstocks, such as sorghum straw and corn cob flour, and an enhancement of over 30% of biogas production (Garcia et al., 2019). Generally, feedstocks with greater degradability can be carried out in one-stage AD without impairing the efficiency of the process, while for recalcitrant feedstocks, the most efficient condition is two-stage (Garcia et al., 2019; Garritano et al., 2017).

Enzymes such as lipases have also been applied in the anaerobic digestion of food waste, sewage sludge, and different animal wastewaters (from dairy and meat processing), which contain large amounts of fats (Meng et al., 2017; Pascale et al., 2019; dos Santos Ferreira et al., 2020; Cheng et al., 2020). These enzymes break down fat to free fatty acids for better AD performance.

A hydrolytic pool of enzymes can improve the overall AD process but commercial enzymes represent a significant cost to industrial processes. Enzyme extraction from natural sources such as activated sludge serves as an alternative and is cost-effective (Liu and Smith, 2020). Furthermore, purification, concentration, and stabilization/immobilization techniques can also greatly expand the industrial application and increase the economic value of enzymes, developing a potential commercial-scale recovery of hydrolytic enzyme products from waste biomass sources.

20.5.2 Generation and Use of Biogas/Biomethane in Brazil

Biogas produced from the AD process has been presented as an efficient alternative in the production of bioenergy. Biogas production in the IEA Bioenergy Task 37 member countries is clearly dominated by Germany, with more than 10,000 biogas plants (IEA, 2020). None of the other member countries (Austria, Brazil, Denmark, Finland, France, Norway, Ireland, Korea, Sweden, Switzerland, Netherlands, and the United Kingdom) have more than 1000 biogas plants apiece. The annual biogas production is approximately 120 TWh in Germany, 25 TWh in the United Kingdom, 5 TWh in Brazil, 4 TWh in both the Netherlands and France, and less than 3 TWh in the remaining countries (IEA, 2020). In countries such as the United Kingdom, Brazil, and South Korea, biogas produced in landfills is the largest source, while landfill gas is only a minor contributor in countries such as Germany, Switzerland, and Denmark. The biogas produced is mainly used for the generation of heat and electricity in most countries, except for Sweden, where approximately half of the produced biogas is used as vehicle fuel (IEA, 2020). Many countries, such as Denmark, Germany, and South Korea, among others, have shown initiatives and interest in increasing the share of biogas to be used as vehicle fuel in the near future (IEA, 2020).

In Brazil, the potential for biogas production from sugar-energy, animal protein, agricultural production, and sanitation are 57.6 million, 35.3 million, 18.1 million, and

6.1 million Nm³/day respectively (ABiogás, 2021). The current biogas production is about 3,500 Nm³/day from about 550 biogas plants distributed across the country (ABiogás, 2021).

In addition, the energy use of biogas for electrical systems in Brazil remains insufficient. In the first quarter of 2019, the total number of biomass-fueled thermoelectric plants was 559, out of which only 37 were driven by biogas (approximately 145.6 MW of installed capacity), which represents approximately 0.8% of the electricity production by biomass (ANEEL, 2019). Interestingly, only in 2020, 58 new thermoelectric plants driven by biogas (approximately 49 MW of installed capacity) started operation (ABiogás, 2020), making a total of 95 thermoelectric plants driven by biogas, with approximately 195 MW of installed capacity.

The purification of biogas, through the removal of CO₂, H₂O, H₂S, NH₃, and other impurities, makes it possible to obtain biomethane, which can be used as a substitute for natural gas and as a transportation fuel (Awe et al., 2017; Iglesias et al., 2021). This approach allows efficient integration of biogas into the energy sector, and it is also observed that the industries are strongly interested in this product, not only in Brazil but in Africa, Europe, and throughout the Americas (Bley Jr., 2015). Applications of gaseous fuels developed from shale gas in the United States have been tendered competitively around the world.

In Brazil, impacts are already observed on the use of engines relying on 100% natural gas (perfectly replaceable by biomethane), including heavy loads, trucks, and buses. Shale gas has accelerated the arrival of the “Age of gas” in the world energy matrix, and in Brazil (Bley Jr., 2015). Currently, the use of biogas as a vehicle fuel is rare. However, the viability of using biomethane as a vehicle fuel has been demonstrated in a project developed by ITAIPU Binacional, the Itaipu Technology Park Foundation, Scania, Haacke Farm, and the International Center on Renewable EnergyBiogas/CIBiogás-ER (IEA, 2015). At the moment, there are three compressed biomethane filling stations in Brazil servicing about 110 biomethane-utilizing vehicles (IEA, 2020).

The expansion of the biogas sector in Brazil over the years has been supported by various initiatives, policies, legislations, and research. For example, the 2015 legislation (Resolution No. 8, Jan 30, 2015) developed by the government’s National Agency of Petroleum, Natural Gas and Biofuels (ANP) paved way for the development of biomethane market in Brazil. The legislation was applied to biomethane produced from

biodegradable materials originating from agroforestry and organic waste, intended for nationwide use as a fuel for vehicles, in commercial shipping, and for residential use. The standard includes obligations regarding quality control to be met by the various economic agents who trade biomethane throughout Brazil (IEA, 2015, 2020). Furthermore, through another legislation (Resolution No. 685, June 29, 2017) by ANP, the rules for approving the quality and specifications of biomethane from landfills, sewage treatment plants, for mobility, residential, industrial, and commercial uses were established. In addition, National Biofuel Policy (RenovaBio) recently established by Law No. 13,576/2017 seeks to expand the production, use, and commercialization of biofuels including biomethane, ensuring their competitive participation in the fuel market (IEA, 2020; ANP, 2020).

20.5.3 Hydrogen production

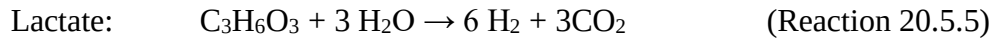
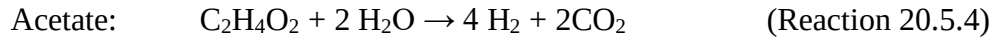
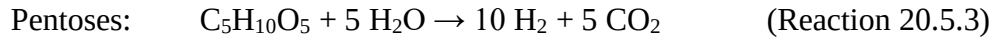
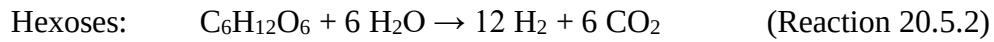
The role of hydrogen (H₂) will be essential to the global decarbonization of energy matrixes worldwide. It is a low carbon energy vector and its combustion only generates water as a by-product. The remarkable challenge is the transition from fossil to renewable sources in the hydrogen production chain. According to the 6th IPCC report (2021), by 2050 renewable energy must account for 70-85% of electricity to limit global warming to 1.5°C. Therefore, investments in low carbon technologies need to be a priority, otherwise, Earth will experience a critical scenario of extreme heat, rising sea levels, species extinction, among others. Currently, H₂ is produced mostly from fossil sources, through thermochemical processes. Therefore, the development of sustainable processes for H₂ production, such as biological processes, is of great relevance.

Fermentative microorganisms have been widely explored to produce H₂ along with the feasibility of treating organic waste. Hydrogen is one of the most efficient and cleanest fuels to be inserted in the energy matrix due to its high calorific value of 141.9 MJ/kg (higher than all the biofuels), and the generation of water as the only by-product of its combustion (Reaction 20.5.1) (Hans and Kumar, 2018; Yang and Wang, 2018).



Photo-fermentation and dark fermentation are the main processes to obtain hydrogen through the biological route. Photo-fermentation is conducted by purple non-

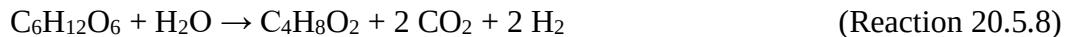
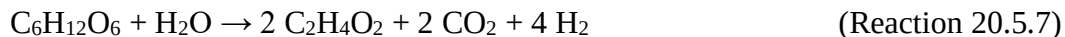
sulfur (PNS) bacteria through organic matter degradation (simple sugars, short organic acids, aromatic compounds, and alcohols) in the presence of light energy (Akhlaghi and Najafpour-Darzi, 2020). PNS bacteria such as *Rhodobacter sphaeroides*, *R. capsulatus*, *R. sulfidophilus*, *Rhodopseudomonas palustris*, and *Rhodospirillum rubrum* have versatile metabolism dependent on the light intensity, carbon source, and degree of anaerobiosis (Argun and Kargi, 2011). It is important to highlight that simple sugars (hexoses and pentoses) (Reaction 20.5.2 and 20.5.3) are less efficient substrates than organic acids such as acetate, lactate, and butyrate (reactions 20.5.4, 20.5.5, and 20.5.6) for H₂ production by PNS bacteria (Akhlaghi and Najafpour-Darzi, 2020).



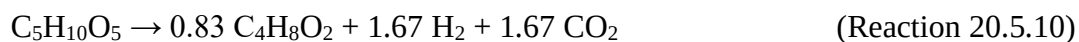
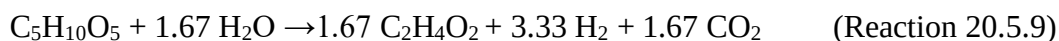
Biological H₂ production through dark fermentation (DF) allows the use of a variety of organic materials such as lignocellulosic wastes (De Sá et al., 2020; Rena et al., 2020; Wang and Yin, 2018), agroindustrial effluents (Faber and Ferreira-Leitão, 2016; Garritano et al., 2017; Rego et al., 2020), food wastes (Hassan; Hemdan; El-Gohary, 2020), among others as feedstocks. The use of fermentative microorganisms in the conversion of carbohydrates, lipids, and proteins from biomass into H₂ provides the return of these carbon sources to the productive cycle of biofuel production. In addition, biohydrogen can be produced under room temperature and pressure, resulting in a low energy demand process (Niz et al., 2019; Yang and Wang, 2018).

Dark fermentative microorganisms, such as *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp., and *Clostridium* sp., allow a continuous production, fermenting a wide range and more complex substrates without inhibition in absence of light (Ding; Yang; He, 2016; Elbeshbishy et al., 2017; Yang and Wang, 2018). *Clostridium* is a Gram-positive bacteria and this genus is the most commonly used microorganism for H₂ production using pure culture. It can metabolize both hexoses (reactions 20.5.7 and 20.5.8) and pentoses (reactions 20.5.9 and 20.5.10), generating acetic and butyric acids, and H₂ as products.

Hexoses:



Pentoses:



However, a microbial consortium is most often used as inoculum for dark fermentation than a pure culture of H_2 -producer (Moraes et al., 2019). Mixed culture can be stemming from a natural source, such as sewage sludge, animals manure, which may not require substrate or equipment sterilization, resulting in an effortless, simple, and cheaper process. Additionally, their microbial diversity can make the system resistant to operational changes (Hilgsmann et al., 2011; Wang et al., 2018).

20.5.4 Sequential production of hydrogen and methane

As a result of dark fermentation of organic feedstock applying mixed culture of microorganisms as an inoculum, H_2 and CO_2 are the major compounds in the gas phase, while the liquid phase contains acids (mainly acetic and butyric acids), alcohols, and other molecules derived from the metabolism of the raw material. These organic compounds generated in DF can be used as a substrate for CH_4 production by methanogenic archaea. The overall process for obtaining H_2 and CH_4 sequentially consists of separate anaerobic digestion into two steps: the acidogenic step leads to H_2 production using a pretreated inoculum, and the methanogenic step culminates in CH_4 production applying the raw mixed culture as an inoculum (Rajendran et al., 2020).

This two-step production is required to avoid the use of H_2 as a substrate by the hydrogenotrophic methanogenic archaea in the CH_4 production step (Figure 20.5).

Besides, sequential production has the advantage of promoting a stable anaerobic digestion process due to the use of two different optimal pH values, allowing the regulation of organic overloads in the methanogenic step and the increase of overall yield. Two-stage AD has a faster degradation of substrates since arises in acetogenic step, resulting in a higher productivity compared to one-stage AD. Another advantage is related to energy recovery. Given the fact that only 10-20% of the total COD (chemical oxygen demand) in the medium is used for H₂ production, the sequential step promotes the digestion of the most complex compounds for methane production, representing 80-90% of the COD (Fu et al., 2017; Parthiba et al., 2018; Rajendran et al., 2020).

The setup of two-stage reactor was initially designed for the high-solid substrates such as agroindustrial residues, but it has been used in wastewater treatment systems showing good performance. There is great potential in the treatment of residual biomass by two-stage AD, and a crucial factor for the success of this process is influent feed solid concentrations and evaluation of the characteristics of the substrate. As mentioned, the degradation of the more complex compounds occurs in the fermentative stage (hydrolysis-acidogenesis). Hence, AD in combined reactors provides a retention time of 10 to 18 days (one-stage anaerobic digestion is approximately 30 days) and it brings the advantage of reducing the reactor volume by 25 - 45%. In addition to less digester volume, the process enables odor control, greater degradation of VFAs, and provides buffering capacity for the system, which may increase the availability of nutrients for microorganisms (Rajendran et al., 2020). The technical-economics aspects of sequential H₂ and CH₄ production still need to be analyzed in order to understand the market accessibility, success, and profitability.

20.6 CONCLUDING REMARKS

A sustainable means of industrial production is an unavoidable choice. A biorefinery can integrate, in the same industrial unit, processes for the production of biofuels, chemicals, electricity, and heat and is thus considered the most promising approach to the creation of new industries based on renewable raw materials. Although in the current biorefinery context, industrial investments are largely directed towards the production of low-added-value biofuels, such as biodiesel and ethanol, the production of high-added-value

products, such as green chemicals and polymeric resins, from residues and by-products derived from biomass processing may improve the material value two- or fourfold. Consequently, six to eight times more jobs could be created as well, and the amount of residues could be highly reduced. Economic and regional aspects influence the establishment of a renewable industry for fuel and chemical production and also control the speed of its implementation. However, it is important to maintain investments in this strategic field to take advantage of the opportunities, which include, with a high degree of protagonism, enzymatic and microbial processes to support a sustainable industry. The aspects mentioned throughout the chapter are of great importance for a sustainable future. It has become much more important now considering the latest IPCC report and the need for economies to recover in the post-covid era, which highlights the importance of local development and the utilization of regional resources.

References

- Aarthy, M., Saravanan, P., Gowthaman, M.K., Rose, C., Kamini, N.R., 2014. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: an overview. *Chem Eng Res Des* 92, 1591–601.
- Abbott, A.P., Cullis, P.M., Gilbson, M.J., Harris, R.C., Rave, E., 2007. Extraction of glycerol from biodiesel into a eutectic based ionic liquid. *Green Chem.* 9, 868–872.
- Abdelmoez, W., Mustafa, A., 2014. Olechemical industry future through biotechnology. *J. Oleo Sci.* 63, 545–554.
- ABiogás—Associação Brasileira do Biogás, 2020. Novo projetos de 2020 confirmam expansão do setor. Retrospectiva 2020, edição especial. Available from: <<https://abiogas.org.br/abiogasnews-especial-dezembro2020-janeiro2021>>
- ABiogás—Associação Brasileira do Biogás, 2021. Biogás no Brasil: conhecendo o mercado no país. Available from <https://abiogas.org.br/wp-content/uploads/2021/01/Infograficos-Abiogas_D_2021-1.pdf>
- Abrahamsson, J., Andreasson, E., Hansson, N., Sandström, D., Wennberg, E., Maréchal, M., 2015. A Raman spectroscopic approach to investigate the production of biodiesel from soybean oil using 1-alkyl-3-methylimidazolium ionic liquids with intermediate chain length. *Appl. Energy*. 154, 763–770.
- Agueiras, E.C.G., Cavalcanti-Oliveira, E.D., de Castro, A.M., Langone, M.A.P., Freire, D.M.G., 2014a. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. *Fuel*. 135, 315–321.
- Agueiras, E.C.G., de Barros, D.S.N., Sousa, H., Fernandez-Lafuente, R., Freire, D.M.G., 2017. Influence of the raw material on the final properties of biodiesel produced using lipase from *Rhizomucor miehei* grown on babassu cake as biocatalyst of esterification reactions. *Renew. Energy*. 113, 112–118.
- Agueiras, E.C.G., Souza, S.L., Langone, M.A.P., 2013. Study of immobilized lipase lipozyme rm in esterification reactions for biodiesel synthesis. *Quim. Nova*. 36, 646–650.
- Akhlaghi, N., Najafpour-Darzi, G. A comprehensive review on biological hydrogen production., 2020. *Int. J. Hydrog. Energy*, 45, 22492–22512.
- Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R., Staehelin, A., 2011. The structural polysaccharides of the cell wall and how they are studied. In: Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R., Staehelin, A. (Eds.), *Plant Cell Walls*. Garland Science, New York, NY, pp. 43–66.
- Alberts, G., Ayuso, M., Bauen, A., Boshell, F., Chudziak, C., Gebauer, J.P., German, L., Kaltschmitt, M., Nattrass, L., Ripken, R., 2016. Innovation Outlook, Advanced Liquid Biofuels. International Renewable Energy Agency (IRENA): Abu Dhabi, UAE, 2016; Available from https://www.irena.org//media/Files/IRENA/Agency/Publication/2016/IRENA_Innovation_Outlook_Advanced_Liquid_Biofuels_2016.

Alekina, M., Mikkonen, K.S., Alén, R., Tenkanen, M., Sixta, H., 2014. Carboxymethylation of alkali extracted xylan for preparation of bio-based packaging films. *Carbohydr. Polym.* 100, 89-96.

ABIQUIM – Química: Promovendo Avanços e Protegendo Vidas, 2021. Available from <https://abiquim.org.br/industriaQuimica>.

Almeida, F.L.C., Travália, B.M., Gonçalves, I.S., Forte, M.B.S., 2021. Biodiesel production by lipase-catalyzed reactions: bibliometric analysis and study of trends. *Biofuels, Bioprod. Biorefining*.

Alrefai, R., Alrefai, A. M., Benyounis, K. Y., Stokes, J., 2020. An Evaluation of the Effects of the Potato Starch on the Biogas Produced from the Anaerobic Digestion of Potato Wastes. *Energies*, 13, 2399.

Al-Zuhair, S., 2008. The effect of crystallinity of cellulose on the rate of reducing sugars production by heterogeneous enzymatic hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 99, 4078–4085.

Al-Zuhair, S., Almenhali, A., Hamad, I., Alshehhi, M., Alsuwaidi, N., Mohamed, S., 2011. Enzymatic production of biodiesel from used/waste vegetable oils: Design of a pilot plant. *Renew. Energy*. 36, 2605-2614.

Amin, F. R., Khalid, H., Zhang, H., u Rahman, S., Zhang, R., Liu, G., & Chen, C., 2017. Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. *Amb. Express*. 7, 1-12.

Andersen, R.A., 2013. The Microalgal Cell. In: *Handbook of Microalgal Culture*. John Wiley & Sons, Oxford, UK, pp. 1–20.

Andrade, T. A., Martin, M., Errico, M., Christensen, K. V., 2019. Biodiesel production catalyzed by liquid and immobilized enzymes: Optimization and economic analysis. *Chem. Eng. Res. Des.* 141, 1–14.

Andriamanohiarisoamanana, F. J., Yasui, S., Yamashiro, T., Ramanoelina, V., Ihara, I., Umetsu, K., 2020. Anaerobic co-digestion: a sustainable approach to food processing organic waste management. *J. Mater. Cycles Waste Manag.* 22, 1501-1508.

ANEEL—Agência Nacional de Energia Elétrica, 2019. Boletim de Informações Gerenciais. Available from <https://www.aneel.gov.br/informacoes-gerenciais>. (accessed 05.21)

ANFAVEA – Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotoree, 2020. Estatísticas. Available from <https://www.anfavea.com.br/estatisticas-copiar-3>.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, 2020. RenovaBio. Available from <<https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/producao-e-fornecimento/biocombustiveis/renovabio>>. (accessed 14.03.2021).

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, 2020. Anuário estatístico de petróleo, gás natural e biocombustíveis. Available from <http://www.anp.gov.br/publicacoes/anuario-estatistico/5809-anuario-estatistico-2020>. (accessed 3.18.21).

Arai, S., Nakashima, K., Tanino, T., Ogino, C., Kondo, A., Fukuda, H., 2010. Production of biodiesel fuel from soybean oil catalyzed by fungus whole-cell biocatalysts in ionic liquids. *Enzyme Microb. Technol.*, 46, 51-55.

Artz, J., Palkovits., 2018. Chemical Building Blocks from Carbohydrates. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, 14, 14-18.

Ansorge-Schumacher, M.B., Thum, O., 2013. Immobilised lipases in the cosmetics industry. *Chem. Soc. Ver.* 42, 6475–6490.

Aransiola, E.F., Betiku, E., Ikhuomregbe, D., Ojumu, T.V., 2012. Production of biodiesel from crude neem oil feedstock and its emissions from internal combustion engines. *African J. Biotechnol.* 11 - 6178-6186.

Araújo, D.J.C., Machado, A.V., Vilarinho, M.C.L.G., 2019. Availability and Suitability of Agroindustrial Residues as Feedstock for Cellulose-Based Materials: Brazil Case Study. *Waste Biomass Valorization.* 10, 2863–2878.

Argun, H., Kargi, F., 2011. Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview. *International Journal of Hydrogen Energy.* 36, 7443–7459.

Arumugam, A., Thulasidharan, D., Jegadeesan, G.B., 2018. Process optimization of biodiesel production from *Hevea brasiliensis* oil using lipase immobilized on spherical silica aerogel. *Renew. Energy.* 116, 755–761.

Asada, C., Doi, K., Sasaki, C., Nakamura, Y., 2012. Efficient Extraction of Starch from Microalgae Using Ultrasonic Homogenizer and Its Conversion into Ethanol by Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Nat. Resour.* 03, 175–179.

Ashina, Y., Suto, M., 1993. Development of an enzymatic process for manufacturing acrylamide and recent progress. In: Tanaka, A., Tosa, T., Kobayashi, T. (Eds.), *Industrial Application of Immobilized Biocatalysts*. Marcel Dekker, New York, NY, pp. 91–107.

Atelge, M.R., Atabani, A.E., Banu, J.R., Krisa, D., Kaya, M., Eskicioglu, C., Duman, F.A.T.İ.H., 2020. A critical review of pretreatment technologies to enhance anaerobic digestion and energy recovery. *Fuel.* 270, 117494.

Awe, O.W., Zhao, Y., Nzihou, A., Minh, D. P., Lyczko, N., 2017. A review of biogas utilization, purification and upgrading technologies. *Waste Biomass Valorization.* 8 - 267-283.

Balat, M., 2011. Potential alternatives to edible oils for biodiesel production - A review of current work. *Energ. Convers Manag.* 52, 1479–1492.

Ball, S., Colleoni, C., Cenci, U., Raj, J.N., Tirtiaux, C., 2011. The evolution of glycogen and starch metabolism in eukaryotes gives molecular clues to understand the establishment of plastid endosymbiosis. *J. Exp. Bot.* 62, 1775–1801.

Barros, M., Fleuri, L.F., MacEdo, G.A., 2010. Seed lipases: Sources, applications and properties - A review. *Brazilian J. Chem. Eng.* 27, 15–29.

Barros, S., 2020. Biofuels Annual. USDA – United States Department of Agriculture – Foreign Agricultural Service. Available from <<https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Biofuels%20Annual%20Sao%20Paulo%20ATO%20Brazil%2008-03-2020>>.

Basinas, P., Rusín, J., Chamrádová, K., 2021. Assessment of high-solid mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of mechanically-separated municipal solid waste. *Environ. Res.* 192, 110202.

- Basri, M., Rahman, R.N.Z., Salleh, A.B., 2013. Specialty oleochemicals from palm oil via enzymatic syntheses. *J. Oil Palm Res.* 25, 22-35.
- Baştabak, B., Koçar, G., 2020. A review of the biogas digestate in agricultural framework. *J. Mater. Cycles Waste Manag.* 22 - 1318-1327.
- Becker, E. W., 2007. Micro algae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.* 25, 207–210.
- Bicudo, C.E. de M., Menezes, M., 2010. Introdução: as algas do Brasil. In: Forzza, R.C. (Ed.), *Catálogo de Plantas e Fungos Do Brasil - Vol. 1.* I Andraea Jakobsson Estúdio Editorial, Instituto de Pesquisa Jardim Botânico, Rio de Janeiro, pp. 49–60.
- Bini, A., 2020. Produção de etanol de milho se firma no país e deve dobrar este ano. Available from .
- Binod, P., Janu, K.U., Sindu, R., Pandey, A., 2011. Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. *Biofuels*, pp. 229-250.
- Blanco, A., Monte, M.C., Campano, C., Balea, A., Merayo, N., Negro, C., 2018. Nanocellulose for Industrial Use: Cellulose Nanofibers (CNF), Cellulose Nanocrystals (CNC), and Bacterial Cellulose (BC). *Nanocellulose for Industrial Use. Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications*, 74–126.
- Bley Jr., C., 2015. *Biogás: A Energia Invisível*, second ed. University of São Paulo, São Paulo.
- Bomgardner, 2019. POET-DSM to pause cellulosic ethanol production. <https://cen.acs.org/business/biobased-chemicals/POET-DSM-pause-cellulosic-ethanol/97/i46>
- Bozell, J.J., Peterson, G.R., 2010. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates – the US Department of Energy’s “Top 10” revisited. *Green Chem.* 12, 539–554.
- Brányiková, I., Maršáľková, B., Doucha, J., Brányik, T., Bišová, K., Zachleder, V., Vítová, M., 2011. Microalgae-novel highly efficient starch producers. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 766–776.
- Brasil, 2020 9 (a). Ministério de Minas e Energia. Balanço Energético Nacional. Available from https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-479/topico-528/BEN2020_sp.pdf
- Brasil, 2020 (b). Ministério de Minas e Energia. *Resenha Energética Brasileira. Oferta e Demanda de Energia. Instalações Energéticas. Energia no Mundo.* Available from <http://antigo.mme.gov.br/documents/36208/948169/Resenha+Energ%C3%A9tica+Brasileira+-+edi%C3%A7%C3%A3o+2020/ab9143cc-b702-3700-d83a-65e76dc87a9e>
- Bressani, A.P.P., Garcia, K.C.A., Hirata, D.B., Mendes, A.A., 2015. Production of alkyl esters from macaw palm oil by a sequential hydrolysis/esterification process using heterogeneous biocatalysts: Optimization by response surface methodology. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38, 287–297.
- Brindhadevi, K., Mathimani, T., Rene, E.R., Shanmugam, S., Chi, N.T.L., Pugazhendhi, A., 2021. Impact of cultivation conditions on the biomass and lipid in microalgae with an emphasis on biodiesel. *Fuel* 284, 119058.

- Budžaki, S., Miljić, G., Tišma, M., Sundaram, S., Hessel, V., 2017. Is there a future for enzymatic biodiesel industrial production in microreactors? *Appl. Energy* 201, 124–134.
- Bujan, J.A.C., 2020. SUGARCANE RENEWABLE ENERGY (SUCRE) Terminal Evaluation Report. Available from <https://erc.undp.org/evaluation/documents/download/18506>.
- Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., Ball, S., 1998. Starch granules: structure and biosynthesis. *Biol. Macromol.* 23, 85–112.
- Cao, Y., Tan, H., 2005. Study on crystal structures of enzyme-hydrolyzed cellulosic materials by X-ray diffraction. *Enzyme Microb. Technol.* 36, 314–317.
- Cannella, D., Jorgensen, H., 2014. Do new cellulolytic enzyme preparation affect the industrial strategies for high solids lignocellulosic ethanol production. *Biotechnol. Bioeng.* 111, 59–68.
- Carpio, L.G.T., de Souza, F.S., 2017. Optimal allocation of sugarcane bagasse for producing bioelectricity and second generation ethanol in Brazil: Scenarios of cost reductions. *Renew. Energy* 111, 771–780.
- Carvalho, J.L.N., Nogueirol, R.C., Menandro, L.M.S., Bordonal, R.O., Borges, C.D., Canterella, H., Franco, H.C.J., 2017. Agronomic and environmental implications of sugarcane straw removal: a major review. *GCB Bioenergy*. 9, 1181–1195.
- Chaiyaso, T., H-Kittikun, A., Zimmermann, 2066. Biocatalytic acylation of carbohydrates with fatty acids from palm fatty acid distillates. *J. Ind. Microbio. Biotechnol.* 33, 338–342.
- Chandel, A.K., Albarelli, J.Q., Santos, D.T., Chundawat, S.P., Puri, M. and Meireles, M.A.A., 2019. Comparative analysis of key technologies for cellulosic ethanol production from Brazilian sugarcane bagasse at a commercial scale. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 13, 994–1014.
- Cheah, W.Y., Show, P.L., Chang, J.-S., Ling, T.C., Juan, J.C., 2014. Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae. *Bioresour. Technol.* 184, 190–201.
- Chen, P., Min, M., Chen, Y., Wang, L., Li, Y., Chen, Q., Wang, C., Wan, Y., Wang, X., Cheng, Y., Deng, S., Hennessy, K., Lin, X., Liu, Y., Wang, Y., Martinez, B., Ruan, R., 2009. Review of the biological and engineering aspects of algae to fuels approach. *Int. J. Agric. Biol. Eng.* 2, 1–30.
- Cheng, D., Liu, Y., Ngo, H. H., Guo, W., Chang, S. W., Nguyen, D. D., Liu, Y, 2020. A review on application of enzymatic bioprocesses in animal wastewater and manure treatment. *Bioresour. Technol.* 313, 123683.
- Cheng, Y.S., Zheng, Y., Labavitch, J.M., VanderGheynst, J.S., 2013. Virus infection of *Chlorella variabilis* and enzymatic saccharification of algal biomass for bioethanol production. *Bioresour. Technol.* 137, 326–331.
- Chernicharo, C.A.D.L., 2007. Reatores Anaeróbios. In: *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias*, vol 5. Universidade Federal do Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte, pp. 239–239.
- Chesterfield, D.M., Rogers, P.L., Al-Zaini, E.O., Adesina, A.A., 2012. Production of biodiesel via ethanolysis of waste cooking oil using immobilised lipase. *Chem. Eng. J.* 207, 701–710.
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25, 294–306.

- Chng, L.M., Lee, K.T., Chan, D.J.C., 2017. Synergistic effect of pretreatment and fermentation process on carbohydrate-rich *Scenedesmus dimorphus* for bioethanol production. *Energy Convers. Manag.* 141, 410-419.
- Choi, S.P., Nguyen, M.T., Sim, S. J., 2010. Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. *Bioresour. Technol.* 101, 5330–5336.
- Chong, F.C., Tey, B.T., Dom, Z.M., Cheong, K.H., Satiawihardja, B., Ibrahim, M.N., Rahman, R.A., Biak, D.R.A., Ling, T.C., 2007. Rice Bran Lipase catalyzed esterification of palm oil fatty acid distillate and glycerol in organic solvent. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 12, 250-256.
- Chongkhong, S., Tongurai, C., Chetpattananondh, P., 2009. Continuous esterification for biodiesel production from palm fatty acid distillate using economical process. *Renew. Energy* 34, 1059–1063.
- Christensen, J., Olhoff, A., 2019. Lessons from a decade of emissions gap assessments. United Nations Environment Programme, Nairobi. Available from: <https://www.unenvironment.org/resources/emissions-gap-report-10-year-summary>, 2019.
- Chynoweth, D. P., Pullammanappallil, P., 2020. Anaerobic digestion of municipal solid wastes. *Microbiology of solid waste*, 71-113.
- Coelho, A.L.S., Orlandelli, R.C., 2020. Immobilized microbial lipases in the food industry: a systematic literature review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 61, 1689-1703.
- Collaço, A.C.A., Aguiéiras, E.C.G., Santos, J.G., de Oliveira, R.A., de Castro, R.P.V, Freire, D.M.G., 2020. Experimental study and preliminary economic evaluation of enzymatic biodiesel production by an integrated process using co-products from palm (*Elaeis guineensis* Jaquim) industry. *Ind. Crops Prod.* 157, 112904.
- Collaço, A.C.C., Aguiéiras, E.C.G., Cavalcanti, E.L.D.C., Freire, D.M.G., 2021. Development of an integrated process involving palm industry co-products for monoglyceride/diglyceride emulsifier synthesis: Use of palm cake and for lipase production an palm fatty-acid distillate as raw material. *LWT* 135, 110039.
- CONAB – Campanha Nacional de Abastecimento - Acompanhamento da Safra Brasileira Cana-de-açúcar. V.7 - SAFRA 2020/21 N.3 - Terceiro levantamento - 2020. Available from <https://www.conab.gov.br/component/k2/item/download/34870_e1c52a336b53ca05c29824831da3c9e9>.
- da Rós, P.C.M., Silva, W.C., Grabauskas, D., Perez, V.H., de Castro, H.F., 2014. Biodiesel from babassu oil: Characterization of the product obtained by enzymatic route accelerated by microwave irradiation. *Ind. Crops Prod.* 52, 313–320.
- da Silva, A. S., Espinheira, R. P., Teixeira, R. S. S., de Souza, M. F., Ferreira-Leitão, V., Bon, E. P. S., 2020. Constraints and advances in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: a critical review. *Biotechnol. Biofuels.* 58.
- Dawood, F., Anda, M., Shafiullah, G.M., 2020. Hydrogen production for energy: An overview. *Int. J. Hydrog. Energy* 45, 3847-3869.
- Deublein, D., Steinhauser, A., 2008. *Biogas from Waste and Renewable Resources*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

- de Diego, T., Manjon, A., Lozano, P., Vaultier, M., Iborra, J.L., 2011. An efficient activity ionic liquid-enzyme system for biodiesel production. *Green Chem.* 13, 444e451.
- de Farias S.C.E., Meneghello, D., Bertucco, A., 2018. A systematic study regarding hydrolysis and ethanol fermentation from microalgal biomass. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 14, 172–182.
- de Sá, L.R.V., Cammarota, M.C., Ferreira-Leitão, V.S., 2014. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia – aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. *Quim Nova.* 37,857–867.
- de Sá, L.R.V., Faber, M.O., da Silva, A.S., Cammarota, M.C., Ferreira-Leitão, V.S., 2020. Biohydrogen production using xylose or xylooligosaccharides derived from sugarcane bagasse obtained by hydrothermal and acid pretreatments. *Renew. Energy* 146, 2408–2415.
- de Sousa, J.S., Cavalcanti-Oliveira, E.d'A., Aranda, D.A.G., Freire, D.M.G., 2010. Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 65, 133–137.
- Demirbas, A., 2007. Importance of biodiesel as transportation fuel. *Energy Policy* 35, 4661–70.
- Demuez, M., Mahdy, A., Tomás-Pejó, E., González-Fernández, C., Ballesteros, M., 2015. Enzymatic cell disruption of microalgae biomass in biorefinery processes. *Biotechnol. Bioeng.* 112, 1955–1966.
- Dias, M.O., Junqueira, T.L., Cavalett, O., Cunha, M.P., Jesus, C.D., Rossell, C.E., Maciel, F. R., Bonomi, A., 2012. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. *Bioresour. Technol.* 103, 152-161.
- Dima, A. D., Pârvulescu, O. C., Mateescu, C., Dobre, T., 2020. Optimization of substrate composition in anaerobic co-digestion of agricultural waste using central composite design. *Biomass Bioenergy* 138, 105602.
- Ding, C., Yang, K.L., He, J., 2016. Biological and fermentative production of hydrogen. In: *Handbook of Biofuels Production: Processes and Technologies: Second Edition*, Chapter 11, pp. 303–333.
- Dixit, P., Basu, B., Puri, M., Tuli, D.K., Mathur, A.S., Barrow, C.J., 2019. A screening approach for assessing lytic polysaccharide monooxygenase activity in fungal strains. *Biotechnol. Biofuels.* 12, 1–16.
- Djahedi, C., Berglund, L.A., Wohler, J., 2015. Molecular deformation mechanisms in cellulose allomorphs and the role of hydrogen bonds. *Carbohydr. Polym.* 130, 175–182.
- Dos Santos Ferreira, J., de Oliveira, D., Maldonado, R. R., Kamimura, E. S., Furigo, A., 2020. Enzymatic pretreatment and anaerobic co-digestion as a new technology to high-methane production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 4235-4246.
- Duarte, S.H., del Peso Hernandez, G.L., Canet, A., Benaiges, M.D., Maugeri, F., Valero, F., 2015. Enzymatic biodiesel synthesis from yeast oil using immobilized recombinant *Rhizopus oryzae* lipase. *Bioresour. Technol.* 183, 175–180.
- Dufrense, A., 2012. Nanocellulose - Potential reinforcement in composites. In: John, M.J., Sabu, T. (Eds.), *Natural Polymers*, Vol. 2: Natural Polymer Nanocomposites. RSC Publishing, London, pp. 1–33.

- Dulie, N.W., Woldeyes, B., Demsash, H.D., Jabasingh, A.S., 2021. An Insight into the Valorization of Hemicellulose Fraction of Biomass into Furfural: Catalytic Conversion and Product Separation. *Waste Biomass Valorization*. 12, 531–552.
- Elbeshbishy, E., Dhar, B.R., Nakhla, G., Hyung-Sool, L., 2017. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 79, 656–668.
- Faber, M.O., Ferreira-Leitão, V.S., 2016. Optimization of biohydrogen yield produced by bacterial consortia using residual glycerin from biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 2019, 365–370.
- Falkowski, P.G., Raven, J.A., 2007. *Aquatic photosynthesis*, 2nd ed. Princeton University Press, New Jearsey.
- Feiten, M.C., Dalla Rosa, C., Treichel, H., Furigo, A., Zenevich, M.C., de Oliveira, D., Vladimir Oliveira, J., 2014. Batch and fed-batch enzymatic hydrolysis of soybean oil under ultrasound irradiation. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 3, 83–85.
- Fengel, D., Wegener, G., 1984. *Wood. Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Walter de Gruyter, Berlin.
- Ferdeş, M., Dincă, M.N., Moiceanu, G., Zăbavă, B. Ş., Paraschiv, G., 2020. Microorganisms and Enzymes Used in the Biological Pretreatment of the Substrate to Enhance Biogas Production: A Review. *Sustainability* 12, 7205.
- Fernandes, K.V., Papadaki, A., da Silva, J.A.C., Fernandes-Lafuente, R., Koutinas, A.A., Freire, D.M.G., 2018. Enzymatic esterification of palm fatty-acid distillate for the production of polyol esters with biolubricant properties. *Ind. Crops. Prod.* 116, 90–96.
- Ferraro, A., Massini, G., Miritana, V. M., Rosa, S., Signorini, A., Fabbicino, M., 2020. A novel enrichment approach for anaerobic digestion of lignocellulosic biomass: Process performance enhancement through an inoculum habitat selection. *Bioresour. Technol.* 313, 123703.
- Fjerbaek, L., Christensen, K.V., Norddahl, B., 2009. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 1298–1315.
- Franco, H.C.J., Castro, S.G.Q., Sanches, G.M., Kolln, O.T., Bordonal, R.O., Borges, B.M.M.N., Borges, C.D., 2018. Alternatives to increase the sustainability of sugarcane production in Brazil under high intensive mechanization. In: Singh, P., Tiwari, A.K. (Eds.), *Sustainable Sugarcane Production*. Waretown. Apple Academic Press, NJ – USA, pp. 350–383.
- Fu, S.F., Xu, X.H., Dai, M., Yuan, X.Z., Guo, R.B., 2017. Hydrogen and methane production from vinasse using two-stage anaerobic digestion. *Process. Saf. Environ.* 107, 81–86.
- Garcia, N. H., Benedetti, M., Bolzonella, D., 2019. Effects of Enzymes Addition on Biogas Production From Anaerobic Digestion of Agricultural Biomasses. *Waste Biomass Valorization* 10, 3711–3722.
- García-Aparicio, M.P., Ballesteros, M., Manzanares, P., Ballesteros, I., González, A., José, N. M., 2007. Xylanase contribution to the efficiency of cellulose enzymatic hydrolysis of barley straw. *Appl Biochem. Biotechnol.* 137, 353–65.
- Garritano, A. N., de Sá, L. R. V., Agueiras, E. C. G., Freire, D. M. G., Ferreira-Leitão, V. S., 2017. Efficient biohydrogen production via dark fermentation from hydrolyzed palm oil mill effluent by non-commercial enzyme preparation. *Int. J. Hydrog. Energy.* 42, 29166–29174.

- Ge, S., Champagne, P., 2017. Cultivation of the Marine Macroalgae *Chaetomorpha linum* in Municipal Wastewater for Nutrient Recovery and Biomass Production. *Environ. Sci. Technol.* 51, 3558–3566.
- Gellerstedt, G., Henriksson, G., 2008. Lignins: major sources, structure and properties. In: Belgacem, M.N., Gandini, A. (Eds.), *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. Elsevier, Amsterdam, pp. 201–224.
- Gerken, H.G., Donohoe, B., Knoshaug, E.P., 2013. Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production. *Planta* 237, 239–253.
- Gharat N., Rathod V.K., 2013. Ultrasound assisted enzyme catalyzed transesterification of waste cooking oil with dimethyl carbonate. *Ultrason. Sonochem.* 20, 900–905.
- Ghimire, N., Bakke, R., Bergland, W.H., 2021. Mesophilic Anaerobic Digestion of Hydrothermally Pretreated Lignocellulosic Biomass (Norway Spruce (*Picea abies*)). *Processes* 9, 190.
- Girelli, A.M., Astolfi, M.L., Scuto, F.R., 2020. Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. *Chemosphere* 244, 125368.
- Gírio, F.M., Fonseca, C., Carneiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R., 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresour. Technol.* 101, 4775–4800.
- Gonzaga, L.C., Zotelli, L.C., de Castro, S.G.Q., de Oliveira, B.G., Bordonal, R.O., Cantarella, H., Carvalho, J.L.N., 2019. Implications of Sugarcane Straw Removal for Soil Greenhouse Gas Emissions in São Paulo State, Brazil. *Bioenerg. Res.* 12, 843–857.
- Goswami, R., Chattopadhyay, P., Shome, A., Banerjee, S.N., Chakraborty, A.K., Mathew, A.K., Chaudhury, S., 2016. An overview of physico-chemical mechanisms of biogas production by microbial communities: a step towards sustainable waste management. *3 Biotech*, 6, 72.
- GranBio, 2020. GranBio e NextChem assinam parceria para desenvolver mercado de etanol celulósico. Available from <<http://www.granbio.com.br/press-releases/granbio-e-nextchem-assinam-parceria-para-desenvolver-mercado-de-etanol-celulosico/>>
- Grabber, J.H., 2005. How Do Lignin Composition, Structure, and Cross-Linking Affect Degradability? A Review of Cell Wall Model Studies. *Crop Sci.* 45, 820–831.
- Greco-Duarte, J., Cavalcanti-Oliveira, E.D., da Silva, J.A.C., Fernandez-Lafuente, R., Freire, D.M.G., 2017. Two-step enzymatic production of environmentally friendly biolubricants using castor oil: Enzyme selection and product characterization. *Fuel* 202, 196–205.
- Gu, J., Xin, Z., Meng, X., Sun, S., Qiao, Q., Deng, H., 2015. Studies on biodiesel production from DDGS-extracted corn oil at the catalysis of Novozym 435/superabsorbent polymer. *Fuel* 146, 33e40.
- Guerrand, D., 2017. Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries. *Lipids of the Future* 24, D403.
- Guilayn, F., Rouez, M., Crest, M., Patureau, D., Jimenez, J., 2020. Valorization of digestates from urban or centralized biogas plants: a critical review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 19, 419–462.

- Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M.H.M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K., Wijffels, R.H., 2015. Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnol. Adv.* 33, 243–260.
- Gupta, S., Mazumder, P.B., Scott, D., Ashokkumar, M., 2020. Ultrasound-assisted production of biodiesel using engineered methanol tolerant *Proteus vulgaris* lipase immobilized on functionalized polysulfone beads. *Ultrason. Sonochem.* 68, 105211.
- Hama, S., Tamalampudi, S., Yoshida, A., Tamadani, N., Kuratani, N., Noda, H., Fukuda, H., Kondo, A., 2011. Enzymatic packed-bed reactor integrated with glycerol-separating system for solvent-free production of biodiesel fuel. *Biochem. Eng. J.* 55, 66-71.
- Hama, S., Yamaji, H., Fukumizo, T., Numata, T., Tamalampudi, S., Kondo, A., Noda, H., Fukuda, H., 2007. Biodiesel fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochem. Eng. J.* 34, 273-8.
- Hans, M., Kumar, S., 2018. Biohythane production in two-stage anaerobic digestion system. *Int. J. Hydrog. Energy.* 44, 17363–17380.
- Harris, P.V., Welner, D., McFarland, K.C., Re, E., Poulsen, J.N., Brown, K., et al., 2010. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. *Biochem.* 49, 3305–3316.
- Harris, P.V., Xu, F., Kreel, N.E., Kang, C., Fukuyama, S., 2014. New enzyme insights drive advances in commercial ethanol production. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 19, 162–170.
- Hassan, G. K., Hemdan, B. A., El-Gohary, F. A., 2020. Utilization of food waste for bio - hydrogen and bio - methane production: influences of temperature, OLR, and in situ aeration. *J. Mater. Cycles. Waste.* 22, 1218-1226.
- Hayyan, A., Hashim, M.A., Hayyan, M., Mjalli, F.S., AlNashef, I.M., 2014. A new processing route for cleaner production of biodiesel fuel using a choline chloride based deep eutectic solvent. *J. Clean. Prod.* 65, 246–251.
- Hemsworth, G.R., Davies, G.J., Walton, P.H., 2013. Recent insights into copper-containing lytic polysaccharide mono-oxygenases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 23, 660–668.
- Hilgsmann, S., Masset, J., Hamilton, C., Beckers, L., Thonart, P., 2011. Comparative study of biological hydrogen production by pure strains and consortia of facultative and strict anaerobic bacteria. *Bioresour. Technol.* 102, 3810–3818.
- Ho, S.H., Li, P.J., Liu, C.C., Chang, J.S., 2013. Bioprocess development on microalgae-based CO₂ fixation and bioethanol production using *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresour. Technol.* 145, 142–149.
- Ho, N.A.D., Leo, C.P., 2021. A review on the emerging applications of cellulose, cellulose derivatives and nanocellulose in carbon capture. *Environ. Res.* 197, 111100.
- Holm-Nielsen, J.B., Seadi, T. A., Oleskowicz-Popielc, P., 2009. The future of anaerobic digestion and biogas utilization. *Bioresour. Technol.* 100, 5478-5484.
- Horn, S.J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Eijsink, V.G.H., 2012. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnol. Biofuels* 5, 45.

Höhne, N., Fransen, T., Hans, F., Bhardwaj, A., Blanco, G., Elzen, M., Hagemann, M., Henderson, C., Keesler, D., Kejun, J., Kuriyama, A., Sha, F., Song, R.; Tamura, K., Wills, W., 2019. Bridging the Gap: Enhancing Mitigation Ambition and Action at G20 Level and Globally. An Advance Chapter of The Emissions Gap Report 2019. United Nations Environment Programme. Nairobi.

Huang Z.L., Yang T.X., Huang, J.Z., Yang, Z., 2014. Enzymatic production of biodiesel from *Milletia pinnata* seed oil in ionic liquids. *Bioenerg. Res.* 7, 1519-1528.

IEA – International Energy Agency - 2018 - World Energy Balances and Statistics, op. cit. note 31; IRENA, IEA and REN21, op. cit. note 1, p. 39; IRENA, “Running on renewables: Transforming transportation through renewable technologies”, 14 January 2018, <https://irena.org/newsroom/articles/2018/Jan/Running-on-renewables-transforming->

IEA. Bio-Based Chemicals: a 2020 Update. [s.l.] IEA Bioenergy, 2020.

IEA—International Energy Agency, 2015. IEA Bioenergy Task 37—Country Reports Summary 2014, first electronic edition produced in 2015. Available from <https://www.ieabioenergy.com/>

IEA—International Energy Agency, 2020. IEA Bioenergy Task 37—Country Reports Summary 2019, IEA Bioenergy. Available from <http://task37.ieabioenergy.com/>

Iglesias, R., Muñoz, R., Polanco, M., Díaz, I., Susmozas, A., Moreno, A. D., Guirado, M., Carreras, N., Ballesteros, M., 2021. Biogas from Anaerobic Digestion as an Energy Vector: Current Upgrading Development. *Energies* 14, 2742.

Imberty, A., Buléon, A., Tran, V., Péerez, S., 1991. Recent Advances in Knowledge of Starch Structure. *Starch/Stärke* 43, 375–384.

IPCC, I. P. OF C. C. Report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems. Report, 2021.

Isikgor, F. H., Becer, C. R., 2015. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polym. Chem.* 6, 4497–4559.

Jaeger, K., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T., 1999. Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 315–351.

Jaeger, K., Reetz, M.T., 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *TIBTECH* 16, 396–403.

Ji, J., Wang, J., Li, Y., Yu, Y., Xu, Z., 2006. Preparation of biodiesel with the help of ultrasonic and hydrodynamic cavitation. *Ultrasonics* 44 - e411–e414.

Jim, L., 2016. Strategic intent: the digest’s 2016 multi-slide guide to Raizen, reliance industries. Available from <http://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2016/10/10/strategic-intent-the-digests-2016-multi-slide-guide-to-raizen-reliance-industries/9/>.

Juturu, V., Wu, J.C., 2013. Insight into microbial hemicellulases other than xylanases: a review: Microbial hemicellulases other than xylanases. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 88, 353–363.

- Juturu, V., Wu, J.C., 2014. Microbial Exo-xylanases: A Mini Review. *Appl Biochem Biotechnol* 174, 81–92.
- Kainthola, J., Kalamdhad, A.S., Goud, V.V., 2020. Optimization of process parameters for accelerated methane yield from anaerobic co-digestion of rice straw and food waste. *Renew. Energy* 149, 1352-1359.
- Kapoor, M., Gupta, M.N., 2012. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochem.* 47, 555–569.
- Kapor, N.Z.A., Maniam, G.P., Rahim, M.H.A., Yusoff, M.M., 2017. Palm fatty acid distillate as a potential source for biodiesel production-a review. *J. Clean. Prod.* 143, 1–9.
- Karp, S. G., Rozhkova, A. M., Semenova, M. V., Osipov, D. O., de Pauli, S. T. Z., Sinitsyna, O. A., Zorov, I. N., Vanderberghe, L. P. S., Soccol, C. R., Sinitsyn, A. P., 2021. Designing enzyme cocktails from *Penicillium* and *Aspergillus* species for the enhanced saccharification of agro-industrial wastes. *Bioresour. Technol.* 330, 124888.
- Karp, S.G., Medina, J.D.C., Letti, L.A.J., Woiciechowski, A.L., de Carvalho J., Schmitt, C.C., Penha, R.O., Kumlehn, G.S., Soccol, C.R., 2021. Bioeconomy and biofuels: the case of sugarcane ethanol in Brazil. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 15, 889-912.
- Kashyap, S.S., Gogate, P.R., Joshi, S.M., 2019. Ultrasound assisted synthesis of biodiesel from karanja oil by interesterification: Intensification studies and optimization using RSM. *Ultrason. Sonochem.* 50, 36–45.
- Kaur, J., Sarma, A.K., Jha, M.K., Gera, P., 2020. Valorisation of crude glycerol to value-added products: Perspectives of process technology, economics and environmental issues. *Biotechnol. Repo.* 27, e00487
- Kennedy, H.T., 2019. GranBio to resume ethanol plant commercial operations. Available from <https://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2019/01/25/granbio-to-resume-ethanol-plant-commercial-operations/>.
- Khan, M.U., Ahring, B.K., 2021. Improving the biogas yield of manure: Effect of pretreatment on anaerobic digestion of the recalcitrant fraction of manure. *Bioresour. Technol.* 321, 124427.
- Khan, N.R., Rathod, V.K., 2015. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: a review. *Process Biochem.* 50, 1793-1806.
- Khoo, K.S., Chia, W.Y., Tang, D.Y.Y., Show, P.L., Chew, K.W., Chen, W.-H., 2020. Nanomaterials Utilization in Biomass for Biofuel and Bioenergy Production. *ENERGIES* 13.
- Kim, K.H., Choi, I.S., Kim, H.M., Wi, S.G., Bae, H.J., 2014. Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation. *Bioresour. Technol.* 153, 47–54.
- Kleiner, B., Fleischer, P., Schörken, U., 2016. Biocatalytic synthesis of biodiesel utilizing deep eutectic solvents: A two-step-one-pot approach with free lipases suitable for acidic and used oil processing. *Process Biochem.* 51, 1808–1816.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.P., Bohn, A., 2005. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 3358–3393.

- Kostylev, M., Wilson, D., 2012. Synergistic interactions in cellulose hydrolysis. *Biofuels* 3, 61–70.
- Kougiass, P.G., Angelidaki, I., 2018. Biogas and its opportunities—A review. *Front. Environ. Sci. Eng.* 12, 1-12.
- Kovalenko, G.A., Perminova, L. V, Beklemishev, A.B., Yakovleva, E.Y., Pykhtina, M.B., 2015. Heterogeneous Biocatalytic Processes of Vegetable Oil Interesterification to Biodiesel. *Catal. Ind.* 7, 73–81.
- Kruyeniski, J., Ferreira, P. J., Carvalho, M. G. V. S., Vallejos, M. E., Felissia, F. E., Area, M. C., 2019. Physical and chemical characteristics of pretreated slash pine sawdust influence its enzymatic hydrolysis. *Ind. Crops Prod.* 130, 528–536.
- Kumar, D., Das, T., Giri, B.S., Verma, B., 2018. Characterization and compositional analysis of highly acidic karanja oil and its potential feedstock for enzymatic synthesis of biodiesel. *New J. Chem.* 42, 15593–15602.
- Kumar, G., Kumar, D., Poonam, Johari, R., Singh, C.P., 2011. Enzymatic transesterification of *Jatropha curcas* oil assisted by ultrasonication. *Ultrason. Sonochem.*,18, 923-927.
- Kumar, L., Arantes, V., Chandra, R., Saddler, J., 2012. The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility. *Bioresour. Technol.* 8, 103-201.
- Lane, J., 2017. DowDuPont to exit cellulosic biofuels business. Available from <http://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2017/11/02/breaking-news-dowdupont-to-exit-cellulosic-ethanol-business..>
- Laurent, C. V. F. P., Breslmayr, E., Tunega, D., Ludwig, R., Oostenbrink, C., 2019. Interaction between Cellobiose Dehydrogenase and Lytic Polysaccharide Monooxygenase. *Biochemistry.* 58 1226–1235.
- Laurichesse, S., Avérous, L., 2014. Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers. *Prog. Polym. Sci.* 39, 1266–1290.
- Lee, J.H., Kim, S.B., Kang, S.W., Song, Y.S., Park, C., Han, S.O., 2011. Biodiesel production by a mixture of *Candida rugosa* and *Rhizopus oryzae* lipases using a supercritical carbon dioxide process. 2011. *Bioresour. Technol.* 102, 2105–2108.
- Lee, O.K., Oh, Y.K., Lee, E.Y., 2015. Bioethanol production from carbohydrate-enriched residual biomass obtained after lipid extraction of *Chlorella* sp. KR-1. *Bioresour. Technol.* 196, 22–27.
- Leu, S. Y., Zhu, J., 2013. Substrate-related factors affecting enzymatic saccharification of lignocelluloses: our recent understanding. *Bioenerg. Res.* 6, 405–415.
- Li, X., Xu, H., Wu, Q., 2007. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 98, 764–771.
- Li, Y., Du, W., Liu, D., 2013. Effect of phospholipids on free lipase-mediated methanolysis for biodiesel production. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 91, 67–71.
- Lin, C.Y., Lu, C., 2021. Development perspectives of promising lignocellulose feedstocks for production of advanced generation biofuels: a review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 136, 110445.

- Lisboa, P., Rodrigues, A.R., Martín, J.L., Simões, P., Barreiros, S., Paiva, A., 2014. Economic analysis of a plant for biodiesel production from waste cooking oil via enzymatic transesterification using supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluid.* 85, 31-40.
- Liu, Y., Chen, D., Yan, Y., y, C., Xu, L., 2011. Biodiesel synthesis and conformation of lipase from *Burkholderia cepacia* in room temperature ionic liquids and organic solvents. *Bioresour. Technol.* 102, 10414–10418.
- Liu, Z.; Smith, S. R., 2020. Enzyme Recovery from Biological Wastewater Treatment. *Waste Biomass Valorization*.
- Logan, M., & Visvanathan, C. Management strategies for anaerobic digestate of organic fraction of municipal solid waste: Current status and future prospects. *Waste Management & Research*, 37(1_suppl), 27-39.
- Lv, S., Yu, Q., Zhuang, X., Yuan, Z., Wang, W., Wang, Q., Qi, W., Tan, X., 2013. The influence of hemicellulose and lignin removal on the enzymatic digestibility from sugarcane bagasse. *Bioenerg. Res.* 6, 1128–1134.
- Ma, G., Dai, L., Liu, D., Du, W., 2019. Integrated Production of Biodiesel and Concentration of Polyunsaturated Fatty Acid in Glycerides Through Effective Enzymatic Catalysis. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7, 393.
- Ma, G., Ndegwa, P., Harrison, J. H., Chen, Y., 2020. Methane yields during anaerobic co-digestion of animal manure with other feedstocks: A meta-analysis. *Sci. Total Environ.* 728, 138224.
- Madras, G., Kumar, R., Modak, J., 2004. Synthesis of octyl palmitate in various supercritical fluids. *Ind. Eng. Chem. Res.* 43, 7697–7701.
- Mancheño, J.M., Pernas, M.A., Martínez, M.J., Ochoa, B., Rúa, M.L., Hermoso, J.A., 2003. Structural insights into the lipase/esterase behavior in the *Candida rugosa* lipases family: Crystal structure of the lipase 2 isoenzyme at 1.97Å resolution. *J. Mol. Biol.* 332, 1059–1069.
- Mao, C., Feng, Y., Wang, X., Ren, G., 2015. Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 45, 540-555.
- Marcon, N.S., Colet, R., Bibilio, D., Graboski, A.M., Steffens, C., Rosa, C.D., 2019. Production of Ethyl Esters by Direct Transesterification of Microalga Biomass Using Propane as Pressurized Fluid. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 187, 1285–1299.
- Marín-Suarez, M., Méndez-Mateos, D., Guadix, A., Guadix, E.M. 2019. Reuse of immobilized lipases in the transesterification of waste fish oil for the production of biodiesel. *Renew. Energy*, 140, 1-8.
- Markou, G., Angelidaki, I., Nerantzis, E., Georgakakis, D., 2013. Bioethanol production by carbohydrate-enriched biomass of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. *Energies* 6, 3937–3950.
- Maršáľková, B., Širmerová, M., Kuřec, M., Brányik, T., Brányiková, I., Melzoch, K., Zachleder, V., 2010. Microalgae *Chlorella* sp. as an alternative source of fermentable sugars. *Chem. Eng. Trans.* 21, 1279–1284.
- Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 217–232.

- Mattonai, M., Pawcenis, D., Seppia S. D., Łojewska, J., Ribechini, E., 2018. Effect of ball-milling on crystallinity index, degree of polymerization and thermal stability of cellulose. *Bioresour. Technol.* 270, 270-277.
- Meher, L.C., Vidya Sagar, D., Naik, S.N., 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterification - A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 10, 248–268.
- Meng, X., Pu, Y., Yoo, C. G., Li, M., Bali, G., Park, D. Y., Gjersing, E., Davis, M. F., Muchero, W., Tuskan, G. A., Tschaplinski, T. J., Ragauskas, A. J., 2017. An in-depth understanding of biomass recalcitrance using natural poplar variants as the feedstock. *ChemSusChem.* 10, 139–150.
- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., Xian, M., 2009. Biodiesel Production from Oleaginous Microorganisms. *Renew. Energy* 34, 1–5.
- Meng, Y., Luan, F., Yuan, H., Chen, X., Li, X., 2017. Enhancing anaerobic digestion performance of crude lipid in food waste by enzymatic pretreatment. *Bioresour. Technol.* 224, 48-55.
- Merza, F., Fawzy, A., AlNashef, I., Al-Zuhair, S., Taher, H., 2018. Effectiveness of using deep eutectic solvents as an alternative to conventional solvents in enzymatic biodiesel production from waste oils. *Energy Reports* 4, 77–83.
- METEX., 2020. METabolic EXplorer ensures future sales of its subsidiary METEX NØØVISTA through a strategic partnership with DSM for the marketing of 1,3 propanediol (PDO) to the cosmetic ingredients market. Available from <https://www.metabolic-explorer.com/history/>; <https://www.metabolic-explorer.com/2019/12/03/metex-subsiidiary-partnership-dsm/>>.
- Mishra, S. B., Mishra, A., Kaushik, N., Khan, M. A., 2007. Study of performance properties of lignin-based polyblends with polyvinyl chloride. *J. Mater. Process. Tech.* 183, 273–276.
- MME – 2020. Ministério de Minas e Energia ratifica apoio ao Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel e à Política Nacional de Biocombustíveis.
- Moraes, B. S., dos Santos, G. M., Delforno, T. P., Fuess, L. T., da Silva, A. J., 2019. Enriched microbial consortia for dark fermentation of sugarcane vinasse towards value-added short-chain organic acids and alcohol production. *J. Biosci. Bioeng.* 127, 594–601.
- Mota, M. F. S., Souza, M. F., Bon, E. P. S., Rodrigues, M. A., Freitas, S. P., 2018. Colorimetric protein determination in microalgae (Chlorophyta): Association of milling and SDS treatment for total protein extraction. *J. Phycol.* 54, 577-580.
- Mota, T. R., Oliveira, D. M., Rogério Marchiosi, O., Ferrarese-Filho Santos, W. D., 2018. Plant cell wall composition and enzymatic deconstruction. *Bioengineering.* 5, 63–77.
- Mucha, A.P., Dragisa, S., Dror, I., Garuti, M., van Hullebusch, E. D., Repinc, S. K., Almeida, C.M. R., 2019. Re-use of digestate and recovery techniques. *Trace Elements in Anaerobic Biotechnologies*, 181.
- Mulalee, S., Srisuwan, P., Phisalaphong, M., 2015. Influences of operating conditions on biocatalytic activity and reusability of Novozym 435 for esterification of free fatty acids with short-chain alcohols: A case study of palm fatty acid distillate. *Chinese J. Chem. Eng.* 23, 1851–1856.

- Musa, H., Kasim, F.H., Gunny, A.A.N., Gopinath, S.C.B., Ahmad, M.A., 2019. Biosynthesis of butyl esters from crude oil palm fruit and kernel using halophilic lipase secretion by *Marionobacter litoralis* SW-45. *3 Biotech* 9, 314.
- Nagarajan, D., Lee, D. J., Chen, C.Y., Chang, J. S., 2020. Resource recovery from wastewaters using microalgae-based approaches: A circular bioeconomy perspective. *Bioresour. Technol.* 302, 122817.
- Naik, L., Gebreegziabher, Z., Tumwesige, V., Balana, B. B., Mwirigi, J., Austin, G., 2014. Factors determining the stability and productivity of small scale anaerobic digesters. *Biomass bioenergy*, 70, 51-57.
- Nakamura, A., Tasaki, T., Ishiwata, D., Yamamoto, M., Okuni, Y., Maximilien, A.V.M., Noii, H., Uchivama, T., Samejima, M., Igarashi, K., Lino, R., 2016. Single-molecule imaging analysis of binding, processive movement, and dissociation of cellobiohydrolase *Trichoderma reesei* Cel6A and its domains on crystalline cellulose. *J. Biol. Chem.* 291, 22404–22413.
- Navarro, R. R., Otsuka, Y., Matsu, K., Sasaki, K., Hori, T., Habe, H., Nakamura, M., Nakashimada, Y., Kimbara, K., Kato, J., 2020. Combined simultaneous enzymatic saccharification and comminution (SESC) and anaerobic digestion for sustainable biomethane generation from wood lignocellulose and the biochemical characterization of residual sludge solid. *Bioresour. Technol.* 300, 122622.
- Nie, K., Xie, F., Wang, F., Tan, T., 2006 Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 43, 142–7.
- Nielsen, P.M., Brask, J., Fjerbaek, L., 2008. Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 110, 692-700.
- Niz, M., Etchelet, I., Fuentes, L., Etchebehere, C., Zaiat, M., 2019. Extreme thermophilic condition: An alternative for long-term biohydrogen production from sugarcane vinasse. *Int. J. Hydrog. Energy.* 44, 22876–22887.
- Nordblad, M., Pedersen, A.K., Rancke-Madsen, A., Woodley, J.M., 2016b. Enzymatic pretreatment of low-grade oils for biodiesel production. *Biotechnol. Bioeng.* 113, 754–760.
- Noissan, M., Raimondi, P.P., Scita, R., Hafner, M., 2021. The Role of Green and Blue Hydrogen in the Energy Transition – A Technological and Geopolitical Perspective. *Sustainability* 13, 298.
- Novozymes, 2014. Available from <http://energy.agwired.com/2014/01/20/blue-sun-opens-most-advanced-biodiesel-plant/>
- Nugraha, W.D., Kusumastuti, V.N., Matin, H.H.A., 2020. Optimization of biogas production in Indonesian region by liquid anaerobic digestion (L-AD) method from rice husk using response surface methodology (RSM). In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 845, 012042.
- O’Sullivan, C.A., 1997. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose* 4, 173–207. Park, E.Y., Sato, M., Kojima, S., 2008. Lipase-catalyzed biodiesel production from waste activated bleaching earth as raw material in a pilot plant. *Bioresour. Technol.* 99, 3130–3135.
- Osborne, S., 2020. Energy in 2020: Assessing the Economic Effects of Commercialization of Cellulosic Ethanol. Available from <<https://www.trade.gov/sites/default/files/2020->

12/Energy%20in%202020_Assessing%20the%20Economic%20Effects%20of%20Commercialization%20of%20Cellulosic%20Ethanol.pdf>.

Padella, M., O'Connell, A., Prussi, M., 2019. What is still Limiting the Deployment of Cellulosic Ethanol? Analysis of the Current Status of the Sector. *Appl. Sci.* 9, 4523.

Paques, F.W., Macedo, G.A., 2006. Lipases de látex vegetais: Propriedades e aplicações industriais. *Quim. Nova* 29, 93–99.

Park, S., Baker, J.O., Himmel, M.E., Parilla, P.A., Johnson, D.K., 2010. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnol. Biofuels* 3, 1–10.

Parthiba, K.O., Trably, E., Meheriya, S., Bernet, N., Wong, J.W.C., Carrere, H., 2018. Pretreatment of food waste for methane and hydrogen recovery: A review. *Bioresour. Technol.* 249 1025–1039.

Pascale, N.C., Chastinet, J.J., Bila, D.M., Sant'Anna, G.L., Quitério, S.L., Vendramel, S.M.R., 2019. Enzymatic hydrolysis of floatable fatty wastes from dairy and meat food-processing industries and further anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.* 79, 985–992.

Peng, F., Peng, P., Xu, F., Sun, R.-C., 2012. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnol. Adv.* 30, 879–903.

Pereira Jr., N., Bon, E.P. da S., Ferrara, M.A., 2008. *Séries em Biotecnologia: Tecnologia de Bioprocessos*.

Pereira, E.B., Martins, F.R., Gonçalves, A.R., Costa, R.S., Lima, F.J.L., Rütther, R., Abreu, S.L., Tiepolo, G.M., Pereira, S.V., Souza, J.G., 2017. *Atlas Brasileiro de Energia Solar*, 2ed ed. INPE, Sao Jose dos Campos.

Pourzolfaghar, H., Abnisa, F., Daud, W.M.A.W., Aroua, M.K., 2016. A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 61, 245–257.

Prabakaran, P., Pradeepa, V., Selvakumar, G., Ravindran, A.D., 2019. Efficacy of Enzymatic Transesterification of *Chlorococcum* sp. Algal Oils for Biodiesel Production. *Waste Biomass Valorization* 10, 1873–1881.

Qaseem, M.F., Shaheen, H., Wu, A. 2021. Cell wall hemicellulose for sustainable industrial utilization. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 144, 110996.

Rajagopal, R., Massé, D.I., Singh, G., 2013. A critical review on inhibition of anaerobic digestion process by excess ammonia. *Bioresour. Technol.* 143, 632–641.

Rajendran, K., Mahapatra, D., Venkatesh, A., 2020. Advancing anaerobic digestion through two-stage processes: Current developments and future trends. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 123, 109746.

Rajin, M., 2018. A current review on the application of enzymes in anaerobic digestion. *Anaerobic Digestion Processes*, 55–70.

Rathore V, Madras G., 2007. Synthesis of biodiesel from edible and non-edible oils in supercritical alcohols and enzymatic synthesis in supercritical carbon dioxide. *Fuel* 86, 2650–9.

Ratnayake, W.S., Jackson, D.S., 2008. Starch Gelatinization, in: *Advances in Food and Nutrition Research*. pp. 221–268.

Rego, G. C., Ferreira, T. B., Ramos, L. R., de Menezes, C. A., Soares, L. A., Sakamoto, I. K., Varesche, M. B. A., Silva, E. L., 2020. Bioconversion of pretreated sugarcane vinasse into hydrogen: new perspectives to solve one of the greatest issues of the sugarcane biorefinery. *Biomass Convers. Bior.*

Rena., Zacharia, K. M. B., Yadav, S., Machhirake, N. P., Kim. S. H., Lee, B. D., Jeong, H., Singh, L., Kumar, S., Kumar, R., 2020. Bio-hydrogen and bio-methane potential analysis for production of bio- hythane using various agricultural residues. *Bioresour. Technol.* 309, 123297.

Renewables 2020 Global Status Report., 2020. Available from https://www.ren21.net/wp-content/uploads/2019/05/gsr_2020_full_report_en.pdf.

Ribeiro, V.S., Silva, M.A.R., 2020. Biodiesel Public Policy in Brazil: An Analysis in the Overview of the public policy cycle. *Desenvolvimento Regional em debate* 10, 833–861.

Robertson, G.H., Wong, D.W.S., Lee, C.C., Wagschal, K., Smith, M.R., Orts, W.J., 2006. Native or Raw Starch Digestion: A Key Step in Energy Efficient Biorefining of Grain. *J. Agric. Food Chem.* 54, 353–365.

Robles-Medina, A., González-Moreno, P.A., Esteban-Cerdán, L., Molina-Grima, E., 2009. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. *Biotechnol. Adv.* 27, 398–408.

Romano, D., Bonomi, F., de Mattos, M.C., de Sousa Fonseca, T., de Oliveira, M. da C.F., Molinari, F., 2015. Esterases as stereoselective biocatalysts. *Biotechnol. Adv.* 33, 547–565. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.006>

Rosales-Calderon, O., Arantes, V., 2019. A review on commercial-scale high-value products that can be produced alongside cellulosic ethanol. *Biotechnol. Biofuels.* 12, 240.

Sáez-Bastante, J., Ortega-Román, C., Pinzi, S., Lara-Raya, F.R., Leiva-Candia, D.E., Dorado, M.P., 2015. Ultrasound-assisted biodiesel production from *Camelina sativa* oil. *Bioresour. Technol.* 185, 116–124.

Sajith, S., Priji, P., Sreedevi, S., Benjamin, S., 2016. An overview on fungal cellulases with an industrial perspective. *J. Nutr. Food Sci.* 6.

Salimon, J., Salih, N., Yousif, E., 2012. Improvement of pour point and oxidative stability of synthetic ester basestocks for biolubricant applications. *Arab. J. Chem.* 5, 193–200.

Sánchez, Ó.J., Cardona, C.A., 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.* 99, 5270–5295.

Sampaio, I.L.M., Cardoso, T.F., Souza, N.R., Watanabe, M.D.B., Carvalho, D.J., Bonomi, A., Junqueira, T.L., 2019. Electricity Production from Sugarcane Straw Recovered Through Bale System: Assessment of Retrofit Projects. *BioEnergy Res.*, 12, 865–877.

Santos, F.F.P., Rodrigues, S., Fernandes, F.A.N. 2009. Optimization of the production of biodiesel from soybean oil by ultrasound assisted methanolysis. *Fuel Process. Technol.* 90, 312–316.

Saravanan, A.P., Pugazhendhi, A., Mathimani, T., 2020. A comprehensive assessment of biofuel policies in the BRICS nations: Implementation, blending target and gaps. *Fuel* 272, 117635.

- Sarmah, N., Revathi, D., Sheelu, G., Rani, K.Y., Sridhar, S., Mehtab, V., Sumana, C., 2017. Recent Advances on Sources and Industrial Applications of Lipases. *Biotechnol. Prog.* 34.
- Sawatdeenarunat, C., Wangnai, C., Songkasiri, W., Panichnumsin, P., Saritpongteeraka, K., Boonsawang, P., Chaiprapat, S., 2019. Biogas Production From Industrial Effluents. In *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels* (pp. 779-816). Academic Press.
- Sayre, R., 2010. Microalgae: The Potential for Carbon Capture. *Bioscience* 60, 722–727.
- Schnürer, A., Jarvis, Å., 2010. Microbiological Handbook for Biogas Plants Swedish. Swedish Waste Management U2009:03, v. Swedish Ga, p. 138.
- Scholz, M.J., Weiss, T.L., Jinkerson, R.E., Jing, J., Roth, R., Goodenough, U., Posewitz, M.C., Gerken, H.G., 2014. Ultrastructure and Composition of the *Nannochloropsis gaditana* Cell Wall. *Eukaryot. Cell* 13, 1450–1464.
- Scott, A., 2018. Clariant bets big on cellulosic ethanol. *Chem. Eng. News.* 96, 4–7.
- Serrano-Arnaldos, M., Montiel, M.C., Ortega-Requena, S., Máximo, F., Bastida, J., 2019. Development and economic evaluation of an eco-friendly biocatalytic synthesis of emollient esters. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 43, 495–505.
- Sethupathy, A., Arun, C., Sivashanmugam., Kumar, R.R., 2020. Enrichment of biomethane production from paper industry biosolid using ozonation combined with hydrolytic enzymes. *Fuel* 279, 118522.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C., 2001. Production purification characterization and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* 19, 627–662.
- Sharma, Y.C., Singh, B., Upadhyay, S.N., 2008. Advancements in development and characterization of biodiesel: A review. *Fuel* 87, 2355–2373.
- Shanks, B.H., Keeling, P.L., 2017. Bioprivileged molecules: creating value from biomass. *Green Chem.* 19, 3177.
- Shindo, S., Sakakibara, K., Sano, R., Ueda K., Hases, M., 2001. Characterization of a floricaula/leafy homologue of *gnetum parvifolium* and its implications for the evolution of reproductive organs in seed plants. *Int. J. Plant Sci.* 162, 1199–1209.
- Silva, G.P.S., Contiero, J., Neto, P.M.A., de Lima, C.J.B., 2014. 1,3-Propanediol: production, applications and biotechnological potential. *Quim. Nova.* 37, 527–534.
- SINDPEÇAS – Sindicato Nacional da Indústria de Componentes para Veículos Automotores, 2020. Available from: https://www.sindipecas.org.br/sindinews/Economia/2020/RelatorioFrotaCirculante_Abril_2020.pdf
- Singh, A., Bajar, S., Devi, A., Pant, D., 2021. An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. *Bioresour. Technol. Rep.* 14, 100652.
- Sjöström, E., 1993. *Wood Chemistry. Fundamentals and Applications*, second ed. Academic Press, San Diego, CA.

- Slaughter, S.L., Butterworth, P.J., Ellis, P.R., 2001. Mechanisms of the action of porcine pancreatic α -amylase on native and heat treated starches from various botanical sources. *Starch - Adv. Struct. Funct.* 1525, 110–115.
- Soares, D., Pinto, A. F., Gonçalves, A. G., Mitchell, D. A., Krieger, N., 2013. Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. *Biochem. Eng. J.* 81, 15–23.
- Soares, L.A., Rabelo, C.A.B.S., Delforno, T.P., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2019. Experimental design and syntrophic microbial pathways for biofuel production from sugarcane bagasse under thermophilic condition. *Renew. Energy* 140, 852–861.
- Sorensen, H. R., Pedersen, S., Jorgensen, C. T., Meyer, A. S., 2007. Enzymatic Hydrolysis of Wheat Arabinoxylan by a Recombinant “Minimal” Enzyme Cocktail Containing β -Xylosidase and Novel endo-1,4- β -Xylanase and α -L-Arabinofuranosidase Activities. *Biotechnol. Prog.* 23, 100–107.
- Sotoft, L.F., Rong, B., Christensen, K.V., Norddahl, B., 2010. Process simulation and economical evaluation of enzymatic biodiesel production plant. *Bioresour. Technol.* 101, 5266–5274.
- Souza, L.T.A., Mendes, A.A., Castro, H.F.D., 2016. Selection of Lipases for the Synthesis of Biodiesel from Jatropha Oil and the Potential of Microwave Irradiation to Enhance the Reaction Rate. *Biomed Res. Int.* 2016.
- Souza, M.F. de, Pereira, D.S., Freitas, S.P., Bon, E.P. da S., Rodrigues, M.A., 2017. Neutral sugars determination in Chlorella: Use of a one-step dilute sulfuric acid hydrolysis with reduced sample size followed by HPAEC analysis. *Algal Res.* 24, 130–137.
- Souza, M.F. de, Rodrigues, M.A., Freitas, S.P., Bon, E.P. da S., 2020. Effect of milling and enzymatic hydrolysis in the production of glucose from starch-rich Chlorella sorokiniana biomass. *Algal Res.* 50, 101961.
- Souza, M.S., Aguiéiras, E.C.G., Da Silva, M.A.P., Langone, M.A.P., 2009. Biodiesel synthesis via esterification of feedstock with high content of free fatty acids. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 154, 253–267.
- Srivastava, N., Srivastava, M., Mishra, P., Gupta, V. K., Molina, G., Rodriguez-Couto, S., Manikanta, A., Ramteke, P., 2018. Applications of fungal cellulases in biofuel production: advances and limitations. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 82, 2379–2386.
- Statistical Review of World Energy., 2021. Available from <<https://www.bp.com/content/dam/bp/business-sites/en/global/corporate/pdfs/energy-economics/statistical-review/bp-stats-review-2021-full-report.pdf>>
- Straathof, A.J.J., 2013. Transformation of biomass into commodity chemicals using enzymes or cells. *Chem. Rev.* 114, 1871–1908
- Straathof, A.J.J., 2014. Transformation of biomass into commodity chemicals using enzymes or cells. *Chemical Reviews*, 114, 1871–1908.

Straathof, A.J.J., Bampouli, A., 2017. Potential of commodity chemicals to become bio-based according to maximum yields and petrochemical prices. Modeling and Analysis: Biobased commodity chemicals.

Su, E.Z., Zhang, M.J., Zhang, J.G., Gao, J.F., Wei, D.Z., 2007. Lipase-catalyzed irreversible transesterification of vegetable oils for fatty acid methyl esters production with dimethyl carbonate as the acyl acceptor. *Biochem. Eng. J.* 36, 167–173.

Subhedar, P.B., Gogate, P.R., 2016. Ultrasound assisted intensification of biodiesel production using enzymatic interesterification. *Ultrason. Sonochem.* 29, 67–75.

Subramani, L., Parthasarathy, M., Balasubramanian, D., Ramalingam, K., 2018a. Novel *Garcinia gummi-gutta* methyl ester (GGME) as a potential alternative feedstock for existing unmodified DI diesel engine. *Renew. Energy* 125, 568–577.

SUCRE, 2017. Electricity from sugarcane straw can supply 27% of Brazilian household demand. [Eletricidade gerada a partir da palha de cana-de-açúcar pode suprir 27% do consumo residencial no Brasil] <https://pages.cnpem.br/sucre/2017/09/21/eletricidade-geradapartir-da-palha-de-cana-de-acucar-pode-suprir-27-do-consumo-residencialno-brasil/>

Sunitha, S., Kanjilal, S., Reddy, P.S., Prasad, R.B.N., 2007. Ionic liquids as a reaction medium for lipase-catalyzed methanolysis of sunflower oil. *Biotechnol. Lett.* 29, 1881–1885.

Susanne, R.S., 2016. The latest news and data about ethanol production. Available from <http://www.ethanolproducer.com/articles/13135/global-cellulosic-ethanol-developments>.

Sukumaram, R.K., Christopher, M., Kooloth-Valappil, P., Sreeja-Raju, A., Mathew, R.M., Sankar, M., Puthiyamadham, A., Velayudhanpillai-Prasannakumari, A., Aswathi, A., Rebinro, V., Abraham, A., Pandey, A., 2021. Addressing challenges in production of cellulases for biomass hydrolysis: Targeted interventions into the genetics of cellulase producing fungi. *Bioresour. Technol.* 329, 124746.

Svihus, B., Uhlen, A.K., Harstad, O.M., 2005. Effect of starch granule structure associated components and processing on nutritive value of cereal starch: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 122, 303–320.

Sweeney, A.D., Xu, F., 2012. Biomass converting enzymes and industrial biocatalysts for fuels and chemicals: recent developments. *Catalysts* 2, 244–263.

Tabka, M. G, Herpoël-Gimbert, I., Monod, F., Asther, M., Sigoillot, J. C., 2006. Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment. *Enzym. Microb. Technol.* 39, 897–902.

Tacias-Pascacio, V.G., Virgen-Ortíz, J.J., Jiménez-Pérez, M., Yates, M., Torrestiana-Sanchez, B., Rosales-Quintero, A., Fernandez-Lafuente, R., 2017. Evaluation of different lipase biocatalysts in the production of biodiesel from used cooking oil: Critical role of the immobilization support. *Fuel* 200, 1–10.

Taher, H., Giwa, A., Abusabiekeh, H., Al-Zuhair, S., 2020. Biodiesel production from *Nannochloropsis gaditana* using supercritical CO₂ for lipid extraction and immobilized lipase transesterification: Economic and environmental impact assessments. *Fuel Process. Technol.* 198, 106249.

Takeda, H., 1988. Classification of *Chlorella* strains by cell wall sugar composition. *Phytochemistry* 27, 3823–3826.

- Takeda, H., 1991. Sugar composition of the cell wall and the taxonomy of *Chlorella* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 27, 224–232.
- Takeda, Y., Hizukuri, S., Takeda, C., Suzuki, A., 1987. Structures of branched molecules of amyloses of various origins, and molar fractions of branched and unbranched molecules. *Carbohydr. Res.* 165, 139–145.
- Talukder, M.M.R., Wu, J.C., Fen, N.M., Melissa, Y.L.S., 2010. Two-step lipase catalysis for production of biodiesel. *Biochem. Eng. J.* 49, 207–212.
- Tavares, F., Da Silva, E.A., Pinzan, F., Canevesi, R.S., Milinsk, M.C., Scheufele, F.B., Borba, C.E., 2018. Hydrolysis of crambe oil by enzymatic catalysis: An evaluation of the operational conditions. *Biocatal. Biotransformation* 36, 422–435.
- Tester, R.F., Qi, X., Karkalas, J., 2006. Hydrolysis of native starches with amylases. *Anim. Feed Sci. Technol.* 130, 39–54.
- Thomas, P., Duolikun, T., Rumjit, N.P., Moosavi, S., Lai, C.W., Johan, M.R.B., Fen, L.B., 2010. Comprehensive review on nanocellulose: Recent developments, challenges and future prospects. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 110, 103884.
- Toldra-Reig, F., Mora, L., Toldra, F., 2020. Trends in Biodiesel Production from Animal Fat Waste. *Appl. Sci.* 10, 3644.
- Top, A.G.M., 2010. Production and utilization of palm fatty acid distillate (PFAD). *Lipid Technol.* 22, 11–13.
- Tran, D.T., Chen, C.L., Chang, J.S., 2012. Immobilization of *Burkholderia* sp. lipase on a ferric silica nanocomposite for biodiesel production. *J. Biotechnol.* 158, 112–119.
- Trentin, C.M., Scherer, R.P., Rosa, C.D., Treichel, H., Oliveira, D., Oliveira, J.V., 2014. Continuous lipase-catalyzed esterification of soybean fatty acids under ultrasound irradiation. *Bioproc Biosyst Eng* 37, 841–847.
- Uchiyama, T., Uchihashi, T., Nakamura, A., Watanabe, H., Kaneko, S., Samejima, M., Igarashi, K., 2020. Convergent evolution of processivity in bacterial and fungal cellulases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 117, 19896–19903.
- Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Horn, S.J., Zhanliang, L., Zhai, H., Sorlie, M., et al., 2010. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science* 330, 219–222.
- Van Dyk, J.S., Pletschke, B.I., 2012. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes – factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol. Advan.* 30, 1458–1480.
- Varga, E., Klinke, H. B., Réczey, K., Thomsen, A. B., 2004. High solid simultaneous saccharification and fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol. *Biotechnol Bioeng.* 88, 567–74.
- Varma, M.N., Madras, G., 2007. Synthesis of biodiesel from castor oil and linseed oil in supercritical fluids. *Ind Eng Chem Res.* 46, 1–6.

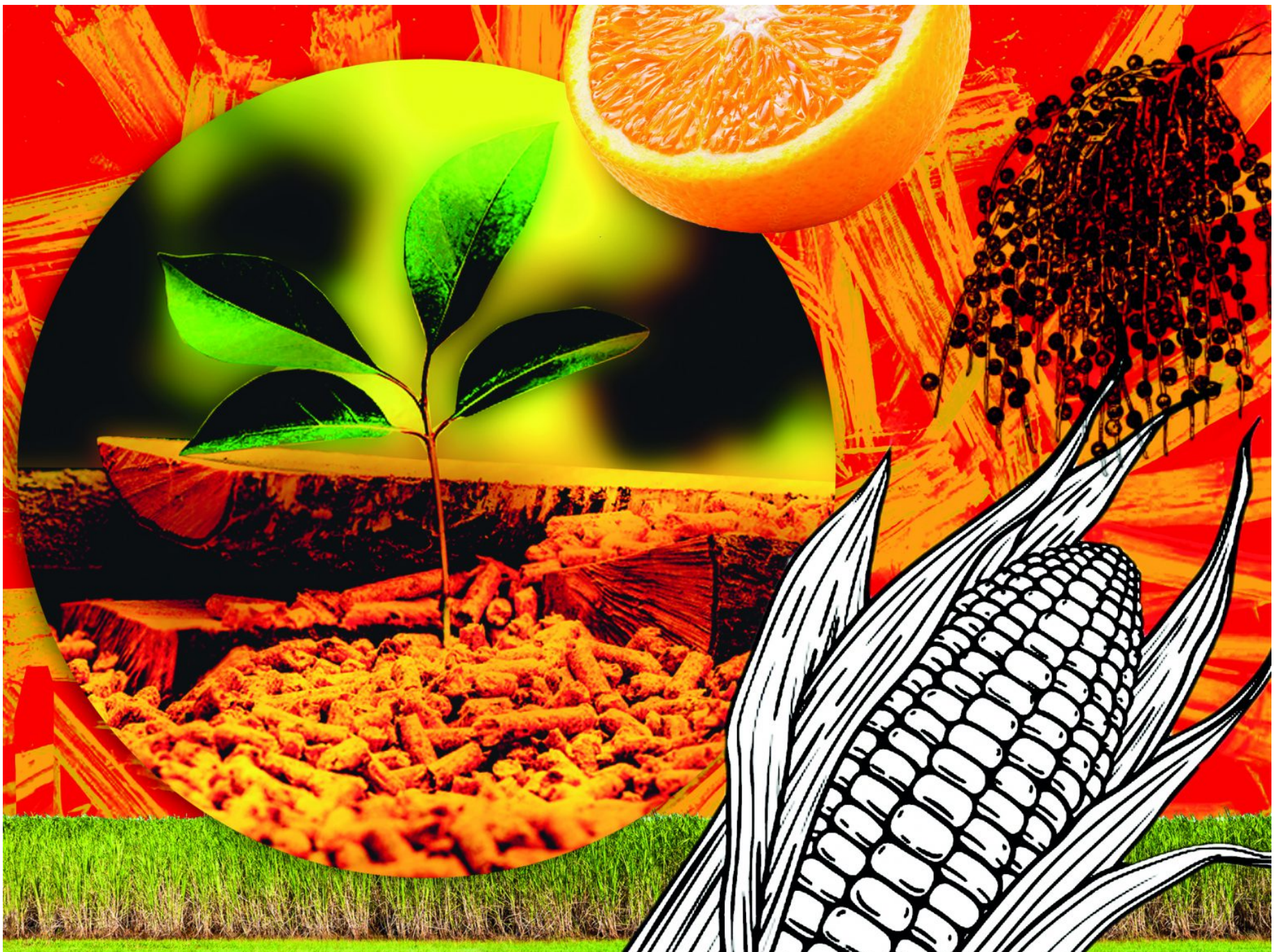
- Veljkovic, V.B., Avramovic, C.J.M., Stamenkovic, O.S. 2012. Biodiesel production by ultrasound-assisted transesterification: State of the art and the perspectives. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 16, 1193–1209.
- Vital, A., 2021. Raízen passa a fornecer EcoÁlcool à toda linha de perfumaria do Grupo Boticário. Available from <https://jornalcana.com.br/raizen-passa-a-fornecer-ecoalcohol-a-toda-linha-de-perfumaria-do-grupo-boticario/>.
- Waghmare, G.V, Rathod, V.K., 2016. Ultrasound assisted enzyme catalyzed hydrolysis of waste cooking oil under solvent free condition. *Ultrason. Sonochem.* 32, 60–67.
- Waltz, E., 2009. Biotech's green gold? *Nat. Biotechnol.* 27, 15–18.
- Wang, C., Li, H., Li, M., Bian, J., Sun, R., 2017. Revealing the structure and distribution changes of Eucalyptus lignin during the hydrothermal and alkaline pretreatments. *Sci. Rep.* 7, 593.
- Wang, J., Yin, Y., 2018. Fermentative hydrogen production using various biomass-based materials as feedstock. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 92, 284-306.
- Wang, H., Xu, J., Sheng, L., Liu, X., Lu, Y., Li, W., 2018. A review on bio-hydrogen production technology. *Int. J. Energy. Res.* 42, 3442-3453.
- Watanabe, Y., Nagao, T., Nishida, Y., Takagi, Y., Shimada, Y., 2007. Enzymatic production of fatty acid methyl esters by hydrolysis of acid oil followed by esterification. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* 84, 1015–1021.
- Watanabe, M.D.B., Morais, E.R., Cardoso, T.F., Chagas, M.F., Junqueira, T.L., Carvalho, D.J., Bonomi, 2020. A. Process simulation of renewable electricity from sugarcane straw: Techno-economic assessment of retrofit scenarios in Brazil. *J. Clean. Prod.* 254, 120081.
- Weide, T., Baquero, C.D., Schomaker, M., Brüggling, E., Wetter, C., 2020. Effects of enzyme addition on biogas and methane yields in the batch anaerobic digestion of agricultural waste (silage, straw, and animal manure). *Biomass Bioenerg* 132, 105442.
- Xu, C., Eckerman, C., Smeds, A., Reunanen, M., Eklund, P.C., Sjöholm, R., Willfor, S., 2011. Carboxymethylated spruce galactoglucomannans: preparation, characterisation, dispersion stability, water-in-oil emulsion stability, and sorption on cellulose surface. *Nordic Pulp & Paper Research Journal*.
- Xu, C., Zhang, J., Zhang, Y., Guo, Y., Xu, H., Xu, J., Wang, Z. 2019. Enhancement of highsolids enzymatic hydrolysis efficiency of alkali pretreated sugarcane bagasse at low cellulase dosage by fed-batch strategy based on optimized accessory enzymes and additives. *Bioresour Technol.* 292, 121993.
- Xu, Q., Luo, T-Y., Wu, R-L., Wei, W., Sun, J., Dai, X., Ni, B-J., 2021. Rhamnolipid pretreatment enhances methane production from two-phase anaerobic digestion of waste activated sludge. *Water Res.* 194, 116909.
- Yang, G., Wang, J., 2018. Various additives for improving dark fermentative hydrogen production: A review. *Renewable Sustainable Energy Rev.* 95, 130–146.
- Yang, L., Ge, X., Wan, C., Yu, F., Li, Y., 2014. Progress and perspectives in converting biogas to transportation fuels. *Renewable Sustainable Energy Rev.* 40, 1133-1152.

- Yoo, C. G., Meng, X., Pu, Y., Ragauskas, A. J., 2020. The critical role of lignin in lignocellulosic biomass conversion and recent pretreatment strategies: a comprehensive review. *Bioresour. Technol.* 301, 122784.
- Yu, Q., Liu, R., Li, K., Ma, R., 2019. A review of crop straw pretreatment methods for biogas production by anaerobic digestion in China. *Renewable Sustainable Energy Rev.* 107, 51-58.
- Yu, Z., Gwak, K. S., Treasure, T., Jameel, H., Chang, H. M., Park, S., 2014. Effect of lignin chemistry on the enzymatic hydrolysis of woody biomass. *ChemSusChem.* 7, 1942–1950.
- Zacchi, G., Axelsson, A., 1989. Economic evaluation of preconcentration in production of ethanol from dilute sugar solutions. *Biotechnol. Bioeng.* 34, 223–33.
- Zahan, Z., Georgiou, S., Muster, T.H., Othman, M.Z., 2018. Semi-continuous anaerobic co-digestion of chicken litter with agricultural and food wastes: a case study on the effect of carbon/nitrogen ratio, substrates mixing ratio and organic loading. *Bioresour. Technol.* 270, 245-254.
- Zamri, M.F.M.A., Hasmady, S., Akhiar, A., Ideris, F., Shamsuddin, A. H., Mofijur, M., Mahlia, T.M. I., 2021. A comprehensive review on anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. *Renewable Sustainable Energy Rev.* 137, 110637.
- Zeng, L., He, Y., Jiao, L., Li, K., Yan, Y., 2017. Preparation of Biodiesel with Liquid Synergetic Lipases from Rapeseed Oil Deodorizer Distillate. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 183, 778–791. -y
- Zhang, L., Sun, S., Xin, Z., Sheng, B., Liu, Q., 2010. Synthesis and component confirmation of biodiesel from palm oil and dimethyl carbonate catalyzed by immobilized-lipase in solvent-free system. *Fuel* 89, 3960–3965.
- Zhang, X., Yu, J., Zeng, A. 2016. Optimization and modeling for the synthesis of sterol esters from deodorizer distillate by lipase-catalyzed esterification. *Independent Biotechnology and Applied Biochemistry.*
- Zhao, H., Zhang, C., Crittle, T.D., 2013. Choline-based deep eutectic solvents for enzymatic preparation of biodiesel from soybean oil. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 85, 243-247.
- Zhao, X., Liu, D., 2019. Multi-products co-production improves the economic feasibility of cellulosic ethanol: A case of Formiline pretreatment-based biorefining. *Applied Energy.* 250, 229-244.
- Zheng, J., Wei, W., Wang, S., Li, X., Zhang, Y., Wang, Z., 2020. Immobilization of Lipozyme TL 100L for methyl esterification of soybean oil deodorizer distillate. *3 Biotech* 10.
- Zhou, X., Li, W., Mabon, R., Broadbelt, L. J., 2017. A Critical Review on Hemicellulose Pyrolysis. *Energy Technol.* 5, 52–79
- Zhu, L., O'dwyer, J.P., Chang, V.S., Granda, C.B., Holtzapple, M.T., 2008. Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. *Bioresour. Technol.* 99, 3817–3828.
- Zifcakova, L., Baldrian, P., 2012. Fungal polysaccharide monooxygenases: new players in the decomposition of cellulose. *Fungal Ecol.* 5, 481–489.
- Zoghalmi, A., Paës, G., 2019. Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. *Front. Chem.* 7, 874.

BIOMASSA BRASILEIRA: RIQUEZA POUCO EXPLORADA

[Página Inicial](#) > [Artigo](#)

Bagaços, palhas e caroços podem gerar tanta riqueza quanto o cultivo de cana-de-açúcar, grãos, mandioca, frutas e o extrativismo florestal. A agroindústria é um dos principais setores da economia do Brasil, mas o reaproveitamento de seus resíduos, a chamada biomassa vegetal, pode levar o país ao protagonismo na transição inevitável para uma economia de baixo carbono, que gera menos prejuízos ao meio ambiente. A biomassa é matéria-prima para combustíveis, energia e diferentes tipos de produtos importantes para a indústria. A exploração dessa riqueza, no entanto, requer tecnologias diversificadas, avançadas e economicamente viáveis.



País de proporções continentais e rica biodiversidade, o Brasil tem a agroindústria como um de seus principais setores da economia. As plantações de cana-de-açúcar, grãos, frutas e o extrativismo nas florestas geram resíduos – a chamada biomassa vegetal – que têm um impacto ambiental severo quando não descartados corretamente. Essa biomassa, entretanto, pode se transformar em matéria-



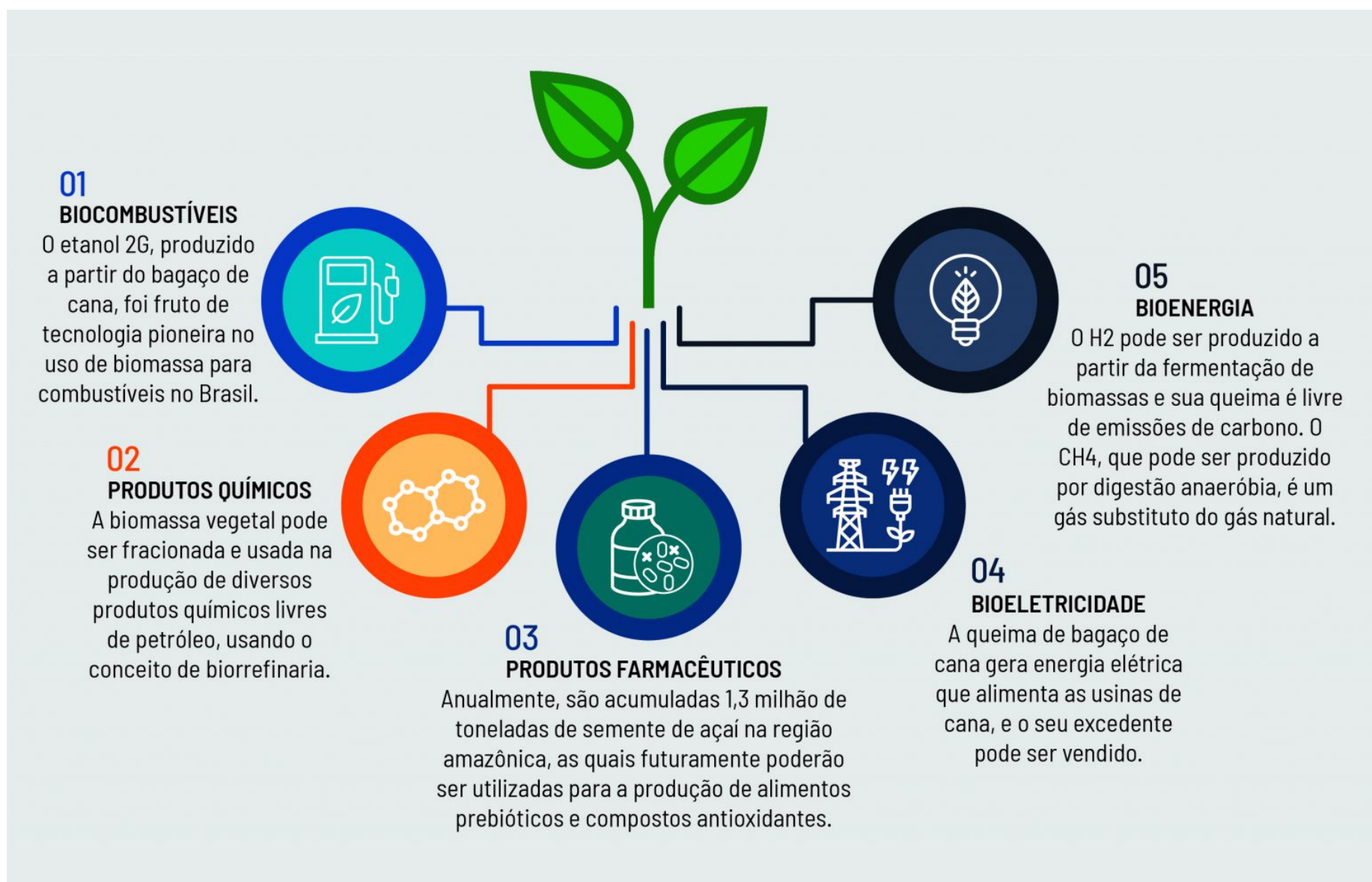
prima renovável para a geração de energia e de produtos com maior valor agregado. E não há ciclo produtivo mais virtuoso do que aquele em que os resíduos de uma atividade econômica são reaproveitados para outras atividades, evitando o seu acúmulo e gerando ainda mais riqueza.

As biomassas mais comuns no Brasil, pela dimensão de sua atividade agroindustrial e de extrativismo, são bagaço e palha da cana-de-açúcar, palha de milho, palha de trigo, palha e cascas de arroz e resíduos do processamento de cítricos, do coco, do açaí, da mandioca, do óleo de palma, da macaúba e do café. Apesar de já existirem tecnologias para o processamento industrial de algumas dessas biomassas, a diversidade dos materiais ainda exige o desenvolvimento de processos que valorizem o potencial de cada um deles.

Ainda que as biomassas apresentem composição química e características estruturais comuns, cada tipo de resíduo tem peculiaridades próprias à sua espécie vegetal, com potenciais distintos para a geração de novos produtos. Por exemplo, a palha do milho é diferente dos resíduos de eucalipto que, por sua vez, são diferentes do bagaço da laranja e das sementes do açaí. Diante dessa diversidade, as atividades de pesquisa e desenvolvimento (P&D) são fundamentais para encontrar soluções inovadoras visando à exploração integral da riqueza desses recursos renováveis. Essas novas tecnologias precisam incluir preservação ambiental, ser economicamente viáveis e ter impacto social.

As muitas aplicações

Muitos produtos podem ser gerados a partir das biomassas, por meios físicos, químicos e/ou bioquímicos. Um exemplo de uso mais direto é a queima do bagaço de cana nas usinas para cogeração de energia (vapor e eletricidade), um processo já estabelecido. Por sua vez, tecnologias termoquímicas mais avançadas, como a pirólise ou gaseificação da biomassa, que geram bióleo, biochar e gás de síntese, ainda não têm dimensão industrial.



Exemplos de aplicações das biomassas vegetais na produção de biocombustíveis, de produtos químicos, de produtos farmacêuticos, de bioeletricidade e de bioenergia

Crédito: Mariana de Oliveira Faber

Outros usos da biomassa pressupõem a desconstrução da sua estrutura recalcitrante por tratamentos que possibilitem o acesso aos seus componentes principais (celulose, hemicelulose e lignina). A celulose, que é a matéria-prima da pasta de celulose e do papel, é também usada na



obtenção de éteres de celulose com propriedades físicas adequadas a diferentes produtos. A lignina, além de ser um combustível sólido, pode ser usada para a produção de óleos, resinas, gás de síntese e metanol.

As etapas do reaproveitamento

O pré-tratamento dessas diferentes biomassas é essencial para seu posterior processamento por meio de processos biotecnológicos, como a hidrólise enzimática, em que ocorre a quebra de seus polissacarídeos (como a celulose e a hemicelulose) em moléculas menores, pela ação da água e na presença de enzimas que catalisam (aceleram) a reação. Essa etapa prévia pode ser mecânica, por meio de moagem e extrusão (passagem do material por um equipamento chamado de extrusora), por exemplo, ou físico-química, pelo uso de água pressurizada (hidrotérmico), entre muitos outros métodos. O pré-tratamento visa à produção de xaropes de biomassa contendo glicose, a partir da celulose, e/ou açúcares provenientes da hemicelulose (xilose, galactose, arabinose e/ou manose), dependendo da biomassa. Esses xaropes, resultantes da ação de enzimas celulasas e hemicelulasas, que atuam como catalisadores, podem servir de matéria-prima em diferentes processos fermentativos para a produção de etanol e produtos químicos como ácidos orgânicos (ácido succínico, glucônico, láctico, butírico e cítrico), acetona, glicerol e butanol. Podem também ser processados por rotas químicas de conversão de açúcares. Em qualquer cenário, o processamento deve ocorrer localmente, pois a biomassa é um material leve e de transporte oneroso.

Em qualquer cenário, o processamento deve ocorrer localmente, pois a biomassa é um material leve e de transporte oneroso

Os processos enzimáticos são essencialmente sustentáveis e não poluentes, mas, para serem realizados, dependem de biocatalisadores que o Brasil não produz. Essa é uma falha estratégica com desdobramentos econômicos adversos, apesar do Decreto n.º 6.041 (8 de fevereiro de 2007) da Casa Civil da Presidência da República, que instituiu a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia, ter incluído como alvo estratégico a produção e uso de enzimas no Brasil. A ausência dessa tecnologia gera um grande prejuízo, uma vez que o mercado global de enzimas foi, em 2019, de US\$ 9,9 bilhões, com perspectiva de dobrar até 2027, se consideradas as previsões de taxa de crescimento anual de 7,1%.

O exemplo mais conhecido de processamento da biomassa por hidrólise enzimática é a produção de etanol de segunda geração (2G), a partir da biomassa da cana-de-açúcar. Essa tecnologia – já implantada no Brasil – permite o aumento da produção de etanol sem expandir a área de cultivo da cana. A tecnologia 2G gera, como resíduo sólido, a lignina, uma macromolécula que pode ser usada nas usinas como combustível para cogeração de energia térmica e elétrica, substituindo o uso do bagaço. É importante ressaltar que a queima da lignina gera 1,5 vezes mais energia por tonelada do que a queima dos carboidratos do bagaço de cana. Assim, o uso do bagaço para produzir etanol 2G não impede e ainda aumenta a eficiência da cogeração de energia. Mas, apesar dos avanços na cogeração de energia e na produção de etanol 2G, o Brasil ainda precisa investir para aumentar o uso da biomassa em sua matriz energética.



HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO



Lignina e xarope de glicose podem ser obtidos da biomassa da cana-de-açúcar hidrolisada por enzimas

Crédito: Ricardo S. S. Teixeira e Marina C. Tomasini

Oportunidades na geração de energia

Resíduos e efluentes terão protagonismo no processo de descarbonização da matriz energética global. De acordo com o relatório de 2021 do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC, na sigla em inglês), até 2050 as energias renováveis deverão corresponder a entre 70% e 85% das fontes de eletricidade. O hidrogênio (H_2) terá um papel essencial nessa transição, devido à sua alta densidade energética e ausência de emissões de carbono, gerando apenas vapor d'água durante sua queima. No entanto, cerca de 70% do H_2 produzidos mundialmente provêm de fontes fósseis, por meio de processos termoquímicos. O desenvolvimento de processos sustentáveis para obtenção de H_2 é de extrema relevância no cenário atual, no qual se busca a redução das emissões de carbono e o uso racional de matérias-primas renováveis e residuais.

O uso de biomassa para produção biológica de H_2 já é uma realidade em institutos e universidades no Brasil, com estudos desenvolvidos a partir de resíduos e efluentes agroindustriais. Nesse processo, os microrganismos provêm de ambientes naturais, como lodo de estação de tratamento de esgoto (ETE), um resíduo rico em microrganismos. Esse mesmo lodo de ETE também contém microrganismos produtores de metano (CH_4), um gás de interesse industrial, substituto do gás natural e que possui alta densidade energética. É possível, desse modo, integrar a produção de H_2 e CH_4 à agroindústria, promovendo o tratamento de resíduos e efluentes associado à produção de bioenergia.

Diante da diversidade de biomassa residual distribuída geograficamente no Brasil e da disponibilidade local desses materiais, é possível gerar energia distribuída e descentralizada, alavancando o desenvolvimento regional. Essa estratégia pode aumentar a segurança energética do Brasil, ao fazer uso de fontes baratas e intermitentes de matéria-prima, e não apresenta riscos para a segurança alimentar.



Além disso, proporcionaria grandes benefícios sociais, pois permite a inserção de novas atividades, de maneira contínua, como alternativa aos trabalhos sazonais típicos na agroindústria.

Ainda que o uso da biomassa para geração de energia (cogeração e etanol 2G) seja uma área avançada no país, a produção e uso dos xaropes de biomassa para a obtenção de outras fontes de energia e de produtos químicos ainda não deslanchou. Assim, é fundamental que o país preencha a lacuna da biorrefinaria atrelada à plataforma de açúcares da biomassa. Várias instituições brasileiras desenvolvem pesquisas de ponta visando ao uso das biomassas brasileiras. A Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e o Instituto Nacional de Tecnologia (INT) colaboram para o desenvolvimento de diferentes tecnologias de processamento de diferentes biomassas através da parceria entre os Laboratórios Bioetanol (UFRJ) e Biocatálise (INT).

O potencial do milho, da mandioca e das frutas

A implantação de tecnologias para o aproveitamento de biomassa no Brasil é favorecida pela abundância desse recurso e por sua integração a processos produtivos já existentes. Um exemplo da disponibilidade e variedade de biomassas no país é o cultivo de milho, que gera atualmente cerca de 46 milhões de toneladas de resíduos (palha, caules e as folhas) por ano, que poderiam produzir mais de 4,4 bilhões de litros de etanol 2G.

A mandioca é também extensivamente cultivada no país para a produção de farinha. Resíduos do processamento dessa raiz, a polpa seca e o bagaço têm alto teor de amido, que pode ser transformado em xaropes de glicose através da hidrólise enzimática. Esses xaropes podem ser usados na fabricação de etanol, reduzindo os resíduos poluentes gerados pela indústria de amido e diminuindo os custos da produção do combustível. Os xaropes do amido de mandioca também podem ser utilizados para produzir, por processo fermentativo, glutamato monossódico e outros aminoácidos e adoçantes com potencial absorção pelo mercado interno.

O bagaço dos cítricos é outro resíduo importante da atividade agrícola no Brasil. O país é o maior produtor mundial de frutas cítricas, com 20 milhões de toneladas por ano

O bagaço dos cítricos é outro resíduo importante da atividade agrícola no Brasil. O país é o maior produtor mundial de frutas cítricas, com 20 milhões de toneladas por ano, que são processadas para obter suco. Os resíduos cítricos são fonte da fibra pectina, largamente comercializada para uso na indústria de alimentos, e do terpeno limoneno, usado na indústria química como solvente biodegradável e como componente aromático e flavorizante nas indústrias farmacêuticas e alimentícias.

Os poderosos ‘restos’ do açaí

O processamento do açaí gera aproximadamente 1,3 milhão de toneladas de resíduos anualmente na região amazônica, resultando em um sério problema ambiental e sanitário



Os produtos da biomassa podem derivar também de atividades extrativistas como a do açaí na Amazônia. A polpa de açaí experimenta um *'boom'* econômico, com aumento considerável do consumo nos mercados do Brasil e internacional. Mas essa polpa que agrada a tantos representa apenas 15% da massa do fruto maduro; os outros 85% da massa correspondem à semente. O processamento do açaí gera, dessa forma, aproximadamente 1,3 milhão de toneladas de resíduos anualmente na região amazônica, resultando em um sério problema ambiental e sanitário.

Essa semente apresenta uma composição química diferenciada, pois é rica no polissacarídeo manana, que, após hidrólise, gera o açúcar manose ou manano-oligossacarídeos, produtos com diversas aplicações nas indústrias farmacêutica, de cosméticos e de alimentos. O resíduo do açaí é também rico em polifenóis (compostos aromáticos), que podem ter atividade antioxidante, também de grande interesse para esses três setores.



Frações obtidas da semente de açaí: sólidos (semente do fruto inteiro, semente triturada e produto liofilizado composto de manose) e líquidos (extratos de compostos polifenólicos com ação antioxidante)

Crédito: Amanda Oliveira/INT

De prebióticos a cosméticos

A biomassa também apresenta alternativas para gerar produtos de valor agregado, como prebióticos, que são cadeias de carboidratos não-digeríveis capazes de estimular de maneira seletiva a proliferação de populações de bactérias desejáveis, promovendo o equilíbrio da microbiota do intestino. São compostos com propriedades prebióticas os xilo-oligossacarídeos, obtidos de biomassas lignocelulósicas por vias químicas (hidrólise ácida) ou vias bioquímicas (hidrólise enzimática).

Outras biomassas, como sementes e cascas de frutos, possuem compostos ativos importantes, como os polifenóis, substâncias aromáticas com capacidade antioxidante e benéficas à saúde humana. Polifenóis são também amplamente utilizados em cosméticos para manter a elasticidade e firmeza da pele e na indústria alimentícia como corantes e conservantes naturais.



A urgente economia de baixo carbono

Apesar de as oportunidades de geração de produtos essenciais e de valor agregado a partir da biomassa serem ilimitadas, persiste o desafio do desenvolvimento tecnológico e do investimento financeiro para tornar seu uso competitivo frente às matérias-primas convencionais. O desenvolvimento de processos e produtos com baixa pegada de carbono é uma necessidade iminente, visto que mais de 40 países no mundo estão adotando o imposto ‘verde’, usado para taxar atividades poluentes e produtos de consumo com base na quantidade de CO₂ emitido em sua realização ou produção.

As condições naturais e a vocação já existem no país. Agora precisamos de políticas bem estruturadas e investimentos canalizados para uma nova realidade industrial calcada no uso da biomassa

O Brasil precisa acompanhar essa transição e adotar medidas sustentáveis de desenvolvimento; caso contrário, perderá grandes parceiros comerciais. As condições naturais e a vocação já existem no país. Agora precisamos de políticas bem estruturadas e investimentos canalizados para uma nova realidade industrial calcada no uso da biomassa.

+ Leia mais

Elba P. S. Bon, Marina Cristina Tomasini, Mariana de Oliveira Faber e Ricardo S. Sobral Teixeira
*Instituto de Química,
Universidade Federal do Rio de Janeiro*

Ayla Sant’Ana da Silva e Viridiana S. Ferreira-Leitão
*Laboratório de Biocatálise,
Instituto Nacional de Tecnologia*

Matéria publicada em 27.09.2021

COMENTÁRIOS

Envie um comentário

[Conectado como Josena Lima.](#) [Sair?](#)

Escreva seu comentário

Enviar comentário

MAIS MATÉRIAS DESTA EDIÇÃO





[INFINITAS POSSIBILIDADES](#) - [EDIÇÃO 380](#)

[Um guia para usar sambas-enredo nas aulas de história](#)

Dissertação premiada ensina como usar composições das escolas de samba para estimular a produção de conhecimento e o pensamento crítico entre alunos do ensino básico

[Veja mais publicações](#)

MATÉRIAS RELACIONADAS



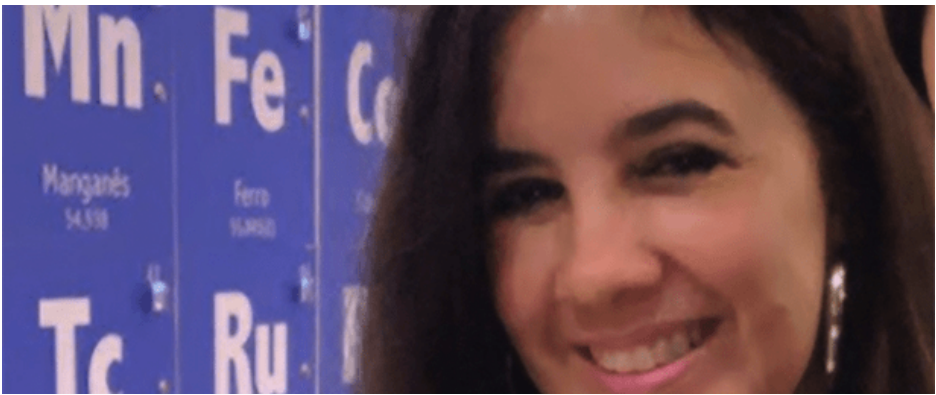
[ARTIGO](#) - [EDIÇÃO 379](#)



[Como as cobras perderam suas patas?](#)

A união entre o estudo de fósseis e da morfologia de animais vivos e a engenharia genética permitiu desvendar os mecanismos que levaram esses animais rastejantes a perderem seus membros inferiores e posteriores durante seu processo evolutivo

[Veja mais publicações](#)

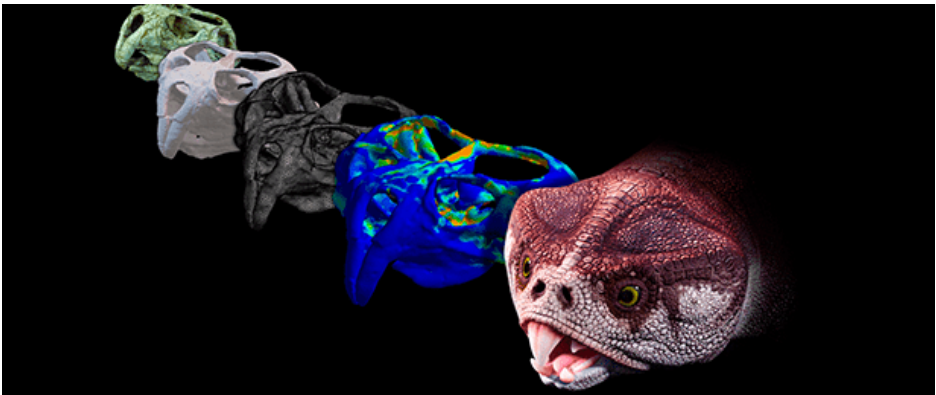


[MULHERES NA CIÊNCIA](#) - [EDIÇÃO 380](#)



[Uma ligação covalente com a ciência](#)

Realizada no ensino e na pesquisa de novas moléculas para os mais diferentes fins, professora do departamento de química da UFMG considera que o conhecimento traz a sensação de poder infinito



[ARTIGO](#) - [EDIÇÃO 379](#)



[‘Parque dos dinossauros’ em ambiente virtual](#)

Ferramentas de digitalização e computação gráfica têm revolucionado a paleontologia, revelando, a partir de fósseis, hábitos, comportamentos e outras características de animais extintos da face da Terra há milhões de anos



Prêmios

Bolsa Faperj Nota 10



Programa Doutorado Nota 10 – 2023.1

Bolsista	Orientador	Coordenador	Curso	Instituição
Marina Boaretto Ferreira	Cláudio Rezende Ribeiro	Rodrigo Cury Paraizo	Programa de Pós-Graduação em Urbanismo	UFRJ
Marina Cristina Tomasini	Viridiana Santana Ferreira Leitão	Monica Ferreira Moreira Carvalho Cardoso	Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (IQ)	UFRJ
Marina Lopes Duarte	Margareth Maria de Carvalho Queiroz	Paulo Sergio D'andrea	Programa de Pós Graduação em Biodiversidade e Saúde	FIOCRUZ
Matheus Müller Pereira da Silva	Laurent Emmanuel Dardenne	Sandra Mara Cardoso Malta	Programa de Pós-Graduação em Modelagem Computacional	LNCC
Matheus Vitorino Machado	San Romanelli Assumpcao	San Romanelli Assumpcao	Programa de Pós-Graduação em Ciência Política	UERJ
Mattheus Torquato	Ronaldo Sergio de Biasi	Andersan Dos Santos Paula	Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais	IME
Michel Misse Filho	Mariana Cavalcanti Rocha dos Santos	Palloma Valle Menezes	Programa de Pós-Graduação em Sociologia	UERJ
Murilo Alberto Martins Silva	Beatriz dos Santos Feres	Ivo da Costa do Rosário	Programa de Pós-Graduação em Estudos de Linguagem (Linguística)	UFF
Natalia Kleinsorgen Bernardo Borges	Carla Baiense Felix	Pablo Nabarrete Bastos	Programa de Pós-Graduação em Mídia e Cotidiano	UFF
Natercia Almeida Lacerda	Marcia Dos Santos Machado Vieira	Eliete Figueira Batista da Silveira	Programa de Pós-Graduação em Letras (Letras Vernáculas)	UFRJ



Certificamos que

Marina Tomasini

recebeu o prêmio de menção honrosa para o Doutorado na área de agricultura e meio ambiente, pelo trabalho intitulado: "Avaliação do efeito da temperatura e do pH inicial na produção de hidrogênio a partir da vinhaça de cana-de-açúcar" no evento: Comemoração dos 60 anos do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, realizada nos dias 08 e 09 de novembro de 2022.

09 de novembro de 2022

Mônica Ferreira Maria Corvelho Cardoso

MÔNICA FERREIRA MOREIRA

Coordenadora do PPGBq
Instituto de Química - UFRJ

Márcia R. S. da Silva

MÁRCIA R. SOARES DA SILVA

Vice-Coordenadora do PPGBq
Instituto de Química - UFRJ



**X ENCONTRO DA ESCOLA
BRASILEIRA DE QUÍMICA VERDE**

Escola Brasileira de Química Verde

Certificado

Certificamos que Marina Cristina Tomasini foi contemplada com o 1º lugar do Prêmio Professor Arikerne Rodrigues Sucupira apresentando no **X Encontro da Escola Brasileira de Química Verde** o trabalho "Avaliação da produção de hidrogênio a partir da fração hemicelulósica de palha de cana-de-açúcar por processo mesofílico e termofílico", com carga horária de 8 horas, realizado de forma remota (virtual) no dia 10 de novembro de 2021.

Rio de Janeiro, 10 de novembro de 2021

Peter Rudolf Seidl
Peter Rudolf Seidl
Coordenador



Internacionalização



Certificamos que

MARINA TOMASINI

participó del curso teórico práctico

URU13 – Desarrollo y aplicaciones de herramientas biocatalíticas, realizado en modalidad presencial en Montevideo, Uruguay, en la Facultad de Química de la Universidad de la República (Udelar), desde el 28 de octubre al 01 de noviembre de 2024.



Dra. Mariela Bollati
Directora CABBI Uruguay



Dra. Luciene Bottentuit López Balottin
Directora Latinoamericana



Dra. Victoria Bonnacarrère
Directora de Escuela CABBI Uruguay



Curso: URU13 – Desarrollo y aplicaciones de herramientas biocatalíticas
Coordinadoras: Dras. Paula Rodríguez, Larissa Gioia, Agustina Vila
Forma de Evaluación: Individual – Presentación oral y escrita
Carga Horaria: 40 horas (18 h teórico y 22 h práctico)
Nota: 10.0 / 10.0

PROGRAMA

TEÓRICO

- Introducción a la Biotransformación: Aplicación de procesos biocatalíticos; ventajas y relación con la Química Verde; uso de células enteras y enzimas aisladas.
- Búsqueda de nuevos biocatalizadores: Aislamiento de fuentes naturales. Métodos dependientes e independientes de cultivo.
- Microorganismos recombinantes y sistemas de expresión: Microorganismos recombinantes, utilidad y aplicaciones. Genes y clonado. Expresión de proteínas. Sistemas de expresión: vectores y huéspedes. Construcción de vectores de expresión. Aplicaciones y ejemplos.
- Inmovilización de enzimas: Principales estrategias para desarrollar biocatalizadores inmovilizados. Principios fundamentales y aplicaciones en diversos procesos biotecnológicos tanto en medio acuoso como en presencia de co-solventes orgánicos. Importancia del soporte y la química de inmovilización, su impacto en las propiedades del biocatalizador.
- Inmovilización covalente reversible de enzimas: Fundamento, ventajas y particularidades del método de inmovilización. Obtención del soporte activado en base a óxidos de disulfuro. Tratamientos pre-inmovilización de las proteínas.
- Escalado de bioprocesos: Etapas de un bioproceso. Requerimientos según el tipo de biocatalizador y el tipo de producto a obtener. Parámetros cinéticos y de productividad asociados al proceso. Biorreactores (geometrías y modos de operación). Consideraciones y etapas desde el laboratorio a la planta industrial.
- Oxidorreductasas: oxigenasas y lacasas. Fundamentos de oxidorreducciones enzimáticas, importancia de oxidaciones, origen de estas enzimas, mecanismos de reacción, ejemplos y aplicaciones.
- Síntesis enzimática de aminas quirales: Introducción, tipos de enzimas, estado del arte de aplicaciones enzimáticas a la síntesis de aminas, ejemplo de investigación de grupos científicos de Latinoamérica, perspectiva a futuro y nuevas tendencias.
- Procesos concurrentes: sistemas enzimáticos en cascada. Combinación de biotransformación con otros tipos de catálisis: catálisis metálica, organocatálisis, fotocatalisis
- Taller: "La biotransformación del futuro". La biotransformación de hoy ya está establecida, pero ¿qué vamos a necesitar en un escenario futuro?

PRÁCTICO

- Construcción de un biocatalizador recombinante: transformación de células competentes con plásmido puro y selección de los clones correspondientes.
- Escalado del bioproceso utilizando el biocatalizador recombinante.
- Biotransformación con enzimas aisladas: Determinación de actividad enzimática. Obtención y caracterización de un derivado inmovilizado mediante el método covalente reversible. Aplicación de lacasa inmovilizada en degradación de contaminantes.
- Uso de herramientas bioinformáticas para búsqueda y optimización de biocatalizadores: modelado por homología, alineamiento de secuencias y estudio de sitios activos para diseño racional de mutantes, estudios de superposición de modelos.