

Optimización del Pretratamiento Ácido de Biomasa Lignocelulósica para la Producción de Bioetanol

Eliana P. Dagnino^{1,2*}, Ester R. Chamorro¹, Silvia D. Romano^{2,3}, Fernando Felissia⁴, María C. Area^{3,4}

1: Grupo de Investigación en Química Orgánica Biológica (QUIMOBIO) Facultad Regional Resistencia, Universidad Tecnológica Nacional, French 414 (3500), Resistencia, TEL/FAX: 3722-432683 Int 224.

2: Grupo de Energías Renovables, Facultad de Ingeniería, Universidad de Buenos Aires.

3: Programa de Celulosa y Papel, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones, Félix de Azara 1552, Posadas, (CP 3300).

4: CONICET.

*e-mail: pdagnino@fre.utn.edu.ar

Resumen. El proceso de obtención de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica presenta importantes ventajas comparado con aquel producido a partir de azúcares simples, ya que ésta no compite con la industria alimenticia y además es un residuo. Las materias primas ricas en celulosa, como la cascarilla de arroz, presentan una estructura compleja que dificulta la hidrólisis enzimática, debido a sus características morfológicas y su compleja composición química. Al tratar a las materias primas con ácido diluido se obtiene una alta recuperación de hemicelulosas en forma de monómeros en la fracción líquida y una fracción sólida con alta concentración de celulosa. Además, debido a las altas temperaturas y condiciones ácidas del pretratamiento, los azúcares liberados por hidrólisis se descomponen originando compuestos de degradación. El objetivo de este trabajo de investigación fue encontrar las condiciones óptimas de pretratamiento de cascarilla de arroz con ácido sulfúrico diluido y calor. La optimización del proceso estudiado corresponde a los valores medios de concentración de ácido y tiempo.

Palabras Claves: Optimización, bioetanol, cascarilla de arroz, pretratamientos, ácido.

Optimization of the Acid Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production

Abstract. Bioethanol produced from lignocellulosic biomass has significant advantages compared to that produced from simple sugars, since this does not compete with the food industry and it is a waste. The cellulose-rich raw materials such as rice hulls have a complex structure that hinders the enzymatic hydrolysis due to their morphological features and their complex chemical composition. The treatment of the raw materials with dilute acid produces a high recovery of hemicelluloses in the form of monomers in the liquid fraction and a solid fraction with high concentrations of cellulose. In addition, due to the high temperatures and acidic conditions of the pretreatment, the sugars released by hydrolysis are degraded in degradation compounds. The objective of this research was to find the optimum conditions of rice husks pretreatment with dilute sulfuric acid and heat. The optimization of the studied process corresponded to the average values of acid concentration and time.

Keywords: Optimization, bioethanol, rice hulls, pretreatments, acid.

INTRODUCCIÓN

El proceso de obtención de bioetanol a partir de materias primas ricas en carbohidratos complejos (biocombustibles de segunda generación), como la celulosa, se convierte en una opción muy interesante para eliminar la competencia con la industria alimentaria, reducir las emisiones de dióxido de carbono y generar valor agregado a los residuos de la agroindustria (Ahring et al., 2007;

Broadhead et al., 2008).

Los materiales lignocelulósicos, en general, están constituidos por tres polímeros estructurales, celulosa, hemicelulosas y lignina. Contienen además una serie de compuestos de bajo peso molecular solubles en agua (fracción hidrosoluble) y solventes orgánicos denominados extraíbles. También presentan pequeños contenidos en proteína y sales minerales (Fengel, and Wegener, 1984).

Los carbohidratos, celulosa y hemicelulosas, son susceptibles de ser sacarificados y posteriormente fermentados para la producción de bioetanol.

El proceso de obtención de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos se conforma básicamente de las siguientes etapas: pretratamiento, hidrólisis, fermentación y separación.

Las materias primas ricas en celulosa presentan una estructura compleja que dificulta la hidrólisis enzimática. Los factores más importantes que limitan esta etapa son la cristalinidad de la celulosa y su grado de polimerización, el área superficial disponible para el ataque enzimático y contenido de lignina, entre otros (Ahring et al., 2007; Fengel and Wegener, 1984; Hendriks et al., 2009; Kumar et al., 2009; Mosier et al., 2005; Taherzadeh et al., 2008; Zheng et al., 2009). Por este motivo, al proceso de producción de etanol a partir biomasa lignocelulósica debe agregarse el pretratamiento, a diferencia de los procesos tradicionales a partir de caña de azúcar o de granos de cereales (Ahring et al., 2008; Fengel and Wegener, G., 1984; Hendriks et al., 2009; Kumar et al., 2009; Mosier et al., 2005; Taherzadeh et al., 2008; Zheng et al., 2009).

La cascarilla de arroz es un residuo lignocelulósico muy abundante en la región del Noreste Argentino (NEA). Posee 36 a 40 % de celulosa y 12 a 19 % de hemicelulosas, (Karimia et al., 2006; Binod et al., 2010; Hsu et al., 2010; Saha et al., 2007; Banerjee et al., 2009; Saha et al., 2008), y aproximadamente un 12 % de cenizas que contienen un 80 - 90 % de sílice, 5 % K_2O , P_2O_5 , y el 4% a 1,2 % de CaO y pequeñas cantidades de Mg , Fe y Na (Balconi Bevilacqua et al., 2010; Diel Rambo et al., 2009). También posee grasas, gomas, alcaloides, resinas, aceites esenciales y otros componentes citoplasmáticos (sustancias extraíbles o extractivos).

La dificultad de convertir los materiales lignocelulósicos en productos químicos se debe a sus características morfológicas. Las microfibrillas de celulosa están incrustadas en una matriz amorfa de hemicelulosas y lignina, que actúa como una barrera natural para ataque de microorganismos y enzimas. En el caso de la cascarilla de arroz, su compleja composición química suma inconvenientes adicionales a la liberación de la celulosa.

El pretratamiento químico con soluciones de ácido sulfúrico diluido combinado con hidrólisis enzimática se considera un procedimiento prometedor para la producción de bioetanol lignocelulósico (Ahring et al., 2008; Kumar et al., 2009). Este tipo de pretrata-

miento provoca la hidrólisis de las hemicelulosas y de parte de la celulosa amorfa. Al tratar a las materias primas con ácido diluido se obtiene una alta recuperación de hemicelulosas en forma de monómeros en la fracción líquida y una fracción sólida con alta concentración de celulosa (Hendriks et al., 2009; Linde et al., 2008; Sassner et al., 2008; Wyman et al., 2005; Yang et al., 2008).

Debido a las altas temperaturas y condiciones ácidas del pretratamiento, los azúcares liberados por hidrólisis se degradan originando dos compuestos: el furfural (degradación de pentosas: xilosa y arabinosa) y el 5-hidroximetilfurfural o HMF (degradación de hexosas: glucosa, manosa y galactosa). A su vez, el furfural puede degradarse a ácido fórmico o bien polimerizarse, mientras que el HMF origina cantidades equimoleculares de ácidos fórmico y levulínico. También se origina ácido acético procedente de la hidrólisis de los grupos acetilos de las hemicelulosas (Ahring et al., 2008; Fengel and Wegener, 1984; Oliva Domínguez, 2003).

El objetivo de este trabajo fue encontrar las condiciones óptimas de tratamiento de cascarilla de arroz con ácido sulfúrico diluido y calor tal de maximizar la extracción de xilosa (monómero de mayor proporción de las hemicelulosas) minimizando su degradación, y maximizar la concentración de glucanos en el sólido tratado.

EXPERIMENTAL

Materia prima

Como materia prima se utilizó cascarilla de arroz suministrada por una industria local (arrocera del interior de la provincia del Chaco, Argentina).

Se tomó una muestra de cascarilla de arroz y se la molió hasta alcanzar un tamaño menor de 10 mm de largo por 1 mm de espesor. Se la almacenó en recipiente cerrado a temperatura ambiente hasta su utilización.

Pretratamientos

Los pretratamientos se realizaron siguiendo un Diseño de Experimentos Central Compuesto (CCD) de dos factores (Montgomery y Runger, 2002): concentración de la solución de ácido sulfúrico y tiempo de exposición (Tabla I).

La materia prima se trató sin ácido y con soluciones acuosas de ácido sulfúrico de 0,3 a 2,4g $H_2SO_4/100ml$, en una proporción del 5% de sólidos. Luego las mezclas se colocaron en un reactor a pre-

sión de vapor de 5 atmósferas, con tiempos de residencia de 16 a 50 minutos. El tiempo para alcanzar la presión fue de 20 minutos. Se realizó una descompresión rápida al final de cada ensayo.

Posteriormente se separó el líquido del sólido mediante filtración al vacío. En todos los casos, el líquido fue refrigerado a 4°C. El sólido pretratado se lavó repetidas veces con agua destilada para retirar la solución ácida remanente, se lo secó en estufa a 60°C por 10 horas y se lo almacenó en desecador.

Caracterización

La caracterización de la materia prima incluyó: sustancias extractivas en agua y alcohol etílico, carbohidratos estructurales: glucanos, xilanos y arabinanos, grupos acetilos, lignina ácido insoluble (lignina klason), lignina ácido soluble y cenizas.

El sólido pretratado se caracterizó de la misma forma que la materia prima a excepción de la determinación de sustancias extractivas en agua y alcohol.

Sobre el líquido de pretratamiento se determinó el contenido de azúcares (glucosa, xilosa, arabinosa) y productos de degradación: furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF) y ácidos orgánicos (fórmico y acético).

La cuantificación de azúcares, ácidos orgánicos y productos de degradación, se realizó mediante cromatografía líquida HPLC (cromatógrafo Waters), utilizando columna AMINEX-HPX87H (BIO-RAD) con las siguientes condiciones cromatográficas: Eluyente: H₂SO₄ 4mM, Flujo: 0,6ml/min, Temperatura:

35°C, Detector: Índice de refracción y arreglo de diodos.

Todos los ensayos mencionados se realizaron siguiendo los procedimientos estándares del National Renewable Energy Laboratory (NREL).

Los carbohidratos estructurales glucanos, xilanos y arabinanos de la materia prima y el sólido pretratado se calcularon como el producto de la concentración de azúcares de seis y cinco carbonos, evaluados por HPLC, por un factor de corrección anhidra 0,90 y 0,88, respectivamente. Este factor compensa la adición de moléculas de agua durante la hidrólisis.

Los grupos acetilos se determinaron como el producto de la concentración de ácido acético, evaluado por HPLC, por el factor estequiométrico 0,717.

Los resultados se analizaron mediante un análisis multifactorial de la varianza (ANOVA) con la temperatura y el tiempo como variables independientes. El software estadístico utilizado fue Statgraphics, y el nivel de significación aplicado fue del 95 % (Montgomery y Runger, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Materia prima

En la Tabla II se muestra la composición química de la cascarilla de arroz utilizada como materia prima, expresada como porcentaje en base seca. En esta tabla se observa que la cascarilla de arroz posee baja proporción de lignina pero una elevada cantidad de cenizas y extractivos, los que componen aproximadamente un 30 % del material.

Ensayo	Sol. H ₂ SO ₄ *	Tiempo*	H ₂ SO ₄ [%p/V]	Tiempo [min]
1	-1	-1	0,3	16
2	1	-1	1,7	16
3	-1	1	0,3	44
4	1	1	1,7	44
5	-1,41	0	0	30
6	1,41	0	2,4	30
7	0	-1,41	1	10
8	0	1,41	1	50
9	0	0	1	30
10	0	0	1	30

*Variables transformadas.

Tabla I: Condiciones del pretratamiento de la cascarilla de arroz con ácido sulfúrico diluido (Diseño CCD).

Componentes	% peso seco
<i>Carbohidratos totales</i>	48,6
- Glucanos	34,1
- Xilanos	13,1
- Arabinanos	1,5
<i>Lignina Total</i>	19
- Lignina ácido insoluble	17,2
- Lignina ácido soluble	1,8
<i>Grupos acetilos</i>	1,2
<i>Cenizas</i>	15
<i>Extractivos</i>	8,2
Otros por diferencia (ceras, etc.)	8

Tabla II: Caracterización química de la cascarilla de arroz (% peso seco).

La composición de la cascarilla de arroz es marcadamente diferente a otros recursos fibrosos como el aserrín. Por ejemplo, el porcentaje de lignina en el aserrín de algarrobo es de aproximadamente 33,23 %, mientras que las cenizas es sólo el 0,54 %.

Líquido de pretratamiento

En la Tabla III se muestran los porcentajes de los azúcares hidrolizados y productos de degradación disueltos en el líquido de pretratamiento según las condiciones de proceso utilizadas mientras que en la Tabla IV se muestran los porcentajes de azúcares degradados, calculados como el producto de la concentración de HMF por el factor estequiométrico de conversión 1,4286 (hexosas degradadas) y el producto de la concentración de furfural por el factor 1,5625 (pentosas degradadas).

Las hemicelulosas son carbohidratos de cadena corta con numerosas ramificaciones (estructura amorfa). Esta estructura hace que sean fáciles de hidrolizar en condiciones relativamente suaves y la existencia de xilosa (monómero estructural mayoritario) en el líquido de pretratamiento indicó hidrólisis parcial o total de este polímero.

Como era de esperar, los tratamientos más severos provocaron mayor degradación de los azúcares disueltos en el líquido de pretratamiento. Como consecuencia, se observa la disminución de la concentración de los mismos y el aumento en la concentración de los productos de degradación en el líquido. A partir de glucosa y de xilosa se producen HMF y furfural, los que también pueden degradarse.

La concentración máxima de xilosa en el líquido de pretratamiento se encontró en el ensayo 1 (0,3% H₂SO₄, 16min) y la concentración mínima en el ensayo 5 (0 % H₂SO₄, 30 min).

La mayor disolución de glucosa se dio con las condiciones más severas (ensayo 6: 2,41 % H₂SO₄, 30min). Esto se debe a que el tratamiento provocó la hidrólisis de la glucosa proveniente de los glucanos de las hemicelulosas y de la porción de celulosa amorfa. Al mismo tiempo, este tratamiento propició la degradación de los azúcares hidrolizados debido a la exposición de los mismos en condiciones de pH muy bajos y altas temperaturas.

La proporción de arabinosa en el líquido de pretratamiento se mantuvo relativamente constante en los diferentes tratamientos, con una variación de sólo 0,59% entre el valor máximo y el mínimo. Al igual que con la xilosa, la excepción fue el tratamiento realizado sin ácido.

Las ecuaciones de regresión y sus respectivos coeficientes de regresión (R²) encontradas fueron:

$$\% \text{Xilosa} = 12,57 - 2,37 * C - 1,92 * t - 0,91 * C * t \quad (1)$$

$$R^2 = 0,91$$

$$\% \text{Glucosa} = 11,58 + 1,88 * C + 1,58 * t^2 \quad (2)$$

$$R^2 = 0,71$$

$$\% \text{Arabinosa} = 1,76 - 0,08 * C - 0,14 * t - 0,08 * C^2 \quad (3)$$

$$R^2 = 0,74$$

$$\% \text{Furfural} = 1,08 - 0,66 * C + 0,42 * t \quad (4)$$

$$R^2 = 0,93$$

$$\% \text{HMF} = 0,18 + 0,09 * C + 0,05 * t \quad (5)$$

$$R^2 = 0,86$$

$$\% \text{Ác. Acético} = 1,84 + 0,33 * C - 0,41 * C^2 \quad (6)$$

$$R^2 = 0,80$$

$$\% \text{Ác. Fórmico} = 0,49 + 0,25 * C + 0,21 * t \quad (7)$$

$$R^2 = 0,83$$

Donde C es la concentración de ácido sulfúrico expresada en % p/v y t el tiempo en minutos (ambas como variables transformadas).

Las condiciones que maximizan la concentración de xilosa en el líquido de pretratamiento son 0,3% de ácido sulfúrico durante 16 minutos. La concentración de todos los productos de degradación aumenta con las condiciones más severas. La influencia de la concentración de ácido y del tiempo son altamente significativas para la producción de furfural (p = 0,000). Con respecto a la generación de HMF, la concentración de ácido (p = 0,000) presenta una influencia mayor que el tiempo (0,035).

Sólido pretratado

Al finalizar el pretratamiento, el sólido separado presenta una alta proporción de celulosa debido a su

Ensayo	Glucosa	Xilosa	Arabinosa
1	10,32	15,61	1,92
2	14,54	14,01	1,94
3	11,15	14,15	1,64
4	14,3	8,56	1,5
5	0,56	0,44	0,21
6	22,43	7,33	1,35
7	13,33	14,74	1,77
8	15,92	9,09	1,52
9	10,7	13,49	1,82
10	13,55	12,96	1,77

Tabla III: Contenido de azúcares (% peso seco del sólido inicial) en el líquido de pretratamiento.

Ensayo	HMF	Furfural	Hexosas	Pentosas
1	0,04	0,11	0,06	0,17
2	0,20	0,99	0,28	1,54
3	0,15	0,72	0,22	1,13
4	0,25	1,94	0,36	3,86
5	0,01	0,01	0,01	0,01
6	0,36	2,47	0,51	3,04
7	0,13	0,5	0,19	0,78
8	0,29	1,48	0,41	2,32
9	0,30	1,25	0,43	1,95
10	0,29	1,13	0,42	1,77

Tabla IV: Contenido de productos de degradación y azúcares degradados (% peso seco del sólido inicial) en el líquido de pretratamiento.

Ensayo	Glucanos	Xilanos	Arabinanos	Lignina	Cenizas
1	37,62	4,57	0,3	23,8	22,8
2	40,72	0,12	0	30,2	25
3	44,44	2,38	0	28,5	24,1
4	38,42	0,06	0	29,9	25,8
5	34,56	15,69	1,43	20,5	17,2
6	41,27	0,03	0,49	29,3	25
7	38,78	1,72	0,19	24,9	23,6
8	41,75	0,07	0	30,2	25,4
9	43,23	1,02	0	24,8	24,9
10	43,97	0,91	0	27,7	25,5

Tabla V: Contenido de glucanos, xilanos, arabinanos, lignina total y cenizas (% peso seco del sólido tratado) en función a los tratamientos realizados en el sólido pretratado.

resistencia a la hidrólisis con ácidos diluidos y calor. El contenido, en porcentaje en base seca, de glucanos, xilanos y arabinanos en el sólido pretratado puede observarse en la Tabla V.

Las variables estudiadas (tiempo y concentración de la solución ácida) en el rango de niveles abarcado por este estudio, no tuvieron efecto significativo sobre la deslignificación. Se observa asimismo que las cenizas se mantienen también en el sólido.

Las ecuaciones de regresión obtenidas glucanos y de xilanos fueron:

$$\% \text{ Glucanos} = 43,6 + 0,91 * t - 1,45 * C^2 - 2,29 * C * t - 1,56 * t^2 \quad (8)$$

$$R^2 = 0,92$$

$$\% \text{ Xilanos} = 0,93 - 1,71 * C - 0,58 * t + 0,81 * C^2 + 0,54 * t \quad (9)$$

$$R^2 = 0,99$$

El ensayo 5 (autohidrólisis, 30min) es un caso especial, ya que produjo un ataque químico muy bajo, obteniendo cantidades anómalas de productos en el líquido con respecto a los otros tratamientos. Esto se debe seguramente a que en ausencia de ácido no se disuelven los extractivos y resinas de la cascarilla, ejerciendo un impedimento para la hidrólisis.

El porcentaje en base seca de glucanos en el sólido se mantuvo relativamente constante, con una variación de 3,17%, excepto en los pretratamientos con concentraciones bajas de ácido (sin ácido y 0,3%), y tiempos cortos (16 min). La experiencia que maximizó la concentración de glucanos en el sólido pretratado fue la realizada con una solución de 1% de ácido durante 30 minutos.

Con el pretratamiento ácido se busca hidrolizar las hemicelulosas aumentando la porosidad y el área superficial del material para favorecer la acción enzimática en la producción de bioetanol. Con tratamientos severos (altas concentraciones de soluciones ácidas y/o largos tiempos), las hemicelulosas son casi totalmente hidrolizadas.

CONCLUSIONES

La cascarilla de arroz presenta más del 50% de carbohidratos en su composición, siendo una excelente opción de materia prima para la producción de bioetanol.

El sólido pretratado presenta altas proporciones de celulosa (glucanos). Ésta es susceptible de ser hidrolizada para generar glucosa y posteriormente fermentada para la obtención de bioetanol de segunda generación.

La experiencia que maximizó la concentración de glucanos en el sólido pretratado fue la realizada con una solución de 1% de ácido por 30 minutos.

Los tratamientos con ácido sulfúrico diluido y calor no provocaron modificaciones significativas en el contenido de ligninas y cenizas en el sólido pretratado.

En el líquido de pretratamiento se encontraron solubilizados los azúcares componentes de hemicelulosas (xilosas en mayor proporción). El ensayo que produjo la mayor solubilización de xilosas con mínima degradación fue el realizado con 0,3% de ácido sulfúrico durante 16 minutos. Con tratamientos más severos se produjo mayor degradación y con los más suaves se obtuvo mínima hidrólisis.

La optimización del proceso estudiado corresponde a los valores medios de concentración de ácido y tiempo.

AGRADECIMIENTOS

Al sustento económico proporcionado por la Beca Doctoral para docentes de la Universidad Tecnológica Nacional "FORMACION DE DOCTORES EN AREAS TECNOLÓGICAS PRIORITARIAS" otorgada por dicha Universidad y el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (FONCYT).

REFERENCIAS

Ahring, B., Alapuranen, M., Berlin, A., Bura, R., Chandra, R. P., Cherry, J., VanDijken, J. P., Galbe, M., Gorwa Grauslund, M. F., Record, T. B., Den Haan, R., Hahn Hägerdal, B., Ingram, L. O., Jarboe, L. R., Jeon, Y. J., Jeppsson, M., Karhumaa, K., Kuyper, M., De Laat, W., Lawford, H. G., Lee, K. J., Lynd, L. R., Mabee, W. E., VanMaris, A. J. A., McBride, J. E., Merino, S. T., Olsson, L., Otero, J. M., Pan, X., Panagiotou, G., Pronk, J. T., Puranen, T., Rogers, P. L., Saddler, J. N., Sassner, P., Shanmugan, K. T., Siika-aho, M., Vehmaanperä, J., Viikari, L., Westermann, P., Wingren, A., Winkler, A. A., Yomano, L. P., Zacchi, G. and Van Zyl, W. H. (2007). "Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology". Springer, Series Editor T. Scheper, Volumen Editor L. Olsson.

Balconi Bevilacqua, D., (2010). "Production of levulinic acid through acid hydrolysis of rice husk", Thesis (Mgter. in Chemistry) Federal University of Santa Maria, Natural and Exact Sciences Center.

Banerjee, S., Sen, R., Pandey, R., Chakrabarti, T., Satpute, D., Giri, B. and Mudliar, S., (2009). "Eva-

luation of wet air oxidation as a pretreatment strategy for bioethanol production from rice husk and process optimization”, *Biomass Bioenergy*; 33, 1680–686.

Binod, P., Sindhu, R., Singhanian, R., Vikram, S., Devi, L., Nagalakshmi, S., Kurien, N., Sukumaran, R. and Pandey, A., (2010). “Bioethanol production from rice straw: An overview”, *Bioresource Technology*; 101, 4767–4774.

Broadhead, J. (revisor) y María Casa (Ed.), Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) (2008). “Bosques y Energía: Cuestiones Clave”, Estudio Fao Montes N° 154. Roma, Italia.

Diel Rambo, M., (2009). “Use of rice husk for xylitol and silica gel production”, Thesis (Mgter. In Chemistry) Federal University of Santa Maria, Natural and Exact Sciences Center, 117.

Fengel, D. and Wegener, G., (1984). “Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions”. Walter de Gruyter, Berlin-New York.

Hendriks, A. and Zeeman, G. (2009). “Review: Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass”, *Bioresource Technology*; 100, 10–18.

Hendriks, A. and Zeeman, G., (2009). “Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass”, *Bioresource Technology*; 100, 10–18.

Hsu, T., Guo, G., Chen, W. and Hwang, W., (2010). “Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis”, *Bioresource Technology*; 101, 4907–4913.

Karimia, K., Kheradmandinia, S. and Taherzadeh, M. (2006). “Conversion of rice straw to sugars by dilute-acid hydrolysis”. *Biomass Bioenergy*; 30, 47–253.

Kumar, P., Barrett, D., Delwiche, M. and Stroeve, P., (2009). “Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production”. *Industrial & Engineering Chemistry Research*; 48, 3713–3729.

Linde, M., Jakobsson, E., Galbe, M. and Zachhi, G., (2008). “Steam pretreatment of dilute H₂SO₄-impregnated wheat straw and SSF with low yeast

and enzyme loadings for bioethanol production”. *Biomass Bioenergy*; 32, 326–332.

Montgomery, D. y Runger, G. (2002). “Probabilidad y estadística aplicada a la ingeniería”. Mc Graw Hill, México.

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y., Holtzapple, M. and Ladisch, M., (2005). “Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass”. *Bioresource Technology*; 96, 673–686.

Oliva Domínguez, J. M. (2003). “Effect of product degradation origin on vapor explosion of Cho-po biomass over *kluveromyces marxianus*”, Thesis (PhD). University Complutense of Madrid, Faculty of Biologic Sciences, Microbiology III Department, 166.

Saha, B. and Cotta ,M., (2008). “Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol”, *Biomass Bioenergy*; 32, 971 – 977.

Saha, B. and Cotta, M., (2007). “Enzymatic saccharification and fermentation of alkaline peroxide pretreated rice hulls to ethanol”. *Enzyme and Microbial Technology*; 41, 528–532.

Sassner, P., Martensson, C., Galbe, M. and Zacchi, G., (2008). “Steam pretreatment of H₂SO₄-impregnated *Salix* for the production of bioethanol”, *Bioresource Technology*; 99, 137–145.

Taherzadeh, M. and Karimi, K., (2008). “Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review”, *International Journal of Molecular Sciences*; 9, 1621-1651.

Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Holtzapple, M., Ladisch, M. and Lee, Y., (2005). “Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies”, *Bioresource Technology*; 96, 1959–1966.

Yang, B. and Wyman, C., (2008). “Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol”; 2, 26–40.

Zheng, Y., Pan, Z. and Zhang, R., (2009). “Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol”, *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*; 2, 51-68.