

PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO A PARTIR DE LA CODIGESTIÓN DE RESIDUO DE CORTE DE CAÑA DE AZÚCAR Y VINAZAS

5

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con el campo técnico de la ingeniería química, en especial, con procesos de generación de hidrógeno a partir de residuos agroindustriales.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

En los últimos años, las fuentes de energía renovables están cobrando cada vez más importancia debido a los compromisos medioambientales de los países con la limitación de las emisiones de carbono. Entre las fuentes de energía para la transición energética hacia una economía sin carbono, el hidrógeno se ha clasificado como uno de los combustibles más prometedores y limpios debido a su alto contenido energético por unidad de masa (142 kJ/g) y a la producción de agua como producto de su oxidación (Hay et al., 2013).

El hidrógeno puede producirse por varios métodos, como el refinado de gas natural, la electrólisis del agua, la pirólisis de biomasa y procesos biológicos como la biofotólisis por algas verdes, la fotofermentación por cianobacterias y la fermentación oscura (FO) por bacterias anaerobias estrictas o facultativas (Guo et al., 2010)

La digestión anaerobia (DA) es un proceso biológico ampliamente utilizado en la producción de biogás a partir de residuos biogénicos e implica un mínimo de dos fases de reacciones biológicas, la acidogénesis (o FO) y la metanogénesis. En la primera fase, las bacterias acidogénicas hidrolizan la materia orgánica en compuestos más simples (carbohidratos, lípidos, aminoácidos) y producen gas hidrógeno (H₂), dióxido de carbono (CO₂) y ácidos orgánicos como el ácido acético, el ácido propiónico y el ácido butírico como subproductos metabólicos, mientras que en la metanogénesis, los metanógenos consumen hidrógeno y ácido acético para producir metano (Ghimire, Frunzo, Pirozzi, et al., 2015; Massé et al., 2011; Nayal et al., 2016; Rao et al., 2010).

Se han realizado diferentes estudios para investigar la aplicación de la DA en entornos rurales y evaluar su potencial como solución energética sostenible (Ferrer et al., 2011; Garfí et al., 2011). Aunque no hay muchos avances en el caso de la

FO, también se conoce en el estado de la técnica que la DA puede dirigirse hacia la FO manipulando parámetros operativos como el pH, el tiempo de retención e inhibiendo la metanogénesis (Monlau et al., 2013).

En los últimos años, ha crecido el interés por mejorar la producción de biohidrógeno mediante técnicas simples (optimización de la relación carbono/nitrógeno (C/N), pH y temperatura) y complejas (inmovilización bacteriana, nanotecnología, ingeniería genética) (Goveas et al., 2024). Una metodología muy utilizada en la FO para mejorar la producción de H₂ es la aplicación de técnicas de pretratamiento del inóculo. El método más utilizado es el pretratamiento por choque térmico (PCT), que consiste en calentar los lodos a temperaturas entre 80-121 °C durante un tiempo de exposición de 10-120 minutos. Esta práctica retrasa el tiempo de proliferación de los metanógenos (Ghimire, Frunzo, Pontoni, et al., 2015; Mahata et al., 2020; Mohammadi et al., 2011).

Además, en los casos en los que el sustrato empleado en la FO carece de una concentración sustancial de carbohidratos, se puede aplicar una estrategia complementaria conocida como codigestión, que consiste en la unión de dos o más sustratos, generalmente residuos biogénicos de diferente composición, para aumentar la proporción de sustratos útiles en el proceso y mejorar así la relación C/N (Sen et al., 2016; Zhou et al., 2013).

Actualmente, la necesidad de implementación de procesos circulares y de cero residuos motiva la aplicación de alternativas de valorización como la utilización de procesos anaerobios para la producción de energía. Algunos residuos son de gran interés debido a su potencial de valorización y volúmenes de generación, tales como residuos de alimentos, aguas residuales y residuos de cultivos de trigo, maíz, arroz y caña de azúcar (Ghimire, Frunzo, Pirozzi, et al., 2015; Guo et al., 2010).

El residuo agrícola de cosecha (RAC) es un residuo fibroso y heterogéneo compuesto en su mayor parte por residuos vegetales, tallos y hojas (secas, verdes y puntas) y representa aproximadamente el 15,6% de la cosecha de caña de azúcar (Carvalho et al., 2017; Tomasini et al., 2023). Aunque parte de este residuo se utiliza para preparar el suelo, cerca del 50% (en algunos casos el 100%) se deja en el campo para alimentar al ganado o se suele quemar, aumentando las emisiones de CO₂ y material particulado en las zonas rurales, desaprovechando el potencial de este residuo lignocelulósico (Sindhu et al., 2011; Tomasini et al., 2023).

Uno de los usos biotecnológicos del RAC es como fuente de carbono para procesos de fermentación. Sin embargo, debido a la naturaleza recalcitrante de este residuo, es necesario un pretratamiento de hidrólisis para romper la compleja interacción entre las fracciones lignocelulósicas (Sindhu et al., 2016). El Pretratamiento de Ácido Diluido (PAD) es uno de los más utilizados para conseguir una alta solubilización de la hemicelulosa y un alto rendimiento en la deconstrucción de la

celulosa (Alvira et al., 2010; Hu & Ragauskas, 2012). El PAD consiste en la utilización de una solución ácida diluida, preferentemente de ácido sulfúrico, con una concentración inferior al 4% en peso y en un rango de temperatura de 120-210°C, con un tiempo de tratamiento entre 5 y 90 minutos (Hu & Ragauskas, 2012).

- 5 A su vez, la vinaza de la caña de azúcar es un subproducto de la industria del azúcar-etanol, caracterizado por ser una suspensión ácida, con alto contenido orgánico, olor desagradable y color marrón oscuro (Reis & Hu, 2017). En este sector, la fertilización y la irrigación con vinaza diluida se practican ampliamente. Sin embargo, la infiltración de este residuo en los suelos y cuerpos de agua conduce a
- 10 afectaciones medio ambientales como la salinización e inestabilidad del suelo, la acidificación permanente de las fuentes de agua y la propagación de insectos (Carrilho et al., 2016).

Entre los tratamientos utilizados para reducir el impacto ambiental de la vinaza se encuentran los fisicoquímicos (coagulación/floculación, electrocoagulación,

15 adsorción, oxidación avanzada y procesos de membrana), térmicos (evaporación/combustión) y biológicos (aeróbicos y anaeróbicos). En particular, los tratamientos biológicos captaron la atención por su valorización mediante la producción de biogás y, por lo tanto, como fuente de bioenergía (Mikucka & Zielińska, 2020).

- 20 En la literatura de patentes se observa la solicitud CN116590350, la cual, divulga un método para producir hidrógeno utilizando FO de biomasa seleccionada de paja de maíz, paja de trigo, paja de sorgo y bambú. Dicho método comprende los siguientes pasos operativos: (1) preparación de disolvente eutéctico; (2) pretratamiento de la paja y reciclaje de disolvente eutéctico; (3) hidrólisis enzimática
- 25 de la muestra sólida; (4) producir hidrógeno mediante FO. La invención utiliza trazas de ácido o catálisis alcalina para cooperar con un disolvente eutéctico para el pretratamiento de la paja, elimina la lignina de la paja, retiene los carbohidratos y se degrada en monosacárido fermentable mediante hidrólisis enzimática. El monosacárido se utiliza para llevar a cabo una FO para producir hidrógeno por
- 30 *Enterobacter aerogenes*.

Aunque la vinaza y el RAC han sido ampliamente exploradas como sustratos individuales para la realización de procesos de FO (Fuess et al., 2018; Magrini et al., 2021; Tomasini et al., 2023), la investigación sobre la codigestión de estos residuos es notablemente escasa.

- 35 De acuerdo con el estado de la técnica citado, la presente invención aporta una solución a la problemática asociada a la generación de hidrógeno a partir de la codigestión de vinaza y RAC como sustratos de bajo costo en un proceso de FO, susceptible de aplicación en instalaciones de baja sofisticación como en zonas rurales y remotas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION.

La presente invención revela un procedimiento para la generación de biohidrógeno a partir de una adecuada relación de codigestión de residuos agrícolas, esto es, la
5 codigestión de RAC de caña de azúcar y vinaza de caña de azúcar en un proceso de FO.

En el desarrollo del proceso de FO se emplean diferentes concentraciones de vinaza de caña y relaciones volumétricas de vinaza/hidrolizado de hemicelulosa junto con un inóculo (lodos microbianos) pretratado térmicamente. En la modalidad
10 preferida de realización, la concentración de vinaza de caña de azúcar se encuentra en soluciones diluidas al 5, 10 y 15% v/v;

En la modalidad preferida de realización, los lodos microbianos se someten a un sustrato compuesto por Vinaza de caña de azúcar e hidrolizado de hemicelulosa (HH) como fracción líquida, con las siguientes relaciones: 70/30; 50/50; 30/70;

15 El método sencillo y asequible objeto de la presente invención aceleraría la generación de hidrógeno en regiones aisladas sin incurrir en los gastos asociados con los instrumentos de medición tradicionales, al tiempo que constituye una solución prometedora para la valorización de la biomasa, contribuyendo al avance de las iniciativas rurales de energía verde en áreas remotas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS.

Figura 1. Esquema de una modalidad de realización del montaje experimental para el desarrollo del proceso de FO y el sistema de detección de hidrógeno donde se
25 ejemplifican diferentes equipos que pueden involucrarse en el desarrollo del proceso.

Figura 2. Muestra la tasa de detección de hidrógeno a partir de un inóculo (lodos microbianos) pretratado térmicamente alimentado con un sustrato compuesto por vinaza de caña de azúcar e hidrolizado de hemicelulosa (HH): (a) relación volumétrica de 3:1 (vinaza de caña de azúcar/HH) y vinaza de caña de azúcar
30 diluida al 15% del original; (b) relación volumétrica de 3:1 (vinaza de caña de azúcar/HH) y vinaza de caña de azúcar diluida al 5% del original; (c) relación volumétrica de 1:1 (vinaza de caña de azúcar/HH) y vinaza de caña de azúcar diluida al 10% del original; (d) relación volumétrica de 1:3 (vinaza de caña de azúcar/HH) y vinaza de caña de azúcar diluida al 5% del original; (e) relación
35 volumétrica de 1:3 (vinaza de caña de azúcar/HH) y vinaza de caña de azúcar diluida al 15% del original.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION.

La presente invención revela un procedimiento para la producción de biohidrógeno a partir de la codigestión de RAC de caña de azúcar y vinaza de caña de azúcar como sustratos de bajo costo en un proceso de FO.

La descripción de la realización de la presente invención no pretende limitar su alcance, sino servir como un ejemplo particular de la misma. Se espera que una persona versada en la materia comprenda que las modalidades equivalentes no se apartan del espíritu y alcance de la presente invención en su forma más amplia.

Dentro del contexto de la presente descripción, el término “lodos microbianos” debe entenderse como el material residual obtenido como consecuencia del tratamiento de las aguas residuales urbanas e industriales, en especial, aguas residuales obtenidas del tratamiento de las PTAR’s.

El procedimiento para la producción de biohidrógeno objeto de divulgación en la presente descripción comprende el desarrollo de las siguientes etapas:

- Pretratar RAC de caña de azúcar con ácido diluido en solución;
- Obtener hidrolizado de hemicelulosa (HH) como fracción líquida;
- Someter el hidrolizado de hemicelulosa (HH) a filtración al vacío, ajustando su pH, preferiblemente, utilizando una solución de base fuerte, más específicamente, de NaOH 1N;
- Preferiblemente, el hidrolizado de hemicelulosa (HH) filtrado se almacena en el refrigerador a 4 °C;
- Proveer soluciones diluidas de vinaza de caña de azúcar al 5, 10 y 15% v/v utilizando agua destilada como solvente;
- Someter lodos microbianos a diferentes concentraciones de sustrato **Vinaza-HH** con fines de adaptación a la vinaza.
- Alimentar el inóculo constantemente con sustrato vinaza-HH;
- Someter a un pretratamiento de choque térmico;
- Someter el sustrato a FO, donde el sustrato presenta concentraciones de relación volumétrica vinaza de caña/HH entre 1:3 y 3:1. Ver ítem 1.4.

La vinaza de la caña de azúcar contiene inhibidores (polifenoles) que, a altos niveles de concentración, pueden afectar negativamente a la actividad metabólica del consorcio bacteriano (Freitas et al., 2018). Esto enfatiza la importancia de determinar un nivel de dilución apropiado para alcanzar un equilibrio entre la reducción de inhibidores y el suministro de nutrientes esenciales para la producción eficiente de biohidrógeno.

La vinaza de caña de azúcar se obtuvo de una destilería con una concentración inicial de ~33 °Brix. El RAC utilizado fue obtenido de un ingenio azucarero, mientras que el inóculo y las aguas residuales utilizadas como sustrato en la fase de adaptación se recogieron de una Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR).

Los ejemplos que se describen a continuación son presentados con el objetivo de describir los aspectos preferidos de la invención, pero no constituyen una limitación al alcance de esta.

1.1. Pretratamiento del RAC

El RAC se reduce a un tamaño aproximado de 3-5 cm utilizando un molino de cuchillas, seguido de un pretratamiento con ácido diluido, aproximadamente, a 120 °C durante 60 minutos en un recipiente cerrado, sin agitación. Durante el proceso de pretratamiento, se emplea una solución de H₂SO₄ entre 1 a 3 %, preferiblemente al 1.5% (v/v) en una proporción sólido-líquido entre 1:5 y 1:10 (g/mL). Tras el pretratamiento con ácido diluido, la fracción líquida obtenida, denominada hidrolizado de hemicelulosa (HH), se somete a filtración al vacío, su pH se ajusta a 5.0 utilizando una solución de NaOH 1N, y, preferiblemente, se almacena en el refrigerador a 4 °C.

1.2. Vinaza

Se preparan soluciones diluidas al 5, 10 y 15% v/v de la concentración original de la vinaza (~33 °Brix inicial) utilizando agua destilada como solvente.

1.3. Adaptación del inóculo

El inóculo es un lodo microbiano proveniente de una PTAR. El lodo se somete progresivamente a diferentes concentraciones de sustrato con fines de adaptación a la vinaza. Las concentraciones correspondientes se muestran en la **Tabla 1**. Se realizan mediciones de demanda química de oxígeno (DQO) el primer día y cuatro días después de la alimentación inicial de sustrato (kits HI93754B-25, Hanna Instruments, Venecia, Italia); se considera que una reducción del 60% de la DQO inicial es una medida adecuada para sustituir los sustratos iniciales por sustratos más ricos en vinaza-HH (Barrera et al., 2024).

Relación Aguas residuales/ Vinaza-HH	DQO inicial (g DQO/L)
70/30	13.8
50/50	21.9
30/70	28.4
0/100	41.1

Tabla 1. Concentraciones de sustrato utilizadas en la adaptación del inóculo.

Una vez finalizada la fase de adaptación, el inóculo se alimenta constantemente con sustrato rico en vinaza-HH, y antes de ser utilizado en el proceso de FO, se somete a un pretratamiento de choque térmico (PCT), preferiblemente a 121 °C durante 20 min en autoclave para retrasar el tiempo de emergencia de los metanógenos.

5 **1.4. Fermentación oscura, producción y detección de biohidrógeno**

En la **Tabla 2** se indican las concentraciones de sustrato utilizadas en el proceso de FO. El pH de cada sustrato se ajustó a 6.0 con una solución de Na₂HPO₄ 1N.

Dilución de Vinaza (%)	Relación Volumétrica Vinaza de caña/HH	Concentración promedio del sustrato (g DQO/L)
5	1:3	8.9
5	3:1	13.5
10	1:1	18.9
15	1:3	18.7
15	3:1	38.6

Tabla 2. Concentraciones de sustrato utilizadas en la FO.

- 10 El montaje experimental se coloca en un ambiente cerrado, preferiblemente a una temperatura constante de 27 °C. En una modalidad de realización del método, se emplea un matraz ámbar de 500 mL como reactor discontinuo, se ajusta la tapa del matraz para canalizar la salida del gas y se conecta una manguera que transporta el gas a un sistema de detección de hidrógeno y almacenamiento de datos. La
- 15 medición en línea se puede realizar utilizando un sensor de hidrógeno de bajo costo de la serie MQ-8 (precalentado durante 6 h), una placa Arduino Leonardo y un ordenador. Se utilizó una columna de agua para aplicar presión hidrostática al gas y mejorar la detección. En la **Figura 1** se muestra el montaje experimental para la FO y detección de hidrógeno.
- 20 Los análisis y métodos utilizados en la caracterización de la vinaza inicial se detallan en la **Tabla 3**. *Conceição et al.* demostraron que la vinaza cruda de caña de azúcar dificulta el crecimiento del consorcio bacteriano en comparación con la vinaza diluida (Conceição et al., 2023). Por lo anterior, se prepararon soluciones diluidas a 5, 10 y 15% v/v de la concentración original utilizando agua destilada como solvente.
- 25 Durante el proceso de FO, se añadieron 200 mL de sustrato y 100 mL de inóculo pretratado al reactor, se agitó a 90 rpm y se monitoreó durante 6 días. Los datos de concentración de hidrógeno proporcionados por el sensor se registraron en el

ordenador. Por último, se verificó el nivel de agua en el cilindro durante los 6 días del experimento. Cada experimento se realizó por triplicado.

Para evaluar la precisión y la repetibilidad, se midieron repetidamente cinco muestras discretas de concentraciones diferentes y conocidas, espaciadas 0,5 h (n = 11 veces). La rapidez de respuesta y la estabilidad de la medición proporcionada por el sensor MQ-8 se comprobaron registrando los tres primeros valores devueltos por el sensor; además, el valor medio se consideró como el único punto de datos.

Para cada muestra estadística de mediciones formada por los n = 11 puntos de datos, se calcularon las siguientes métricas estadísticas: media, desviación estándar, coeficiente de variación (CV), error estándar (EE), raíz del error cuadrático medio (RECM) y error de sesgo medio (ESM), tal y como aplicaron previamente Abhiram et al. en la validación de un lisímetro (Abhiram et al., 2023). Las métricas de error permitieron evaluar la precisión global de las predicciones del sensor frente al método de referencia. Se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) al nivel de significancia del 5% en la evaluación de las diferencias de concentración para dos muestras formadas por n = 11 mediciones. La prueba de hipótesis se realizó bajo la hipótesis nula de igualdad de medias, evaluando así el significado estadístico de las mediciones. Además, el CV sirvió como indicador de la precisión y estabilidad de las mediciones del sensor.

El análisis de la vinaza de caña de azúcar reveló un valor de DQO de 228.220 mg O₂/L. Esta elevada carga orgánica suele provocar un aumento de la competencia microbiana por los recursos. En la FO, donde se desea que microorganismos específicos tengan la mayor actividad metabólica para la producción de biohidrógeno, una alta concentración de DQO podría perturbar la dinámica de la comunidad microbiana. Esta posible alteración puede conducir a la inhibición del crecimiento, a la disminución de la actividad metabólica y a bajos rendimientos de producción (Pouresmaeil et al., 2019).

Además, la vinaza de caña de azúcar mostró una alta concentración de polifenoles, que son tóxicos para los microorganismos anaerobios (Freitas et al., 2018). Así, la dilución de la vinaza de caña de azúcar contribuyó a reducir la concentración de inhibidores y la carga orgánica del sustrato, conduciendo a un ambiente más favorable para la FO.

Sin embargo, el uso de concentraciones excesivamente bajas de vinaza de caña de azúcar puede dificultar el crecimiento bacteriano debido a una cantidad insuficiente de fuentes de carbonos. Esto subraya la necesidad de encontrar un nivel óptimo de dilución para encontrar un equilibrio entre la reducción de inhibidores y el suministro de nutrientes esenciales para la producción eficiente de biohidrógeno. La caracterización de la vinaza de caña inicial se muestra en la **Tabla 3**.

Análisis	Método	Unidades	Resultados
Cenizas	AOAC 942.05 [35]	% Peso	8.16
Nitrógeno Total	AOAC 981.10 [35]	% Peso	0.5
Azúcares Totales	Lane Eyn [36]	% Peso	27.73
Carbono Orgánico Total (COT)	Método Estándar 5310 B	mg C/L	129,835.20
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	Combustión a alta temperatura [37] Método Estándar ED 23/5220 C - Reflujo cerrado - Volumétrico [37]	mg O ₂ /L	228,220
Sólidos Totales	Gravimetría	% Peso	29.90
Polifenoles Totales	Folin–Ciocalteu [38]	% Peso	1.61

Tabla 3. Caracterización de la vinaza de caña de azúcar inicial.

En la Figura 2 se muestran los tiempos medios (de 3 réplicas) de producción de hidrógeno durante el proceso de codigestión a diferentes concentraciones de vinaza de caña de azúcar y proporciones volumétricas de vinaza de caña de azúcar/HH.

Todos los gráficos muestran pequeñas perturbaciones en los datos, lo que sugiere el bajo RECM calculado para cada experimento. Las variaciones en línea de los datos de concentración de hidrógeno están directamente relacionadas con las oscilaciones de las señales transmitidas por el sensor y no con la dinámica de la FO. El sistema de desplazamiento de agua, esquematizado en la Figura 1, es esencial para la medición del hidrógeno, ya que contribuye a mantener la presión aproximadamente constante en la línea (1.2 kPa) y, por tanto, a la detección y el registro de la concentración de hidrógeno.

Los experimentos expuestos en la Figura 2 b,d,e mostraron una fase de retardo similar de ~20 h asociada a la producción de biohidrógeno, que concuerda con los resultados de estudios anteriores que empleaban reactores discontinuos (Logan et al., 2002; Sharma & Li, 2009; Wicher et al., 2013).

La Figura 2c presenta una fase de latencia más corta en comparación con la Figura 2b a pesar de tener concentraciones de sustrato similares. Cuando se utilizan altas concentraciones de vinaza, mayores concentraciones de polifenoles inhiben el crecimiento bacteriano, retrasando así el inicio de la FO (Daglia, 2012). Este efecto de inhibición se observa claramente en la Figura 2a, donde los experimentos con la concentración más alta de vinaza de caña de azúcar y la relación vinaza de caña de azúcar/HH condujeron a fases de latencia pronunciadas (más de 40 h).

En consecuencia, se observa que una mayor concentración de vinaza de caña conduce a una mayor presencia de inhibidores en la FO, lo que resulta en una fase de retardo más larga, lo cual, es solucionado por el método objeto de divulgación.

A su vez, el procedimiento para la generación de hidrógeno a partir de la codigestión de RAC y vinazas de caña de azúcar mediante FO también ofrece una solución para

el control de los procesos de valorización de residuos orientados a la producción de biohidrógeno, especialmente relevante para las zonas rurales, donde los recursos de la agroindustria están disponibles pero la accesibilidad de los equipos es muy limitada. Por lo anterior, el método objeto de la presente invención no sólo reduce

5 el impacto ambiental generado en relación con la eliminación de residuos agroindustriales, sino que también alinea la industria de la caña de azúcar con prácticas sostenibles, garantizando un futuro más verde y ecológico para el sector.

En este caso, la implementación del presente método de codigestión, como alternativa de tratamiento de residuos, favorece la sostenibilidad de la industria de

10 la caña de azúcar. En efecto, al emplear eficientemente estos residuos para producir productos de valor añadido, como el hidrógeno, las industrias pueden establecer un sistema sostenible de gestión de residuos al tiempo que generan ingresos adicionales.

15 Aunque la presente invención ha quedado descrita con las realizaciones preferentes mostradas, queda entendido que las modificaciones y variaciones que conserven el espíritu y el alcance de esta invención se entienden dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

20

25

30

REFERENCIAS

- 5 Abhiram, G., McCurdy, M., Davies, C. E., Grafton, M., Jeyakumar, P., & Bishop, P. (2023). An innovative lysimeter system for controlled climate studies. *Biosystems Engineering*, 228, 105–119. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2023.03.005>
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., & Negro, M. J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4851–4861. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>
- 10
- Barrera, A., Gómez-Ríos, D., & Ramírez-Malule, H. (2024). Assessment of a Low-Cost Hydrogen Sensor for Detection and Monitoring of Biohydrogen Production during Sugarcane Straw/Vinasse Co-Digestion. *AgriEngineering*, 6(1), 479–490. <https://doi.org/10.3390/agriengineering6010029>
- 15
- Carrilho, E. N. V. M., Labuto, G., & Kamogawa, M. Y. (2016). Destination of Vinasse, a Residue From Alcohol Industry: Resource Recovery and Prevention of Pollution. In *Environmental Materials and Waste: Resource Recovery and Pollution Prevention*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803837-6.00002-0>
- 20
- Carvalho, J. L. N., Nogueirol, R. C., Menandro, L. M. S., Bordonal, R. de O., Borges, C. D., Cantarella, H., & Franco, H. C. J. (2017). Agronomic and environmental implications of sugarcane straw removal: a major review. *GCB Bioenergy*, 9(7), 1181–1195. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12410>
- 25
- Conceição, G. R., da Silva, C. S., do Vale, T. O., dos Santos, J. N., Matos, J. B. T. L., Almeida, P. F. d., & Chinalia, F. A. (2023). Culture operational strategies for the production of methane and algal oil using ethanol vinasse effluent. *Journal of Applied Phycology*, 35(5), 2135–2149. <https://doi.org/10.1007/s10811-023-03019-7>
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.007>
- 30
- Ferrer, I., Garfí, M., Uggetti, E., Ferrer-Martí, L., Calderon, A., & Velo, E. (2011). Biogas production in low-cost household digesters at the Peruvian Andes. *Biomass and Bioenergy*, 35(5), 1668–1674. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.12.036>
- Freitas, P. V., Da Silva, D. R., Beluomini, M. A., Da Silva, J. L., & Stradiotto, N. R. (2018). Determination of Phenolic Acids in Sugarcane Vinasse by HPLC with Pulse Amperometry. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4869487>
- 35
- Fuess, L. T., Ferraz, A. D. N., Machado, C. B., & Zaiat, M. (2018). Temporal dynamics and metabolic correlation between lactate-producing and hydrogen-producing bacteria in sugarcane vinasse dark fermentation: The key role of lactate. *Bioresource Technology*, 247(September 2017), 426–433. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.121>
- 40
- Garfí, M., Gelman, P., Comas, J., Carrasco, W., & Ferrer, I. (2011). Agricultural reuse of the digestate from low-cost tubular digesters in rural Andean communities. *Waste Management*, 31(12), 2584–2589. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.08.007>
- 45
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P. N. L., & Esposito, G. (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Applied Energy*, 144, 73–95. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.045>

- Ghimire, A., Frunzo, L., Pontoni, L., d'Antonio, G., Lens, P. N. L., Esposito, G., & Pirozzi, F. (2015). Dark fermentation of complex waste biomass for biohydrogen production by pretreated thermophilic anaerobic digestate. *Journal of Environmental Management*, 152, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.12.049>
- 5 Goveas, L. C., Nayak, S., Kumar, P. S., Vinayagam, R., Selvaraj, R., & Rangasamy, G. (2024). Recent advances in fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 54, 200–217. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.04.208>
- 10 Guo, X. M., Trably, E., Latrille, E., Carrère, H., & Steyer, J. P. (2010). Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(19), 10660–10673. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.008>
- 15 Hay, J. X. W., Wu, T. Y., Juan, J. C., & Md. Jahim, J. (2013). Biohydrogen production through photo fermentation or dark fermentation using waste as a substrate: Overview, economics, and future prospects of hydrogen usage. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 7(3), 334–352. <https://doi.org/10.1002/bbb.1403>
- Hu, F., & Ragauskas, A. (2012). Pretreatment and Lignocellulosic Chemistry. *Bioenergy Research*, 5(4), 1043–1066. <https://doi.org/10.1007/s12155-012-9208-0>
- 20 Logan, B. E., Oh, S. E., Kim, I. S., & Van Ginkel, S. (2002). Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers. *Environmental Science and Technology*, 36(11), 2530–2535. <https://doi.org/10.1021/es015783i>
- 25 Magrini, F. E., de Almeida, G. M., da Maia Soares, D., Fuentes, L., Ecthebehere, C., Beal, L. L., da Silveira, M. M., & Paesi, S. (2021). 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*, 11(6), 2443–2456. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00687-0>
- 30 Mahata, C., Ray, S., & Das, D. (2020). Optimization of dark fermentative hydrogen production from organic wastes using acidogenic mixed consortia. *Energy Conversion and Management*, 219(June), 113047. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2020.113047>
- Massé, D. I., Talbot, G., & Gilbert, Y. (2011). On farm biogas production: A method to reduce GHG emissions and develop more sustainable livestock operations. *Animal Feed Science and Technology*, 166–167, 436–445. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.075>
- 35 Mikucka, W., & Zielińska, M. (2020). Distillery Stillage: Characteristics, Treatment, and Valorization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 770–793.
- Mohammadi, P., Ibrahim, S., Mohamad Annuar, M. S., & Law, S. (2011). Effects of different pretreatment methods on anaerobic mixed microflora for hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent. *Journal of Cleaner Production*, 19(14), 1654–1658. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2011.05.009>
- 40 Monlau, F., Barakat, A., Trably, E., Dumas, C., Steyer, J. P., & Carrère, H. (2013). Lignocellulosic materials into biohydrogen and biomethane: Impact of structural features and pretreatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43(3), 260–322. <https://doi.org/10.1080/10643389.2011.604258>
- 45 Nayal, F. S., Mammadov, A., & Ciliz, N. (2016). Environmental assessment of energy generation from agricultural and farm waste through anaerobic digestion. *Journal of Environmental Management*, 184, 389–399. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.09.058>
- 50 Pouresmaeil, S., Nosrati, M., & Ebrahimi, S. (2019). Operating control for enrichment of hydrogen-producing bacteria from anaerobic sludge and kinetic analysis for vinasse inhibition. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(3), 103090. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103090>

- Rao, P. V., Baral, S. S., Dey, R., & Mutnuri, S. (2010). Biogas generation potential by anaerobic digestion for sustainable energy development in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(7), 2086–2094. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.03.031>
- 5 Reis, C. E. R., & Hu, B. (2017). Vinasse from sugarcane ethanol production: Better treatment or better utilization? *Frontiers in Energy Research*, 5(APR), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2017.00007>
- Sen, B., Aravind, J., Kanmani, P., & Lay, C. H. (2016). State of the art and future concept of food waste fermentation to bioenergy. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 53, 547–557. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.08.065>
- 10 Sharma, Y., & Li, B. (2009). Optimizing hydrogen production from organic wastewater treatment in batch reactors through experimental and kinetic analysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(15), 6171–6180. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.06.031>
- 15 Sindhu, R., Gnansounou, E., Binod, P., & Pandey, A. (2016). Bioconversion of sugarcane crop residue for value added products – An overview. *Renewable Energy*, 98, 203–215. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.02.057>
- Sindhu, R., Kuttiraja, M., Binod, P., Janu, K. U., Sukumaran, R. K., & Pandey, A. (2011). Dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification of sugarcane tops for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 102(23), 10915–10921. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.066>
- 20 Sindhu, R., Kuttiraja, M., Binod, P., Janu, K. U., Sukumaran, R. K., & Pandey, A. (2011). Dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification of sugarcane tops for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 102(23), 10915–10921. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.066>
- Tomasini, M., Faber, M. de O., & Ferreira-Leitão, V. S. (2023). Sequential production of hydrogen and methane using hemicellulose hydrolysate from diluted acid pretreatment of sugarcane straw. *International Journal of Hydrogen Energy*, 48(27), 9971–9987. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.11.276>
- 25 Tomasini, M., Faber, M. de O., & Ferreira-Leitão, V. S. (2023). Sequential production of hydrogen and methane using hemicellulose hydrolysate from diluted acid pretreatment of sugarcane straw. *International Journal of Hydrogen Energy*, 48(27), 9971–9987. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.11.276>
- Wicher, E., Seifert, K., Zagrodnik, R., Pietrzyk, B., & Laniecki, M. (2013). Hydrogen gas production from distillery wastewater by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(19), 7767–7773. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.04.008>
- Zhou, P., Elbeshbishy, E., & Nakhla, G. (2013). Optimization of biological hydrogen production for anaerobic co-digestion of food waste and wastewater biosolids. *Bioresource Technology*, 130, 710–718. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.069>
- 30 Zhou, P., Elbeshbishy, E., & Nakhla, G. (2013). Optimization of biological hydrogen production for anaerobic co-digestion of food waste and wastewater biosolids. *Bioresource Technology*, 130, 710–718. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.069>