

PRETRATAMIENTOS DE LA CELULOSA Y BIOMASA PARA LA SACARIFICACIÓN.

Biomass and cellulose pretreatments for saccharification

RESUMEN

La biomasa celulósica se ha vuelto un producto interesante para ser aprovechada como materia prima en la fabricación de biocombustibles, especialmente el etanol. El paso crítico en su conversión a etanol, implica la degradación de los polisacáridos a azúcares fermentables, en un proceso denominado sacarificación. La celulosa, el componente principal de la biomasa, es un polisacárido de difícil degradación en condiciones de tratamiento moderadas. Las investigaciones más recientes en el campo de los biorecursos, se han enfocado hacia el desarrollo de ciertos pretratamientos de la biomasa o la celulosa bajo los cuales se logra que estos materiales sean de más fácil degradación a azúcares fermentables. El presente artículo resume los resultados más sobresalientes, sin ser exhaustivos, de los pretratamientos de la celulosa y la biomasa para su conversión a productos fermentables por la ruta etanólica.

PALABRAS CLAVES: Biomasa, Celulosa, Pretratamientos, Sacarificación.

ABSTRACT

The cellulosic Biomass has bécame a interesting product to be used like raw material for biofuels productioning, ethanol specially. The critic step on its conversion into ethanol imply polysaccharides degradation to fermentable sugars, process that is called saccharification. The cellulose, biomass principal component, is hard to be degradeted in mild conditions. More resent researches have been focused on some kind of pretreatment of biomass o cellulose in order to obtain easy to degrade materials to fermentable sugars. This paper shows the outstanding pretreatments of cellulose and biomass for converting it, into fermentable products using ethanolic pathway.

KEYWORDS: Biomass, Cellulose, Pretreatments, Saccharification.

1. INTRODUCCIÓN

La celulosa es el compuesto orgánico de mayor abundancia [1] en la naturaleza, de gran importancia a nivel biológico y un polímero de interés industrial. Químicamente es un polímero de la D-glucosa que se unen entre sí por enlaces β -1,4; disposición que la hace estable, además de poseer enlaces de hidrógeno que une sus moléculas entre sí, confiriéndole sus conocidas propiedades como material estructural de la pared celular. Su transformación y aprovechamiento como fuente de diversos productos ha sido analizada a los largo de los años [1, 2, 4, 5, 6].

Esta molécula y sus fuentes se han hecho muy atractivos desde el punto de vista energético [7, 8], pues puede ser degradada para la obtención de glucosa y su posterior fermentación etanólica [9]. Este proceso puede resultar sencillo, sin embargo, la acción de los agentes degradantes es limitada de acuerdo al grado de ordenamiento cristalino del polímero y la severidad del tratamiento extractivo desde alguna biomasa en particular. La degradación se realiza mediante una hidrólisis ácida que suele ser de alto rendimiento, o por la acción de agregados enzimáticos con rendimientos más

discretos [10, 11,12]. En vista a que la cristalinidad juega un papel importante en la hidrólisis de este material [13, 14, 15], han sido varias las publicaciones referentes al tema en las que se hacen tratamientos específicos con el objeto de incrementar las regiones amorfas del material que son de más fáciles de convertir en glucosa o en otros azúcares fermentables [14, 16, 17, 18]. Existen dos tipos principales de pretratamientos, el primero se inicia en el propio material lignocelulósico, mientras que el segundo inicia en el tratamiento de la pulpa celulósica o de la celulosa con alto grado de pureza.

Los materiales lignocelulósicos están integrados principalmente de tres constituyentes poliméricos: la celulosa, hemicelulosas (que en conjunto se les llama holocelulosa) y lignina los cuales están asociados los unos con los otros y son los que finalmente sirven de soporte estructural a la pared celular.

La celulosa es un homopolímero polidisperso consistente en uniones glicosídicas β -1,4, regio y enantioselectivas de unidades de D-glucopiranososa. Para efectos de representación estructural y descripción de sus propiedades químicas, la celulosa puede resumirse en treinta unidades de dehidroglucosa [19]. Cada cadena de celulosa está ligada a otras mediante enlaces de

ANDERSON GUARNIZO FRANCO

Químico.
Profesor Asistente
Universidad del Quindío
aguarnizo@uniquindio.edu.co

PEDRO NEL MARTÍNEZ YÉPES

Ingeniero Químico, M. Sc., Ph.D.
Profesor Titular
Universidad del Quindío

HOOVER ALBEIRO VALENCIA SÁNCHEZ

Químico
Profesor Asistente
Universidad Tecnológica de Pereira

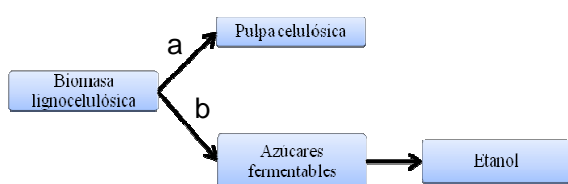


Figura 1. Pretratamientos para la preparación de azúcares fermentables.

hidrógeno que le que aportan rigidez al material. Si los enlaces de hidrógenos son pocos la celulosa se considera amorfa, mientras que una disposición especial de estos enlaces generan diferentes formas cristalinas. Así, la celulosa puede presentarse en cuatro macroestructuras cristalinas denominadas celulosa I, II, III, y IV [11, 18, 20]. La celulosa I es la que normalmente se encuentra en la pared celular. La clase II, es la más termodinámicamente estable y resulta de la recristalización de la I o de su mercerización en solución de hidróxido de sodio. Estas dos son las más importantes al considerar los pretratamientos.

Las hemicelulosas son carbohidratos que forman una estructura polimérica compleja, ramificada que consiste en la unión de diferentes unidades de azúcares: pentosas, hexosas y ácidos de estos azúcares. La hemicelulosa suele ser un polímero de menor masa molar que la celulosa y más fácilmente hidrolizable debido a su estructura predominantemente amorfa. Las hemicelulosas, al igual que la celulosa, se han perfilado como fuente de azúcares.

La lignina, es el segundo componente en abundancia, es un polímero ramificado, amorfo y heterogéneo constituido por unidades de fenilpropano (p-coumaril, coniferil and alcohol sináplico) unidos por diferentes clases de enlaces, su función en el ámbito estructural, es el de mantener unidos la celulosa y las hemicelulosas entre sí.

2. PRETRATAMIENTOS

Se le denomina pretratamiento al conjunto de acciones para mejorar el rendimiento en la obtención de azúcares fermentables desde la biomasa inicial. Cualquier mejora que se haga en los procesos mostrados debe reflejarse en un mayor rendimiento y economía en la obtención de etanol.

En general, existen dos formas de manejo de la biomasa lignocelulósica para preparación de azúcares fermentables. El primero de ellos, tiene como objeto la conversión de la biomasa lignocelulósica indirectamente, obteniéndose holocelulosa y lignina por separado (aquí se pueden incluir los productos papeleros), material que luego es degradado a un sustrato fermentable, como se ve en la fig. 1(a). En la fig. 1(b) se muestra el segundo tipo en el cual un material lignocelulósico es sometido a una digestión para obtener directamente un sustrato fermentable. Cabe destacar, que los métodos empleados

en la ruta b involucra, en la mayoría de los casos, la digestión de productos no madereros mientras que los propuestos para la ruta a, son empleados comúnmente para la digestión de maderas.

La biomasa lignocelulósica suele ser un sistema recalcitrante debido a la fuerte unión entre los constituyentes de la pared celular. Los pretratamientos están orientados hacia la modificación de la estructura supramolecular y de esta manera separar la lignina y la holocelulosa y/o la hidrólisis de la holocelulosa en azúcares fermentables. Adicionalmente, los pretratamientos pueden limitarse, simplemente, a generar un aumento de las regiones amorfas de la celulosa lo que conlleva a la mejora de la hidrólisis, lo que constituye los pretratamientos.

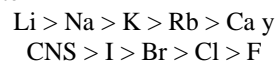
2.1. Pretratamiento de la celulosa

A la celulosa extraída de la biomasa de la cual se ha removido la mayoría de compuestos que la acompaña se le aplica un pretratamiento para reducir su cristalinidad [13, 19]. Estos pretratamientos, enmarca las metodologías tradicionales en la cual se busca la liberación y purificación de la celulosa [21]. Dentro de estas se encuentra los métodos clásicos: Kraft [22], método de la soda celulosa al clorito, al hipoclorito [4] y la clorinación [23, 24, 25]. De estos, el primero tiene aplicaciones industriales para la producción de pulpa papelera; y se ha evaluado su potencial como pretratamiento solo de forma indirecta cuando en los experimentos se usa materiales como el papel. Los otros se han empleado solamente en el laboratorio [3]. En estos tratamientos se busca la eliminación de la lignina y la hemicelulosa para dejar libre la celulosa y no la producción de azúcares por lo cual se ha buscado la integración de nuevos métodos que si lo permitan.

Una vez se ha obtenido celulosa, los pretratamientos siguientes, modifican de la estructura supramolecular de la celulosa [11,13]. Los pretratamientos de la celulosa resultarían útiles si se extiende su aplicación al aprovechamiento del papel para reciclaje o desechos con alto contenido de celulosa [11].

Pretratamientos con soluciones salinas saturadas

Los experimentos más tempranos en cuanto a la modificación supramolecular de la celulosa fueron llevados a cabo por Herzog y Beck [27] quienes encontraron que además del agua las soluciones salinas crean un efecto de hinchamiento sobre la celulosa de la manera siguiente



El hinchamiento se ha entendido como una modificación a favor de la estructura cristalina de la celulosa, por ejemplo, Tokuyasa, et al. [11] demostraron que las soluciones saturadas de CaCl_2 , una sal que provoca poco hinchamiento, incrementa el área de anclaje de enzimas celobio-hidrolasas en celulosa microcristalina, aunque no fue efectiva para celulosa de bagaso [28]. No obstante,

se demostró un incremento en la conversión de celulosa en glucosa del 43.0 %.

Pretratamientos de la celulosa con disolventes

La disolución de celulosa en diferentes solventes no se ha analizado profusamente como método de pretratamiento como tal sino más bien se ha empleado para caracterización, moldeo y la proporción de fases homogéneas [29, 30].

En general, la solubilización de la celulosa ocurre debido al rompimiento de los enlaces de hidrógeno intermoleculares [31] y la interacción resultante del agente solubilizante con la celulosa. De esta manera, aumenta las regiones amorfas. Un solvente muy conocido para la solubilización es el hidróxido de cupramonio el cual se utilizado para la determinación del peso molecular de la celulosa [32] y no propiamente como pretratamiento.

Hamilton et al. [33] usaron una mezcla de tartrato férrico e hidróxido de sodio para tal fin, mejorando la acción enzimática. Recientemente Wang, Y. et al. [31] usaron la mezcla NaOH / urea a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ con lo que lograron solubilizar el 35 % de la celulosa permitiendo una conversión a glucosa del 81%.

Considerando, que los disolventes son los que más provocan disrupción estructural de la celulosa y esto se refleja en altos rendimientos de la sacarificación [33], resultaría conveniente analizar más a fondo las posibilidades de uso como pretratamiento.

En la disolución de la celulosa se han usado líquidos iónicos [34] de carácter orgánico en solvente no acuoso. Aunque estos estudios no estaban dirigidos a la sacarificación, es interesante saber que bajo estos tratamientos, la estructura supramolecular de la celulosa es modificada al igual que lo hacen los tratamientos que usan solventes acuosos.

En el caso de líquidos orgánicos no iónicos, se ha evidenciado el efecto de inchamiento dependiendo del solvente, aunque el efecto no ha sido mayor que el causado por el agua [28]; en consecuencia, puesto a los resultados inferiores, el uso de solventes orgánicos no iónicos no mejorará los rendimientos de sacarificación.

Pretratamiento con Ácidos

Los pretratamientos clásicos implican el uso de soluciones de ácido sulfúrico diluido, usualmente al 5 % con rendimientos del 100 % a $160\text{ }^{\circ}\text{C}$, o concentrado, al 77 % a más baja temperatura [35], con lo que se logra por hidrólisis ácida, la formación de azúcares. Con los pretratamientos ácidos, además de la hidrólisis, ocurren reacciones de condensación y eliminación que llevan a la formación sustancias tóxicas para la levadura como el hidroximetilfurfural [36, 37, 38, 39]. No obstante se han propuesto pretratamientos con hidrólisis ácida parcial para la obtención de azúcares, por ejemplo, el pino (*Loblolly pine*) fue sometido a hidrólisis ácida del 75 % de conversión en madera de en azúcares fermentables, el

resto del material no degradado se llevó a hidrólisis enzimática alcanzando un 95 % de conversión global [9]. En el proceso de hidrólisis no enzimática ELA (Extremely Low Acid), se emplea alta temperatura ($205\text{ }^{\circ}\text{C}$) y concentraciones de ácido sulfúrico de 0.07 % en los cuales se alcanza una conversión de celulosa del 90 % a glucosa [40]. Este método, debido a la baja concentración de ácido, se minimiza la formación de agentes tóxicos para la levadura, sin embargo, como se puede notar, se requiere alta temperatura y presión.

A pesar de los inconvenientes descritos arriba, el pretratamiento con ácido sulfúrico aún cuenta con especial atención por ser sencillo. El conocimiento profundo de sus características termodinámicas y cinéticas siguen siendo materia de estudio [41].

2.2. Pretratamientos de la biomasa lignocelulósica

Puesto que este tipo de metodologías emplean condiciones químicas agresivas los estudios recientes se han encaminado a encontrar la manera más económica y feasible de procesar la biomasa para su sacarificación posterior [42]. El resultado de estos tratamientos es un material compuesto principalmente de celulosa, hemicelulosas y lignina en proporciones variables según la fuente natural y el método usado para su obtención. La tendencia en cuanto al desarrollo de tratamientos de la biomasa, que pueden ser aplicables a los pretratamientos de la celulosa a los que se refiere la sección 2.1. deben tener ciertas características. En primer lugar, Deben evitar la degradación de los carbohidratos a formas no fermentables o a compuestos que sean tóxicos para la levadura, para ello se debe controlar el pH y la temperatura principalmente; altos valores de pH desencadena la formación de hidroximetilfurfural (HMF), tóxico para la levadura. Por esta razón, la hidrólisis ácida a altas concentraciones no suele ser adecuada a pesar de sus altos rendimientos [43, 44]. Segundo, debe minimizar la demanda de energía. Si se usan catalizadores, su reciclado debe ser económico. Los costos generales de producción deben resultar en un balance económico y energético positivo [25]. Finalmente, por obvias razones, debe ser amigable con el medio ambiente [11].

Hasta el momento los tratamientos propuestos involucran condiciones agresivas de presión y temperatura.

En el presente documento se revisaron los pretratamientos HWL (Hot Water Liquid), AFEX (Ammonia Expansion Fiber) y ELA (Extremely Low Acid). El pretratamiento con agua líquida caliente (HWL) se lleva a cabo manteniendo el pH entre 4 y 7 a $160\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos. Este pretratamiento minimiza la producción de subproductos tóxicos para la levadura como el HMF pues maneja un pH cercano al neutro [38]. La biomasa tratada bajo esta metodología alcanza un máximo del 96% en el proceso de sacarificación que realiza la enzima. Su éxito proviene de la alta penetrabilidad que tiene el agua caliente en estado líquido y su incapacidad de solubilizar y degradar la lignina.

Los tratamientos con amónico como reactivo deslignificante de la biomasa ha sido estudiado considerando diferentes variables como presión y temperatura [45, 46, 47, 48]. El método AFEX [17, 43, 49] usa amoniaco altamente concentrado, calentado a temperaturas entre 70 y 100 °C y alta presión (150 – 400 psi). El tiempo de residencia de la biomasa suele estar entre 5 y 30 minutos. No permite la formación de subproductos tóxicos para la levadura y además, sirve como nutriente. El amoniaco reacciona con la lignina pero no con la celulosa. Con este pretratamiento se alcanza hasta un 90 % de conversión a productos fermentables. El modo de acción del amónico es aún sujeto a estudios, aunque se cree que el efecto disruptivo se logra en gran medida por la expansión violenta del material.

Con ELA, el tratamiento de la biomasa también da buenos rendimientos cerca al 100 % con los inconvenientes propiamente mencionados. Si se comparan estos resultados con los logrados por la técnica de HLW es posible establecer que el factor predominante que lleva al colapso de la estructura cristalina, en ambos casos, es la temperatura y no los agentes químicos empleados. Durante los procesos térmicos, parte de la hemicelulosa que es fácilmente hidrolizable, es transformada en ácidos y se asume que estas nuevas sustancias formadas son las encargadas de catalizar la hidrólisis de más hemicelulosa [50]. Una de las desventajas que se pueden suscitar del tratamiento térmico a alta temperatura está relacionada con el efecto que tienen estos ácidos formados, no solo en la hidrólisis de la holocelulosa, sino también en la de la lignina [51]. La hidrólisis de la lignina forma compuestos fenólicos inhibidores del desarrollo de las levaduras. Además, estos compuestos pueden condensarse con los azúcares formados provocando su precipitación [52]. Estas dificultades pueden superarse con la eliminación oportuna de las sustancias que se forman.

Otros pretratamientos

Teramoto, et al. [53] usaron un pretratamiento que involucra el uso de una mezcla de etanol, agua y ácido acético manejando temperaturas de hasta 200 °C para la sacarificación de los componentes celulósicos del eucalipto y harina de bagazo. Bajo esta investigación se obtuvieron conversiones hasta del 96.6 % como glucosa y bajo porcentaje de HMF en máximo una hora. Los compuestos orgánicos permiten una mayor penetrabilidad, a la vez que facilitan la remoción de la lignina de la biomasa, sin embargo, hay que advertir que las limitaciones que se presenta son iguales a las de todo tratamiento térmico.

Un pretratamiento con organosolv también fue analizado por Araque, E. y su equipo [54]. En estos experimentos, el *Pinus radiata* fue degradado bajo diferentes condiciones las cuales involucraron el uso de mezclas de acetona y agua, pH de 2.0, temperatura entre 185 y 195 °C, lo que resultó en una conversión a glucosa casi

cuantitativa, 99.5%, en máximo 40 min. cuando fue sometido el material obtenido a tratamiento enzimático.

3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las investigaciones analizadas se dirigen hacia el aprovechamiento de los residuos agroindustriales como materia prima para la fabricación de etanol mediante procesos enzimáticos o químicos de bajo costo. El uso de materiales como papel y cartón en la producción de etanol solo se ha sugerido como un uso alternativo al ya tradicional reciclado. Es posible que, debido a los problemas que genera la alta temperatura, resulte apropiado separar la holocelulosa de la lignina en vez de someter todo el material a un tratamiento.

En los casos que se usan métodos térmicos, resulta evidente que la temperatura un factor más importante que el ambiente químico, y que lo que se logra con eso, es el rompimiento de los enlaces de hidrógeno lo que hace la celulosa más accesible para la hidrólisis enzimática o ácida. Los diferentes pretratamientos discutidos están siendo analizados como posibles rutas industriales en la sacarificación y posterior fermentación a etanol. Algunos de estos, coinciden en los requerimientos de temperatura, presión y de equipos especiales que permitan asegurar las condiciones óptimas para la degradación de la biomasa. Sin embargo, el pretratamiento AFEX es posible realizarlo a temperaturas tan bajas como 70 °C.

Los tratamientos por hidrólisis ácida manejan condiciones de temperatura y presión usualmente más bajas que los otros pretratamientos siempre y cuando el ácido sea concentrado. Además, pueden aplicarse directamente a la biomasa realizando la sacarificación en un solo paso. No obstante, en estos tratamientos se suelen obtener sustancias nocivas para la levadura, además de requerir equipos de material especial que no sean susceptibles a daños causados por el bajo pH.

Los tratamientos de la celulosa (o pulpas celulósicas) pueden tener aplicación en la obtención de etanol a partir de papel o cartón reciclado. Los investigados y discutidos en esta revisión, implican la disolución de la celulosa, o su mezcla con soluciones salinas saturadas cuyos tratamientos han mostrado un efecto disruptivo sobre la alta cristalinidad de la celulosa.

Los pretratamientos han surgido como una respuesta a la problemática generada por el agotamiento de los residuos fósiles y el incremento de los desechos de cultivos. Se cree que con el desarrollo metodológico y el mejoramiento de los pretratamientos analizados en el futuro próximo se contará con procesos industriales adecuados para la obtención de alcohol carburante.

4. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Imai, M., Ikari, K., Suzuki, I. "High-performance hydrolysis of cellulose using mixed cellulose species and ultrasonication pretreatment". *Biochem. Eng. J.* vol. 17, pp. 19-23, 2003.

- [2] Vidal L., T. and J.F. Colom P. "Química de la madera para la fabricación de pastas". *Ingeniería Química*, 93-103, Abr. 1988.
- [3] R. M. Rowell, R. A. Young, & J. K. Rowell, *Paper and composites from agro-based resources*. Florida: CRC Press. 1996, pp.269-320. 159-160.
- [4] Butt, D. Thermochemical processing of agroforestry biomass for furans, phenols, cellulose and essential oils.. Rural Industries Research and Development Corporation, Melbourne, 2006, p. 26.
- [5] O'Connell, D. W. et al., "Heavy metals absorbents prepared from the modification of cellulose: a review". *Bioresource Technology*: doi:10.1016/j.biortech.2008.01.036.
- [6] Mandalari, G., Bisignano, G., Lo Curto, R.B., Waldron K.W., Faulds, C.B., 2008, "Production of feruloyl esterases and xylanases by *Talaromyces stipitatus* and *Humicola grisea* var. hermoidea on industrial food processing by-products. *Bioresource Technology*, 99, pp. 5130–5133. 2008
- [7] Lach, J., Sadowsky K. & Poskobko, S., "Mathematical formalism for blending to obtain formed fuels from waste". *Fuel*. Doi:10.1016/j.fuel.2008.02.023.
- [8] Demirbas, A., "Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections". *Energy Conversion and Management*, vol. 49, 2106-2116, 2008.
- [9] Frederick Jr., W. J., Lien, S. J., Courchene, C. E., DeMartini, N. A., Ragauskas, A. J. & Lisa, K. "Production of ethanol from carbohydrates from loblolly pine: a technical and economic assessment". *Bioresource Technology*, vol. 99, 5051-5057, 2008.
- [10] Baig, M. M. V., Baig, M. L. B., Baig, M.I.A., & Yasmeen, M., "Saccharification of banana agrp-waste by cellulolytic enzymes". *African Journal of Biotechnology*, vol. 3(9), 447-450. 2004.
- [11] Tokuyasu, K., Tabuse, M., Miyamoto, M. Matsuki, J. & Yoza, K. "Pretreatment of microcrystalline cellulose flakes with CaCl₂ increases the surface area, and thus improves enzymatic saccharification". *Carbohydr. Res.*, to be published.
- [12] Papinutti, V. L., Diorio, L. A. & Forchiassin, F., "Degradación de madera de álamo por *Fomes sclerodermeus*: producción de enzimas ligninolíticas en aserrín de álamo y cedro". *Rev. Iberoam. Micol.* vol. 20, pp. 16-20, 2003.
- [13] Al-Zuhair, S., "The effect of crystallinity of cellulose on the rate of reducing sugars production by heterogeneous hydrolysis". *Bioresource Technology*, vol. 99, pp. 4078-4085, 2008.
- [14] Jeoh, T., et al., "Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility". *Biotechnology and Bioengineering Chemistry*, vol. 98(1), pp.112-122, 2007.
- [15] Weil, J., Westgate, P., Kohlmann, K. & Michael R. Ladisch., "Cellulose pretreatments of lignocellulosic substrates". *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 16(11), pp. 1002-1004, 1994.
- [16] Wood, T.M., McCrae, S.I., "The cellulose of *Trichoderma koningii*: purification and Properties of some endoglucanase components with special reference to their action on cellulose when acting alone and in synergism with the cellobiohydrolase". *Biochem. J.*, vol 171, pp. 61–72, 1977.
- [17] Esteghlaliana, A.R., et al., "Cellulases: next term Agents for Fiber Modification or Bioconversion? The effect of substrate previous termaccessibilitynext term on cellulose enzymatic hydrolyzability". *Progress in Biotechnology*, vol. 21, pp. 21-36, 2002.
- [18] Fernández-Bolaños, J., et al., "Steam-explosion of olive stones: hemicellulose solubilization and enhancement of enzymatic hydrolysis of cellulose". *Bioresource Technology*, vol. 79(1), pp. 53-61, 2001.
- [19] Kontturi, E.J. *Surface chemistry of cellulose : from natural fibres to model surfaces*. Eindhoven: Technische Universiteit Eindhoven, 2005, p.149.
- [20] Klemm, D., Schmauder, H-P., & Heinze, T. (2004, Ene.). Cellulose. [Online]. Available: http://www.wiley-vch.de/books/biopoly/pdf_v06/bpol6010_275_287.pdf.
- [21] Liu, C. F., Xu, F., Sun, J. X., Ren, J. L., Curling, S., Sun, R. C., Fowler, P. & Baird, M. S. "Physicochemical characterization of cellulose from pereennial ryegrass leaves (*Lolium perenne*)". *Bioresource Technology*, vol. 341, pp. 2677-2687. 2006.
- [22] Rodriguez, A., Moral, A., Serrano, L., Labidi, J., Jimenez, L.. "Rice straw pulp obtained by using various methods". *Bioresource Technology*, vol 99, pp. 2881-2886., 2008.
- [23] Lynd, L.R., Elander, R.T.; & Wyman, C.E. "Likely features and costs of manufacture biomass ethanol technology". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 57-58, pp. 741-761, 1996.
- [24] Lynd, L.R., Cushman, A. H., Nichols, R. J. & Wyman, C. E. "Fuel ethanol from cellulosic biomass". *Science*, vol. 251, pp. 1318-1323, 1991.
- [25] Ladisch, M., Dale, B., Tyner, W., Mosier, N., Kim, Y., Cotta, M., Dien, B., Blaschek, H., Laurenas, E., Shanks, B., Verkade, J., Schell, C., Petersen, G. "Cellulose conversion in dry grind ethanol plants". *Bioresource Technology*, vol. 99(12), pp. 5157-5159, 2008.
- [26] E. Euser, *The chemistry of cellulose*, New York: Champma and Hall, 1944, p. 140.
- [27] Mantanis, G. I., Young, R. A. & Rowell, R. M. "Swelling of compressed cellulose fiber webs in organic liquids". *Cellulose*, vol. 2, pp. 1-22, 1995.
- [28] Heinze, T. & Koschella, A. "Solvents applied in the field of cellulose chemistry – a mini review". *Polimeros: Ciência e Tecnologia*, vol. 15(2), pp 84-90, 2005.
- [29] Potthast, A., Rosenau, T., Sartori, J., Sixta, H., Kosma, P. "Hydrolytic processes and condensation

- reactions in the cellulose solvent system N,N-dimethylacetamide/lithium chloride Part 2: degradation of cellulose". *Polymer*, vol. 44, pp. 7–17, 2003.
- [30] Wang, Y., Y. Zhao, and Y. Deng. "Effect of enzymatic treatment on cotton fiber dissolution in NaOH/urea solution at cold temperature". *Carbohydrate Polymers*, vol. 72(1), pp. 178-184, 2008.
- [31] C. Doreé, *The methods of cellulose chemistry*. New York: Van Nostrand Company Inc., 1933, p. 50-75.
- [32] Hamilton, T.J., Dale, B. E., Ladisch M. R., Tsao, G. T. "Effect of Ferric Tartrate/Sodium Hydroxide Solvent Pretreatment on Enzyme Hydrolysis of Cellulose on Corn Residue". *Biotechnology and Bioengineering Chemistry*, vol. 37(1), pp. 781-787, 1984.
- [33] Cuissant, C., Navard, P. & Heinze, T. "Swelling and dissolution of cellulose. Part IV: Free floating cotton and wood fibers in ionic liquids". *Carbohydrate polymers*, vol. 72, pp. 590-596, 2008.
- [34] Uçar, G., & Balaban, M. "Hydrolysis of Polysaccharides with 77% Sulfuric Acid for Quantitative Saccharification". *Turk J. Agric For.*, vol. 27, pp. 361-365, 2003.
- [35] Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G., Nilvenbrant, N. "The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood". *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 24, pp. 151–159, 1999.
- [36] Delgenes, J.P., Moletta, R., Navarro, J.M. "Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentation of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*". *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 19, pp. 220–225, 1996.
- [37] Watson, N.E., Prior, B.A., Lategan, P.M., Lussi, M. "Factors in acid treated bagasse inhibiting ethanol production from Dxylose by *Pachysolen tannophilus*". *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 6 (10), pp. 451–456, 1984.
- [38] Kuster, F.M., Temmink, H.M.G. "The influence of pH and weak acid anions on the dehydration of D-fructose". *Carbohydrate Research*, vol. 54, pp. 185–191, 1977.
- [39] Xiang, Q., Lee, Y. Y., & Torget, R. W. "Kinetics of Glucose Decomposition During Dilute-Acid Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 113-116 (12), 1127-1138, 2004.
- [40] Bower, S., Wickramasinghe, R., Nagle, N. J., Schell, D. J. "Modeling sucrose hydrolysis in dilute sulfuric acid solutions at pretreatment conditions for lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, vol. 99, pp. 7354–7362, 2008.
- [41] Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M. & Ladisch, M. "Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass". *Bioresource Technology*, vol. 96(6), pp. 673-686, 2005.
- [42] Wyman, C.E., Dale, B. E., Elander, R. T., Holtzapple, M., Ladisch, M. R. & Lee, Y. Y. "Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies". *Bioresource Technology*, vol. 96(18), pp. 1959-1966, 2005.
- [43] Shen, Y., Zhang, Y., Ma, T., Bao, X., Du, F., Zhuang, G. & Qu, Y. "Simultaneous saccharification and fermentation of acid-pretreated corncobs with a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing β -glucosidase". *Bioresource Technology*, vol. 99, pp. 5099-5103, 2008.
- [44] Kim, T.H., Lee, Y.Y. "Pretreatment and fractionation of corn stover by ammonia recycle percolation process. *Bioresource Technology*, vol. 96, pp. 2007–2013, 2005.
- [45] Kim, T.H., Lee, Y.Y. "Fractionation of corn stover by hot-water and aqueous ammonia treatment". *Bioresource Technology*, vol. 97 (2), pp. 224–232, 2006.
- [46] Kim, T.H., Lee, Y.Y. "Pretreatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia at moderate temperature". *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 136–140, pp. 81–92, 2007.
- [47] Kim, T. H., Taylor, F., Hicks, K. B. "Bioethanol production from barley hull using SAA (soaking in aqueous ammonia) pretreatment". *Bioresource Technology*, vol. 99, pp. 5694–5702, 2008.
- [48] Kim, Y., Hendrickson, R., Moiser, N. S., Ladisch, M. R., Bals, B., Balan, V. & Dale, B. E. "Enzyme hydrolysis and ethanol fermentation of liquid hot water and AFEX pretreated distillers' grains at high-solids loadings". *Bioresource Technology*, vol. 99(12): pp. 5206-5215, 2008.
- [49] Gregg, D. & Saddler, J.N. A techno-economic assessment of the pretreatment and fractionation steps of a biomass-to-ethanol process. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 711–727, 1996.
- [50] Gossett, J.M., Stuckey, D.C., Owen, W.F., & Mccarty, P.L. Heat treatment and anaerobic digestion of refuse. *J. Environ. Eng. Div.* 108, 437–454, 1982.
- [51] Liu, C., Wyman, C.E. The effect of flow rate of compressed hot water on xylan, lignin and total mass removal from corn stover. *Ind. Eng. Chem. Res.* 42, 5409–5416. 2003
- [52] Teramoto, Y., Lee, S.-H., & Endo, T. "Pretreatment of woody and herbaceous biomass for enzymatic saccharification using sulfuric acid-free ethanol cooking. *Bioresource Technology*, to be published.
- [53] Araque, E., Parra, C., Freer, J., Contreras, J. R., Mendonça, R. & Baeza, J. "Evaluation of organosolv pretreatment for the conversion of *Pinus radiata* D. Don to ethanol". *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 43, pp. 214–219, 2008.