



**Universitatea „Babeș-Bolyai” Cluj-Napoca**

**Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică**



**CERCETĂRI PRIVIND OBȚINEREA  
BIOCARBURANȚILOR DE GENERAȚIA  
A DOUA DIN BIOMASĂ LIGNOCELULOZICĂ**

Rezumatul tezei de doctorat

Doctorand:  
**STEJERAN (CĂS. ȘENILĂ) LĂCRIMIOARA RAMONA**

**Conducător Științific:**  
Prof. Dr. LUMINIȚA SILAGHI-DUMITRESCU

Cluj-Napoca, 2012

## **COMISIE**

### **Președinte**

Conf. Dr. Cornelia MAJDIK

### **Referenți**

Prof. Dr. Ing. Valentin I. Popa – Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi”, Iași.

Prof. Dr. Emil Luca - Facultatea de Horticultură, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară, Cluj-Napoca.

Conf. Dr. Ing. Castelia Cristea – Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca

## CUPRINS

(numerotarea paginilor este identică cu cea din teza de doctorat)

<b>INTRODUCERE</b> .....	5
<b>STUDIUL DE LITERATURĂ</b>	
<b>1. BIOCARBURANȚII</b> .....	7
1.1 Generalități .....	7
1.2 Biomasa lignocelulozică .....	10
1.2.1 Structura .....	10
1.2.2 Obținerea de biocarburați din biomasa lignocelulozică.....	18
<b>2. METODE DE OBȚINERE A BIOCARBURANȚILOR DE GENERAȚIA A 2-A DIN BIOMASĂ LIGNOCELULOZICĂ</b> .....	22
2.1 Pretratamentul biomasei lignocelulozice.....	22
2.2 Variante de pretratamente.....	23
2.2.1 Metode fizice.....	23
2.2.2 Metode chimice.....	24
2.2.3 Metode biologice .....	27
2.2.4 Metode fizico-chimice.....	27
2.2.5 Eficiența diferitelor tipuri de pretratamente asupra deșeurilor lemnoase .....	30
2.3 Metode de hidroliză prezentate în literatură .....	34
2.3.1 Hidroliza chimică.....	35
2.3.1.1 Hidroliza cu acid diluat.....	36
2.3.1.2 Hidroliza cu acid concentrat.....	37
2.3.2 Hidroliza enzimatică.....	38
2.3.2.1 Hidroliza enzimatică a celulozei.....	40
2.3.2.2 Hidroliza enzimatică a hemicelulozelor.....	43
2.4 Fermentația zaharurilor la bioetanol.....	45
<b>CONTRIBUȚII ORIGINALE</b>	
<b>3. PRETRATAMENTUL DEȘEURILOR LEMNOASE</b> .....	48
3.1 Principiul tehnicii de pretratament cu apă.....	48
3.2 Pretratamentul deșeurilor lemnoase.....	53
3.2.1 Materia primă-deșeurile lemnoase.....	53
3.2.2 Pretratamentul deșeurilor lemnoase cu apă la temperaturi și presiuni ridicate.....	54
3.2.2.1 Reactorul de presiune și temperaturi înalte folosit la pretratament .....	54
3.2.2.2 Solventul folosit la pretratament .....	56
3.3 Caracterizarea componentelor celulozice rezultate după pretratamentul cu apă .....	56
3.3.1 Compoziția inițială a lemnului.....	57
3.3.2 Factorul de severitate.....	59
3.3.3 Compoziția fracției solide.....	64
3.3.3.1 Utilizarea tehnicii spectrale FT-IR în analiza lemnului netratat și a celui pretratat.....	66
3.3.4 Compoziția fracției lichide.....	71
3.3.4.1 Metodă nouă de identificare și cuantificare a carbohidraților din hemiceluloze, prin GC-MS.....	73
3.3.4.2 Metodă de analiză a 5-hidroximetilfurfuralului prin GC-MS	86
3.3.4.3 Metodă de analiză a furfuralului prin GC-MS.....	94

3.3.4.4	Conținutul în acid acetic și lignina ușor solubilă din fracția lichidă de la autohidroliză .....	101
3.3.5	Posibilități de utilizare a compușilor cu caracter inhibitor rezultați după pretratament.....	102
3.3.6	Analiza statistică prin folosirea sistemelor fuzzy neuronale adaptative (ANFIS).....	104
3.4	Concluzii.....	111
<b>4.</b>	<b>DELIGNIFICAREA CU CLORIT DE SODIU A DEȘEURILOR LEMNOASE PRETRATATE .....</b>	<b>114</b>
4.1	Delignificarea – considerații generale.....	114
4.2	Delignificarea cu clorit de sodiu în mediu acid.....	119
4.2.1	Delignificarea cu clorit de sodiu în mediu acid – produși de reacție.....	119
4.2.2	Delignificarea lemnului de brad.....	121
4.2.3	Utilizarea celulozei și ligninei obținute din lemn.....	124
4.3	Concluzii.....	125
<b>5.</b>	<b>HIDROLIZA ACIDĂ A DEȘEURILOR LEMNOASE PRETRATATE ....</b>	<b>127</b>
5.1	Principiile generale ale hidrolizei acide.....	127
5.2	Metode analitice de determinare a glucozei din hidrolizate.....	131
5.2.1	Metodă de dozare a glucozei rezultată din hidroliza fracției celulozice folosind GC-MS .....	132
5.2.2	Metodă spectrofotometrică de dozare a zaharurilor reducătoare din hidrolizate.....	137
5.3	Hidroliza acidă a componentei celulozice obținute din deșeurile lemnoase	139
5.3.1	Mecanismul hidrolizei acide a celulozei.....	139
5.3.2	Hidroliza cu acid sulfuric diluat a lemnului pretratat.....	141
5.3.2.1	Viteza reacției de hidroliză acidă.....	145
5.3.3	Hidroliza cu acid sulfuric diluat a lemnului pretratat și delignificat.....	146
5.3.4	Randamentul global al procesului.....	150
5.4.	Concluzii .....	151
<b>6.</b>	<b>HIDROLIZA ENZIMATICĂ A DEȘEURILOR LEMNOASE PRETRATATE .....</b>	<b>153</b>
6.1	Principiile generale ale hidrolizei enzimatice.....	153
6.2	Hidroliza enzimatică a deșeurilor lemnoase.....	157
6.2.1	Hidroliza enzimatică a lemnului pretratat .....	157
6.2.2	Hidroliza enzimatică a lemnului pretratat și delignificat.....	159
6.2.3	Viteza reacției de hidroliză enzimatică.....	163
6.2.4	Utilizarea tehnicii spectrale FT-IR în analiza lemnului pretratat și hidrolizat enzimatic .....	164
6.4	Concluzii.....	166
<b>7.</b>	<b>FERMENTAȚIA ZAHARURILOR OBȚINUTE DIN DEȘEURILE LEMNOASE.....</b>	<b>167</b>
7.1	Principiile generale ale fermentației.....	167
7.2	Fermentația zaharurilor obținute din lemn la bioetanol .....	170
7.3	Concluzii .....	178
<b>PARTEA EXPERIMENTALĂ</b>		
<b>8.</b>	<b>MATERIALE ȘI METODE.....</b>	<b>180</b>
8.1	Pretratamentul lemnului.....	180

8.2	Determinarea compoziției inițiale a lemnului .....	181
8.2.1	Determinarea conținutului de umiditate al lemnului.....	182
8.2.2	Determinarea conținutului de solide totale din lemn.....	182
8.2.3	Determinarea conținutului de cenușă din lemn.....	183
8.2.4	Determinarea substanțelor extractibile din lemn.....	183
8.2.5	Determinarea carbohidraților din lemn.....	184
8.2.6	Determinarea conținutului de lignină din lemn.....	185
8.3	Analiza fracției solide lemnoasă rezultată după pretratament.....	185
8.3.1	Analize FT-IR pentru lemnul netratat și cel după pretratament.....	186
8.4	Analiza fracției lichide.....	186
8.4.1	Derivatizarea fracției rezultate din hemiceluloze pentru determinarea conținutului de carbohidrați după pretratament.....	187
8.4.2	Dozarea 5-hidroximetilfurfuralului din fracția lichidă.....	188
8.4.3	Dozarea furfuralului din fracția lichidă.....	190
8.4.4	Dozarea acidului acetic din hemiceluloze.....	191
8.4.5	Dozarea oligozaharidelor.....	192
8.4.6	Dozarea ligninei ușor solubile.....	192
8.5	Delignificarea cu clorit de sodiu.....	193
8.5.1	Analiza fracției solide lemnoase rezultată după delignificare.....	195
8.6	Hidroliza acidă.....	195
8.6.1	Hidroliza acidă a lemnului pretratată și a lemnului pretratată și delignificat.....	195
8.6.2	Dozarea glucozei din hidrolizate.....	197
8.6.2.1	Dozarea glucozei prin GC-MS.....	197
8.6.2.2	Dozarea zaharurilor reducătoare din hidrolizate.....	198
8.7	Hidroliza enzimatică a lemnului pretratată și a celui pretratată și delignificat.....	199
8.8	Fermentația zaharurilor obținute din lemn.....	201
8.8.1	Dozarea bioetanolului.....	202
	<b>CONCLUZII GENERALE.....</b>	204
	<b>BIBLIOGRAFIE.....</b>	208
	<b>LISTA DE ABREVIERI .....</b>	220
	<b>LISTA PUBLICAȚIILOR.....</b>	222

**Cuvinte – cheie:** deșeuri lemnoase, celuloza, carbohidrați, gaz cromatografie, delignificare, hidroliză, glucoză, bioetanol

## INTRODUCERE

Teza de doctorat abordează o tematică de actualitate și anume, dezvoltarea de tehnologii moderne de obținere a biocarburanților de generația a 2-a prin valorificarea superioară a biomasei lignocelulozice.

Teza de doctorat prezintă două tehnologii de obținere a bioetanolului din deșeuri lemnoase bazate pe utilizarea a două tipuri diferite de reacții de hidroliză: hidroliza chimică și hidroliza enzimatică, în variante diferite pentru fiecare. Studiul în aceste două cazuri a fost foarte complex, implicând evaluarea diferiților parametri ai procesului, dezvoltarea de metode de analiză a fracțiilor rezultate după fiecare etapă, optimizarea, în ansamblu, a fiecărei etape în vederea eficientizării procesului de conversie la bioetanol.

Tehnologiile de conversie a deșeurilor lemnoase în bioetanol se compun din trei etape generale: pretratamentul, hidroliza și fermentația.

Teza de doctorat prezintă o metodă modernă de pretratament a deșeurilor lemnoase: pretratamentul cu apă fierbinte (autohidroliza), metodă de pretratament care nu folosește substanțele chimice, deșeurile lemnoase fiind fracționate în componente folosind doar apa la presiuni și temperaturi ridicate. Au fost studiate și comparate hidroliza chimică și cea enzimatică a fracției celulozice, atât în prezența ligninei cât și în absența ei, pentru a evalua efectul prezenței acesteia în proces.

Teza de doctorat abordează, în principal, dezvoltarea și validarea de metode analitice noi pentru analiza și cuantificarea carbohidraților, precum și a compușilor secundari derivați rezultați după fiecare etapă.

Teza este structurată în trei părți: o parte teoretică (Capitolele 1-2), în care sunt prezentate date din literatura de specialitate referitoare la metodele existente de obținere a bioetanolului din diferite tipuri de biomasă, precum și o scurtă prezentare a metodelor de pretratament, hidroliză și fermentație, a doua parte (Capitolele 3-7), în care se prezintă contribuțiile originale în domeniul abordat și, a treia parte (Capitolul 8), care se referă la metodele experimentale.

## CONTRIBUȚII ORIGINALE

### CAPITOLUL 3. PRETRATAMENTUL DEȘEURILOR LEMNOASE

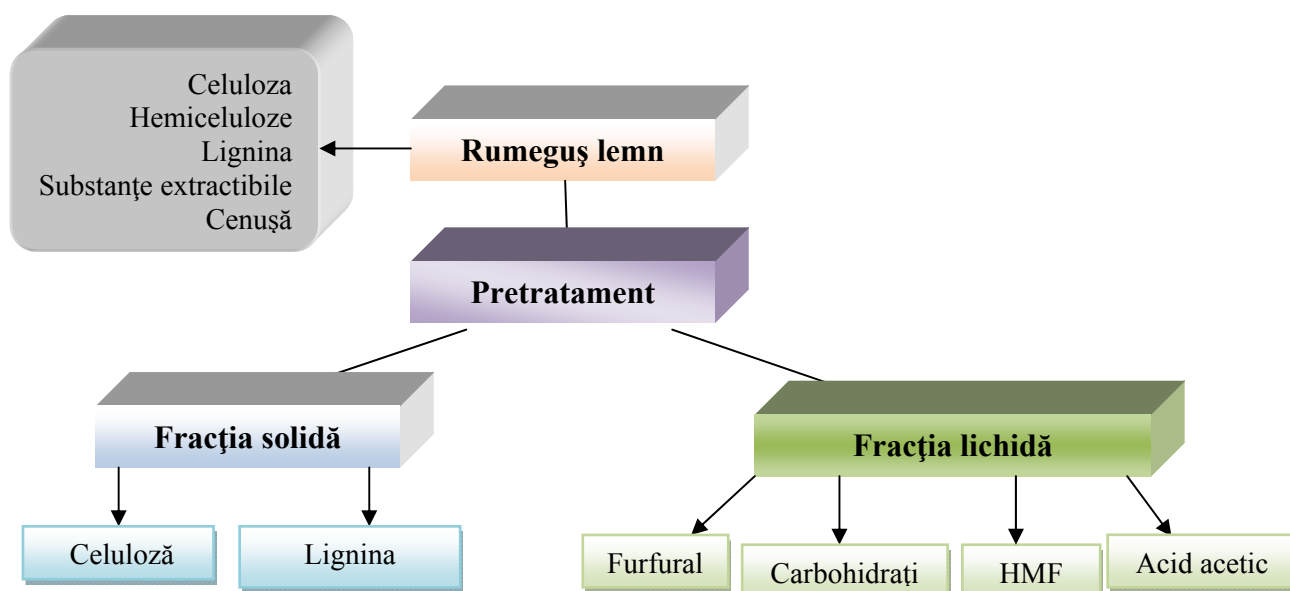
#### 3.1 Principiul tehnicii de pretratament cu apă

În conformitate cu obiectivele prezentei teze de doctorat, pretratamentul de autohidroliză a fost evaluat pentru separarea componentelor din lemnul de brad, specie caracteristică pentru zona studiată. Autohidroliza a fost studiată la nivel de laborator, cu ajutorul unui reactor testat la diferite temperaturi și timpi de staționare. Pentru aceste experimente, lemnul de brad a fost folosit ca materie primă.

Având în vedere că se pune accentul tot mai mult pe găsirea de metode din domeniul green chemistry, metoda de pretratament aleasă în cadrul acestui studiu pentru extracția hemicelulozei este extracția cu apă fierbinte, fără folosirea de reactivi chimici. Carbohidrații hemicelulozei sunt dizolvați ca oligozaharide solubile în lichid și pot fi separați de fracțiile insolubile de celuloză și lignină.

#### 3.2 Pretratamentul deșeurilor lemnoase

Etapile pretratamentului deșeurilor lemnoase sunt prezentate în figura 3.4.



*Figura 3.4 Produsele rezultate din pretratamentul deșeurilor lemnoase*

Pretratamentul deșeurilor lemnoase are loc cu ajutorul unui reactor de presiune (Parr, Parr Instruments, Illinois, USA).

### 3.3 Caracterizarea componentelor celulozice rezultate după pretratamentul cu apă

În urma pretratamentului de autohidroliză se formează două faze: faza solidă (celuloza și lignina) și faza lichidă (monozaharide, oligozaharide, compuși de degradare). Aceste două faze au fost analizate și cuantificate pe fiecare component. Au fost elaborate și validate noi metode analitice pentru analiza monozaharidelor, furfuralului și HMF. Oligozaharidele nehidrolizate în fracția lichidă au fost cuantificate și supuse hidrolizei la monomerii constituenți.

#### 3.3.1 Compoziția inițială a lemnului

Compoziția lemnului de brad este detaliată în tabelul 3.2.

**Tabel 3.2** Compoziția chimică a lemnului de brad (exprimată ca valoarea medie a măsurătorilor  $\pm$  deviația standard), comparativ cu compoziția lemnului de brad raportată în literatură (diferite specii de brad)

Specie de lemn	Holoceluloză	Celuloză	Hemiceluloză	Lignina	Extractibile	Cenușă
<b>Studiu prezent</b>	69,9	46,0 $\pm$ 0,7	23,9 $\pm$ 0,6	28,4 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1
Douglas-brad	69,0	42,0	27,0	28,3	2,5	0,2
<i>Eucalyptus globulus</i>	66,2	44,4	21,8	27,8	2,4	0,2
<i>Pinus pinaster</i>	58,1	39,2	18,9	28,5	2,8	0,2
<i>Albies balsamea</i>	69,0	42,0	27,0	29,0	1,8	0,2
<i>Picea abies</i>	66,8	41,7	25,1	28,3	1,6	0,2
<i>Tsuga canadensis</i>	64,0	41,0	23,0	33,0	2,8	0,2
<i>Quercus ilex</i>	71,2	43,0	28,3	16,3	n.d	n.d
Brutia pine	75,5	47,0	28,5	26,1	2,8	0,4
Măslin	65,8	41,5	24,3	15,6	17,0	1,4

n.d -nedeterminat

Lemnul de brad conține 70% carbohidrați. Conținutul de umiditate din lemn a fost de 10% iar conținutul de solide totale a fost de 90%. Conținutul mare de carbohidrați îl recomandă ca materie primă pentru obținerea de bioetanol.



### 3.3.3 Compoziția fracției solide

După fiecare experiment, fracția solidă se analizează pentru determinarea conținutului de celuloză, lignină și hemiceluloze reziduale (tabel 3.4).

**Tabel 3.4** Randamentul pretratamentului și compoziția fazelor solide rezultate după autohidroliză, la diferite temperaturi și timpi de staționare

Parametru	180°C			190°C			200°C		
	5	10	15	5	10	15	5	10	15
Randament în solide (g/100 g materie primă, subs. uscată)	81,5	79,5	76,5	75,3	74,6	73,6	73,1	72,2	71,9
Compoziția solidelor (g/100 g lemn autohidrolizat, subs. uscată)	93,4	96,9	89,4	92,9	98,9	96,9	95,6	98,2	94,4
Celuloza	48,6	56,6	50,6	52,3	57,8	55,9	56,3	59,5	54,9
Hemiceluloze	6,2	4,7	4,2	3,8	3,3	2,5	1,1	0,0	0,0
Lignina	38,6	35,6	36,6	36,8	37,8	38,5	38,2	38,7	39,5

Randamentul în fracția solidă recuperată după autohidroliză variază între 71,9–81,5 g/100 g materie primă. Acesta descrește cu creșterea temperaturii de reacție și a timpului de staționare și variația este atribuită, în principal, descreșterii conținutului în hemiceluloze, datorită hidrolizei acesteia în faza lichidă.

### 3.3.4 Compoziția fracției lichide

Hemicelulozele au fost analizate pentru determinarea conținutului de zaharuri monomere și oligomere, furfural, 5-hidroximetifurfural și acid acetic. Pentru analiza carbohidraților, furfuralului și HMF au fost elaborate și validate noi metode de analiză bazate pe cromatografia în faza gazoasă. Pentru fiecare metodă de analiză elaborată s-a stabilit în detaliu modul de lucru, aparatura folosită, validarea metodei (limitele de detecție, limitele de cuantificare, repetabilitatea, reproductibilitatea, curbele de calibrare) cât și rezultatele și comentariile specifice pentru justificarea și precizarea importanței acestora.

### 3.3.4.1 Metodă nouă de identificare și cuantificare a carbohidraților din hemiceluloză, prin GC-MS

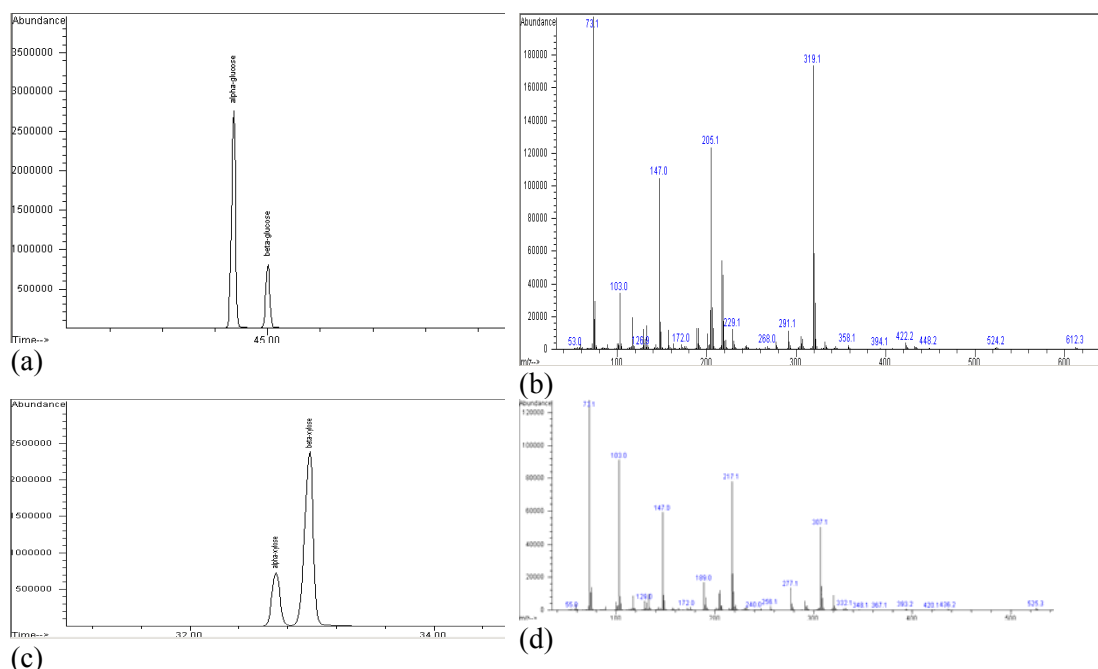
Scopul acestui studiu a fost dezvoltarea și validarea unei metode noi de analiză a carbohidraților obținuți din biomasa lemnoasă, ca etapă intermediară pentru producerea de bioetanol. În acest studiu, au fost cuantificați carbohidrații din lemn prin gaz cromatografie (GC) după derivatizare. Cuantificarea carbohidraților a fost realizată după extracția lichid-lichid, oximare și sililare, și în final, prin analiza gaz cromatografică cuplată cu spectrometria de masă (GC-MS). Zaharurile monomere au fost identificate în funcție de timpii de retenție în GC și fragmentarea lor în MS. BSTFA a fost folosită ca agent de reacție pentru prepararea derivaților trimetilsilil a produșilor de hidroliză a hemicelulozelor după pretratament. Au fost analizate zaharurile standard, iar caracteristicile lor sunt date în Tabelul 3.6.

**Tabel 3.6** Caracteristicile zaharurilor standard analizate prin GC-MS

Zaharuri	Formula moleculară	Masa moleculară	Masa moleculară –oximă-TMS	Timp de retenție (min $\alpha$ -, $\beta$ -)	$m/z$
D-xiloza	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	150	569	32,710; 32,985	73,103, 217
D-arabinoza	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	150	569	33,002; 33,177	73,103, 217
D-galactoza	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	180	627	43,853; 45,050	73,319, 205
D-manoza	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	180	627	44,026; 44,955	73,319, 205
D-glucoza	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	180	627	44,363; 45,010	73, 319,205

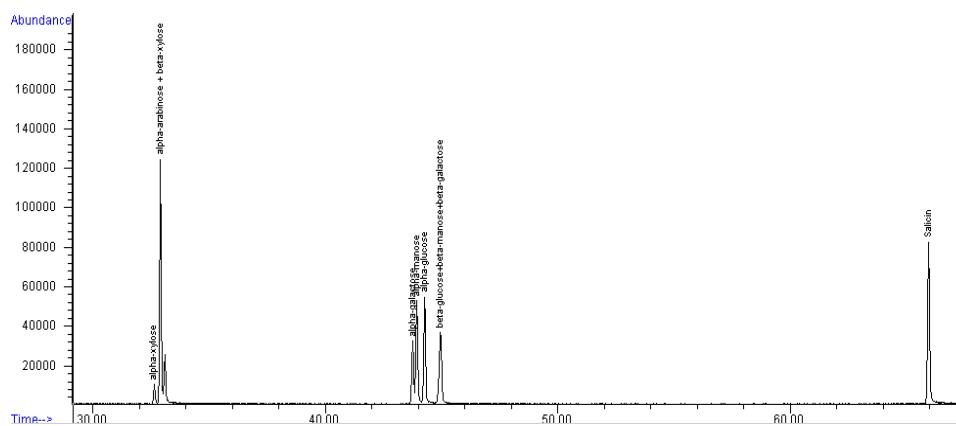
Fiecare standard a fost analizat individual prin oximare și sililare pentru determinarea timpului de retenție al fiecărui izomer (Figura 3.13).

Hexozele (glucoza, galactoza și manoză), care conțin cinci grupări hidroxil, au dus la formarea derivaților cu șase grupări TMS sililate, pe când pentozele (arabinoza și xiloza), care conțin patru grupări hidroxil, au condus la formarea a cinci grupări TMS sililate. Fiecare standard a fost analizat individual prin oximare și sililare pentru determinarea timpului de retenție al fiecărui izomer.



**Figura 3.13** Exemple de date GC-MS ale zaharurilor standard.: (a) D-glucozei; (b); spectrul de masă al glucoză-oximă-TMS (c) D-xilozei; (d); spectrul de masă al xiloza-oximă-TMS

Cromatogramele GC a carbohidraților sintetizați prin oximare și sililare a amestecului de zaharuri folosind standard intern sunt prezentate în figura 3.14.

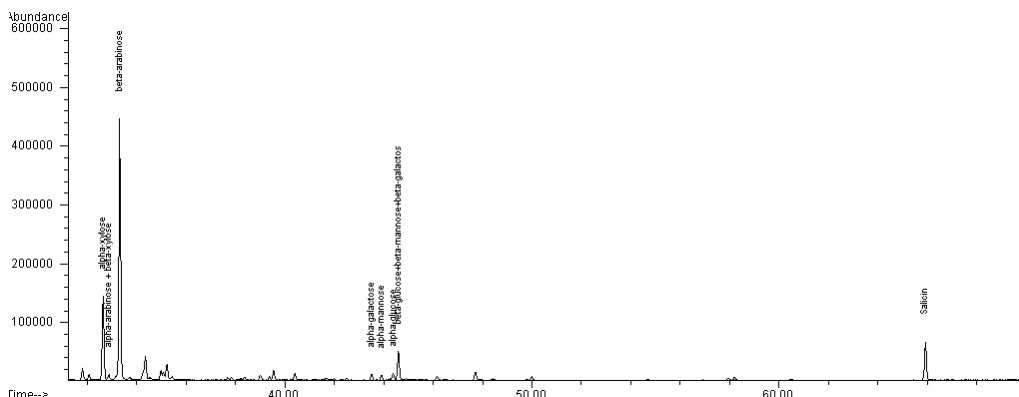


**Figura 3.14** Cromatograma GC a derivaților TMS ai compuşilor de referință ( $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ )

Din cauza timpilor de retenție foarte apropiați, picurile unor compuși se suprapun, iar unii izomeri nu pot fi separați datorită procesului de epimerizare. Picurile  $\alpha$ -arabinozei și  $\beta$ -xilozei nu pot fi separate și de asemenea, picurile  $\beta$ -glucozei,  $\beta$ -manozei și  $\beta$ -galatozei corespund aceluiași valori ale timpului de retenție.

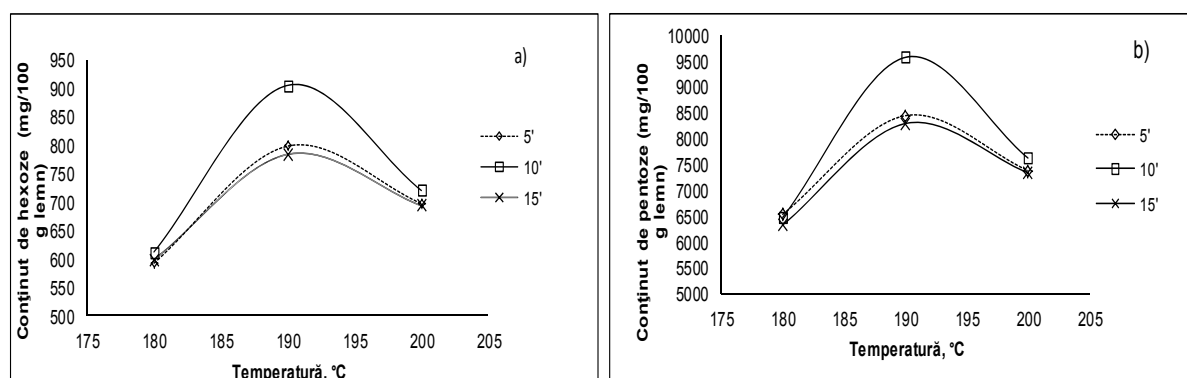
*Analiza carbohidraților din lemn*

Cromatograma carbohidraților corespunzători hemicelulozelor, obținuți din lemn prin metoda de pretratament este prezentată în figura 3.15. Carbohidrații au fost identificați prin coincidența timpilor de retenție și a spectrelor de masă cu cele ale standardelor.



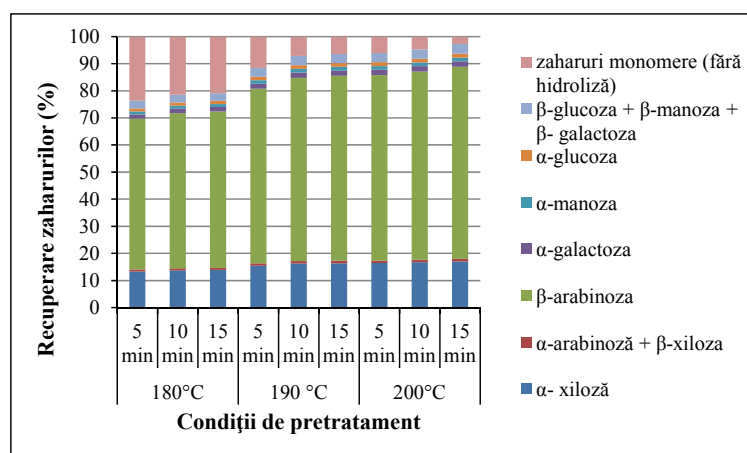
**Figura 3.15** Cromatograma GC a derivaților TMS ai zaharurilor rezultate din hemicelulozele din lemnul de brad (190°C, 10 min)

În figura 3.17 este prezentată variația conținutului în zaharuri hexozice (a) și pentozice (b) în funcție de condițiile de pretratament.



**Figura 3.17** Variația conținutului în hexoze și pentoze în filtrat în funcție de condițiile de pretratament

În figura 3.19 este prezentată variația conținutului în zaharuri rezultat din fracția hemicelulozică și procentul de recuperare zaharuri în funcție de condițiile de pretratament. Procentul de hemiceluloze recuperate sub formă de zaharuri (monomere sau oligomere) se încadrează în domeniul 34–47%.



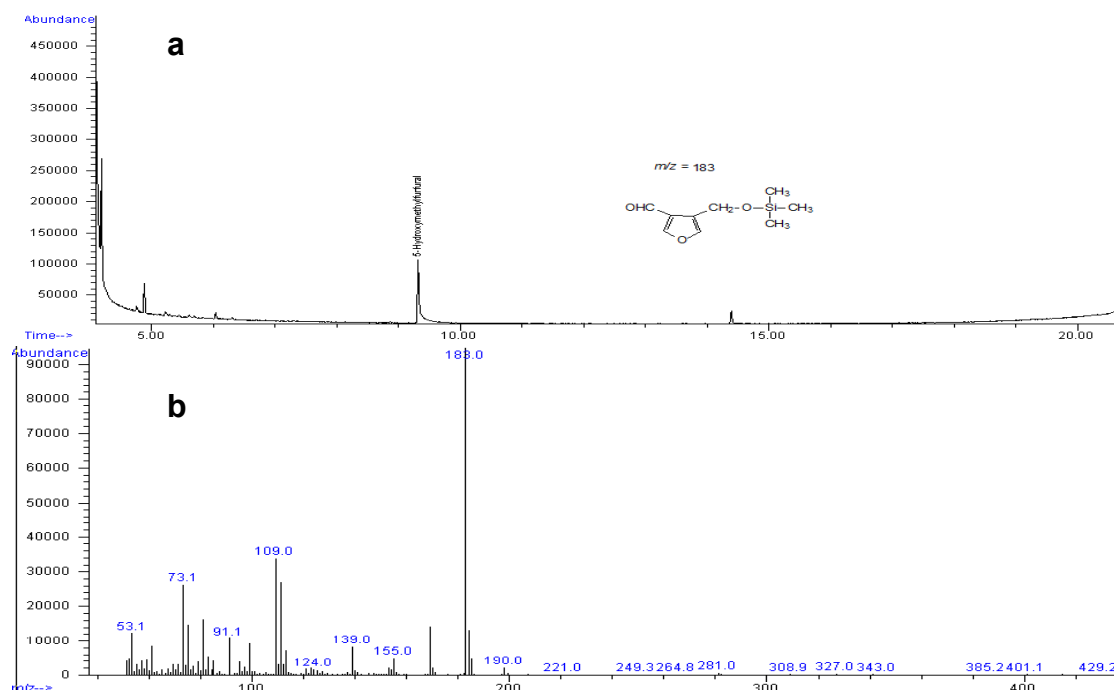
**Figura 3.19** Variația conținutului de zaharuri monomere și oligomere din filtratul de la autohidroliza hemicelulozelor

### 3.3.4.2 Metodă de analiză a 5-hidroximetilfurfuralului (HMF) prin GC-MS

Scopul acestui studiu a fost dezvoltarea și validarea unei metode noi de analiză a 5-hidroximetilfurfuralului (HMF) prin gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă, din fracția solubilă în apă a lemnului, după pretratamentul de autohidroliză. Au fost utilizate două metode de extracție a HMF din fracția de lemn solubilă în apă: extracția lichid-lichid (LLE) cu diclorometan și extracția utilizând o fază solidă (SPE), și s-a făcut o comparație a parametrilor analitici ai celor două metode. HMF este produs rezultat prin degradarea hexozelor (glucoză, manoză și galactoză) prezente în compoziția hemicelulozelor din lemn.

În figura 3.21 se prezintă cromatograma unei soluții standard de 5-hidroximetilfurfural. Timpul de retenție pentru HMF a fost de 9,321 minute.

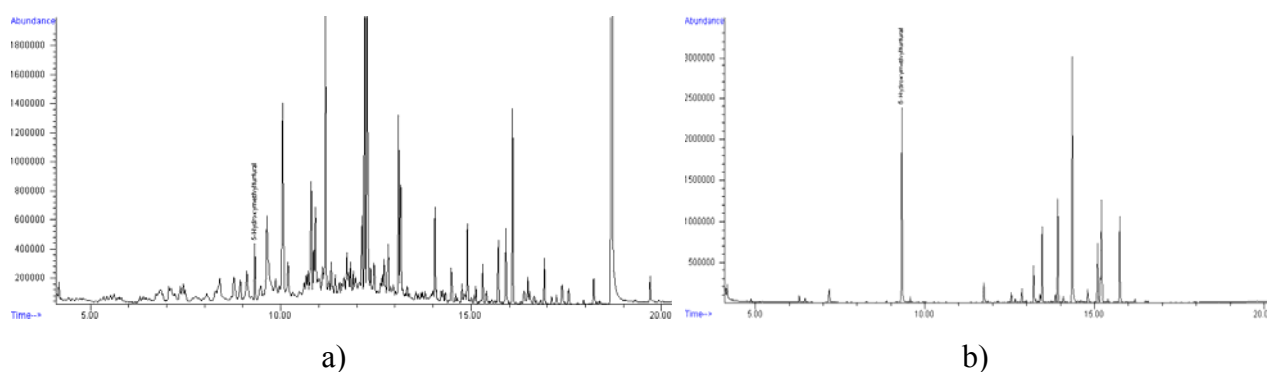
A fost optimizată procedura de derivatizare și procedura de extracție pentru fiecare metodă. Deoarece HMF conține o singură grupare hidroxil, se formează un singur derivat TMSi. Monoderivatul de HMF a fost evidențiat prin prezența ionilor  $m/z$  183, 169, 109, ceea ce indică sililarea unei singure grupări hidroxil. Ionul de la  $m/z$  183 corespunde ionului  $[M-CH_3]^+$  care a fost selectat pentru cuantificare și ionul molecular de la  $m/z$  169 corespunde  $[M-COH]^+$  și 109 corespunde lui  $[M-OTMS]^+$ .



**Figura 3.21** Datele GC-MS pentru standardul de HMF: (a) Cromatograma GC-MS a derivatului HMF; (b) spectrul de masă al derivatului HMF-TMS

*Metode de extracție SPE și LLE pentru extracția HMF din produse rezultate din lemn – studiu comparativ*

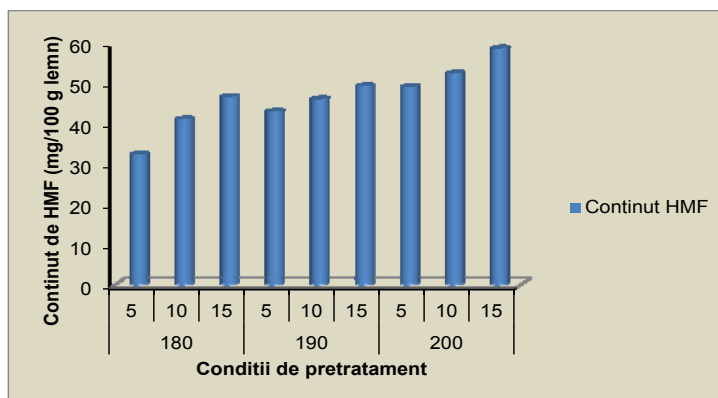
Probele rezultate din autohidroliza hemicelulozelor au fost analizate în vederea determinării compoziției în HMF prin ambele procedee de extracție. Cromatogramele HMF înregistrate pentru fracția lichidă obținută după autohidroliză (190°C) și extracția lichid și SPE sunt prezentate în figurile 3.22 a și 3.22 b.



**Figura 3.22** Cromatograma compusului HMF-TMS obținut prin: (a) LLE și (b) SPE

Conținutul de HMF determinat pentru produsele de autohidroliză din fracția hemicelulozică, în funcție de condițiile de pretratament este reprezentat în figura 3.23.

**Figura 3.23** Compoziția în HMF din fracția hemicelulozică în funcție de condițiile de pretratament



### 3.3.4.3 Metodă de analiză a furfuralului prin GC-MS

Au fost elaborate și comparate două metode de extracție: lichid-lichid (LLE) și microextracția pe fază solidă în headspace (HS-SPME), urmate de analiza gaz cromatografică a furfuralului din hidrolizatele hemicelulozice. Pentru fiecare metodă s-au determinat liniaritatea, limitele de detecție, limitele de cuantificare, recuperarea și reproductibilitatea (Tabel 3.13).

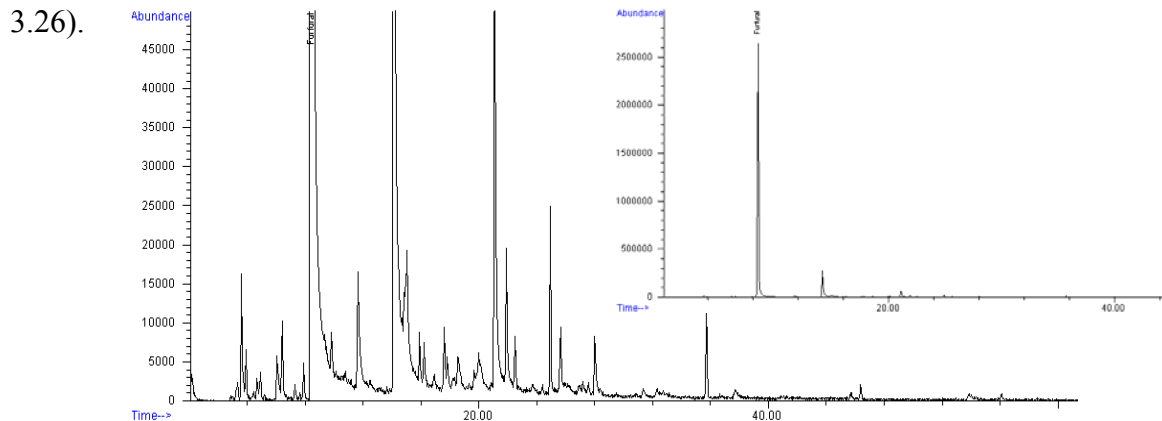
**Tabel 3.13** Domeniul de liniaritate, coeficientul de corelație, limitele de detecție, limitele de cuantificare și recuperarea obținute pentru fiecare metodă, pentru analiza furfuralului din hidrolizatele hemicelulozice

Metoda	Linearitatea		Limita de detecție ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Limita de cuantificare ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	RSD (%) $n=5^a$	Recuperare (%) (media $\pm$ deviația standard, $n=5$ )
	Domeniu ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	$R^2$				
LLE	10–350	0,995	3,0	9,0	10,5	78 $\pm$ 6,3
HS-SPME	0,1- 35	0,999	0,03	0,09	7,3	95 $\pm$ 5,9

<sup>a</sup> Deviația standard relativă

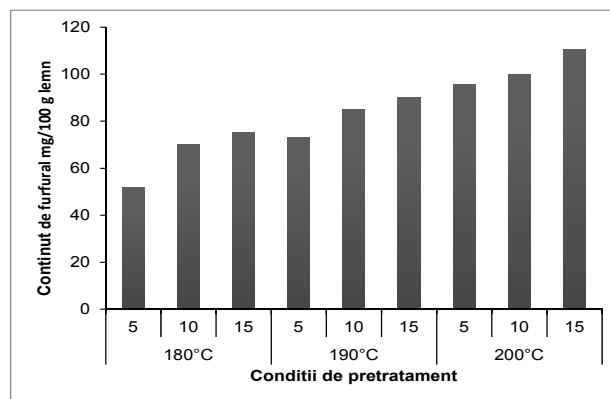
### Compoziția furfuralului din hidrolizatele hemicelulozice

Furfuralul a fost analizat prin GC-MS după extracția lichid-lichid și „headspace” SPME, metode fără derivatizare (Figura



**Figura 3.26** Cromatograma hidrolizatelor hemicelulozice obținută după extracția HS-SPME a probei pretratate la 180°C timp de 10 min

În figura 3.27 este reprezentat grafic conținutul de furfural din fracția lichidă de la autohidroliză în funcție de condițiile de reacție.



**Figura 3.27** Conținutul de furfural din fracția lichidă de la autohidroliza obținută după pretratarea lemnului (concentrație mg/100 g lemn)

Concentrația în furfural obținută după autohidroliza lemnului înregistrează o creștere liniară în funcție de temperatură și timp.

### 3.3.6 Analiza statistică prin folosirea sistemelor fuzzy neuronale adaptative (ANFIS)

Variația componentelor hemicelulozice și a fracției celulozice (denumite variabile dependente) și a variabilelor independente au fost stabilite folosind modelul neuronal de tip fuzzy bazat pe ecuația (3.18):

$$Y_e = \frac{\sum_{l=1}^m y^l R_l}{\sum_{l=1}^m R_l} \quad (3.18)$$

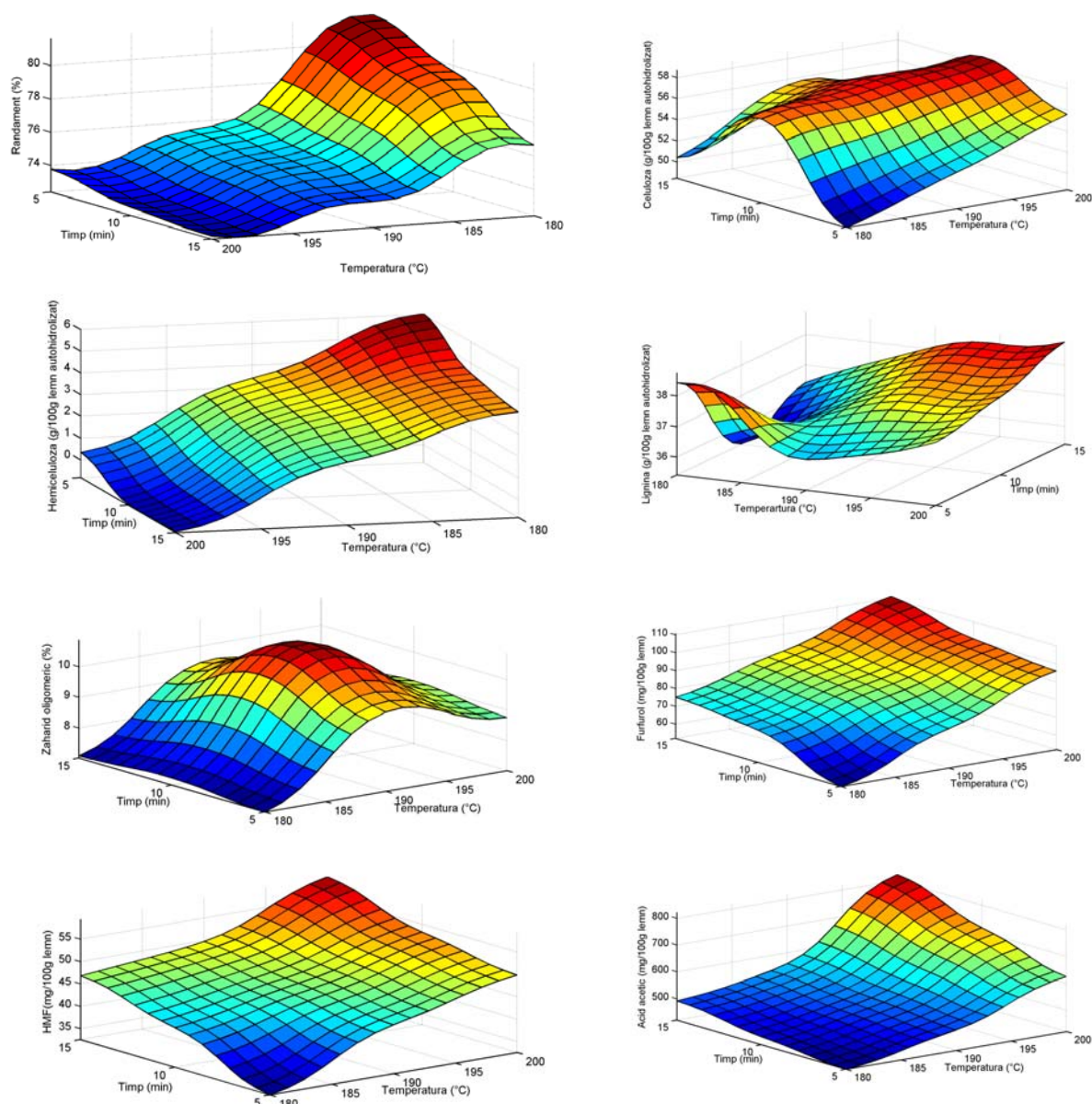


unde:  $Y_e$  este valoarea estimată a variabilelor de ieșire,  $m$  este numărul de reguli,  $n$  este numărul de variabile de intrare,  $y^j$  este defuzificatorul,  $R_l$  sunt regulile fuzzy (este definit ca produsul celor  $n$  funcții membre).

Cu cele două variabile independente, s-au stabilit nouă reguli fuzzy ( $R_i$ ) cu funcțiile membre de tip Gaussian pentru variabilele independente cu trei nivele (mic, mediu și mare) pentru temperatură și timp. Cele trei nivele sunt pentru o variabilă independentă.

Datele experimentale obținute din analiza fracției solide rezultate după pretratarea de autohidroliză au fost procesate cu modelul ANFIS. Modelul propus folosește două variabile independente (temperatura și timpul de staționare) și o variabilă dependentă procesată cu funcțiile membre de tip Gaussian la cele trei nivele (mic, mediu și mare) pentru estimarea valorilor parametrilor. În Figurile 3.29 -3.36 este prezentată variația parametrilor în funcție de temperatură și timp.

Conținutul fracțiilor solide și al fracțiilor lichide rezultate după pretratarea lemnului au fost modelate în funcție de variabilele independente (temperatura și timpul) folosind sistemul de editare ANFIS din softul MATLAB 7,0. S-a constatat că modelul matematic estimează cu eroare mai mică de 1% rezultatele experimentale.



*Figura 3.29 -3.36. Variația conținutului fracției solide și a fracției lichide rezultate după pretratament în funcție de variabilele independente*

## CAPITOLUL 4. DELIGNIFICAREA CU CLORIT DE SODIU A DEȘEURILOR LEMNOASE PRETRATATE

Scopul prezentului studiu este separarea celulozei din lemn prin două metode diferite: pretratamentul și delignificarea lemnului pretratată, și delignificarea directă a lemnului. Metoda de delignificare cu clorit de sodiu a fost folosită pentru eliminarea ligninei din lemnul netratat. Prin delignificarea directă a lemnului se obține holoceluloza, care este amestecul de celuloza și hemiceluloze.

În studiul prezentat în această teză, s-a aplicat pretratamentul de autohidroliză, pentru eliminarea hemicelulozelor și metoda de delignificare cu clorit de sodiu, pentru eliminarea ligninei cu scopul de a obține doar celuloza care este hidrolizată acid sau enzimatic la zaharuri. Pretratamentul cu clorit de sodiu degradează lignina datorită generării dioxidului de clor ( $\text{ClO}_2$ ), un produs oxidant al acidului cloruros ( $\text{HClO}_2$ ) și acidului hipocloros ( $\text{HOCl}$ ), formați în timpul reacției. Pretratamentul cu clorit este o metodă selectivă pentru degradarea ligninei, însă poate avea loc și degradarea celulozei dacă mediul de reacție este neutru. În aceste condiții, acidul acetic a fost folosit ca mediu de reacție pentru prevenirea degradării celulozei. Valorile randamentului în solide după autohidroliză și ale celui în solide după delignificare sunt date în Tabelul 4.1.

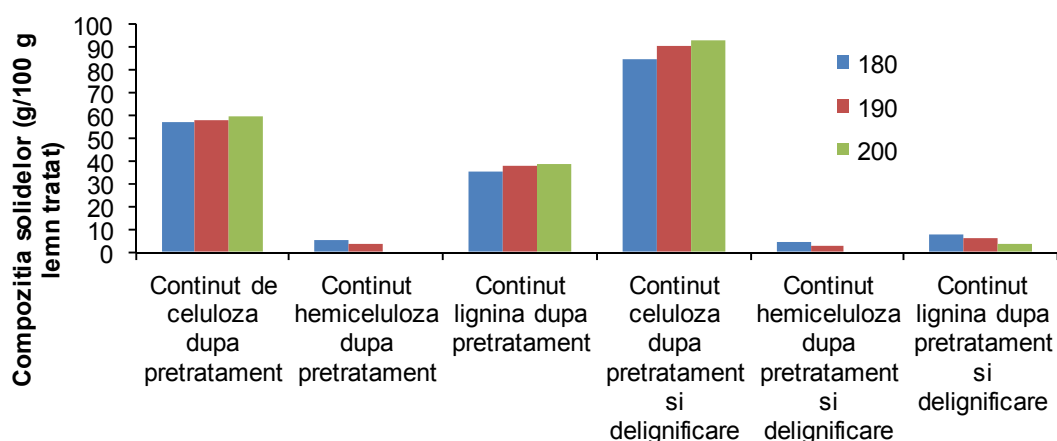
**Tabel 4.1** Compoziția solidelor obținute după pretratament și după delignificarea lemnului pretrat (a) și holocelulozei (b)

Parametru	180°C-a	190°C-a	200°C-a	Experiment b
Randament în solide (g/100 g materie primă, subs. uscată)	79,5	74,6	72,2	-
Compoziția solidelor (g/100 g lemn pretrat, subs. uscată)	96,9	98,8	98,2	-
Celuloza	56,6	57,8	59,5	-
Hemiceluloze	4,7	3,3	0,0	-
Lignina	35,6	37,8	38,7	-
Randamentul solidelor (g lemn pretrat și delignificat /100 g materie primă, subst. uscată)	47,6	42,9	39,5	76,1
Compoziția solidelor (g/100 g lemn pretrat și delignificat)	96,8	98,8	96,3	92,8
Celuloza	85,0	90,1	93,0	59,9
Hemiceluloze	4,4	2,5	0,0	26,7
Lignina	7,3	6,0	3,2	6,0

Rezultatele arată că randamentele de solide (79,5–72,2 g/100 g materie primă) ale lemnului pretrat descresc odată cu creșterea temperaturii de pretratament; acest lucru este datorat hidrolizei fracției hemicelulozice în fracția lichidă. Conținutul de celuloză (56,6–59,6 g/100 g lemn autohidrolizat) și lignină (35,6–38,7 g/100 g lemn autohidrolizat) confirmă că ambii componenți au fost recuperați în fracția solidă. Randamentele de solide delignificate

descresc odată cu creșterea temperaturii de pretratament; acest lucru este datorat solubilizării ligninei. În figura 4.2 se prezintă compoziția solidelor rezultate după fiecare proces.

Randamentul în solide recuperate după delignificare variază între 39,5–47,6 lemn tratat și delignificat, comparativ cu randamentul de delignificare de 76,1 lemn delignificat/100 g materie primă pentru lemnul delignificat direct nepretratat; acest rezultat este explicat de compoziția solidelor rezultate după etapa de delignificare; solidele lemnului pretratat - delignificat conțin doar celuloză și o mică parte din lignină, comparativ cu conținutul de solide din lemnul netratat-delignificat, care este format din celuloză și hemiceluloze.



*Figura 4.2* Influența temperaturii asupra compoziției solidelor rezultate după fiecare tratament aplicat

## CAPITOLUL 5. HIDROLIZA ACIDĂ A DEȘEURILOR LEMNOASE PRETRATATE

Autohidroliza implică separarea celulozei ca fracție solidă la temperaturi și presiuni ridicate. Materialul pretratat este separat prin filtrare în două fracții: material solid și fracția lichidă. Materialul solid (conține celuloză și lignină) poate fi supus direct hidrolizei sau este delignificat pentru eliminarea ligninei după care este supus hidrolizei la glucoză.

Scopul acestui capitol este obținerea glucozei din lemnul pretratat și din lemnul pretratat și delignificat prin hidroliza acidă cu acid sulfuric diluat în două etape de hidroliză.

Glucoza a fost obținută conform schemei prezentată în figura 5.1.

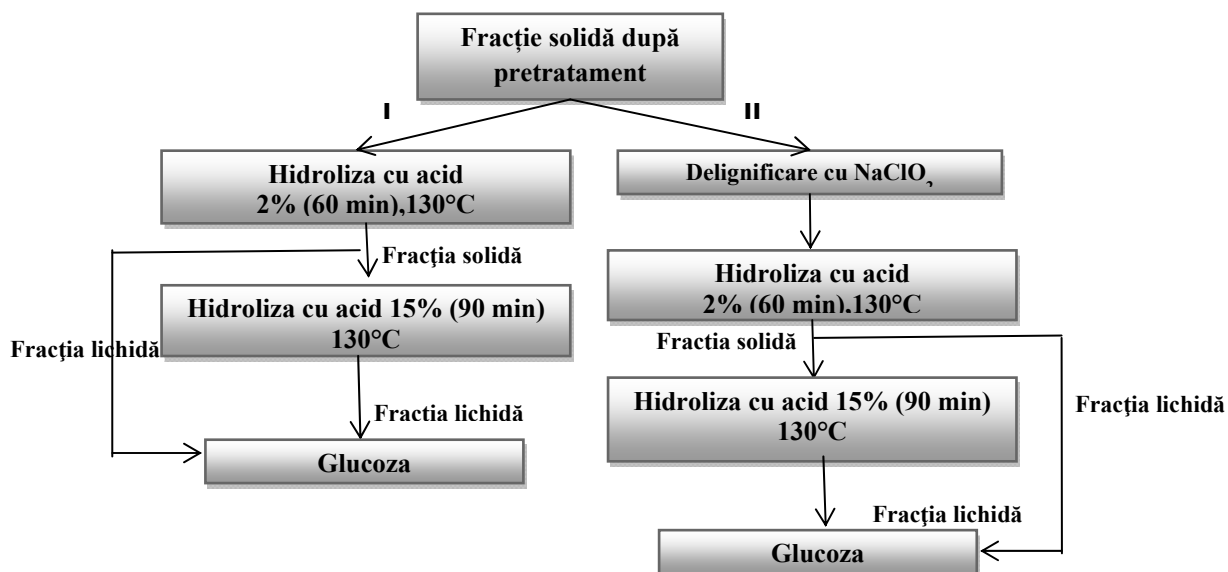


Figura 5.1 Obținerea glucozei din fracția solidă rezultată după pretratament

## 5.2 Metode analitice de determinare a glucozei din hidrolizate

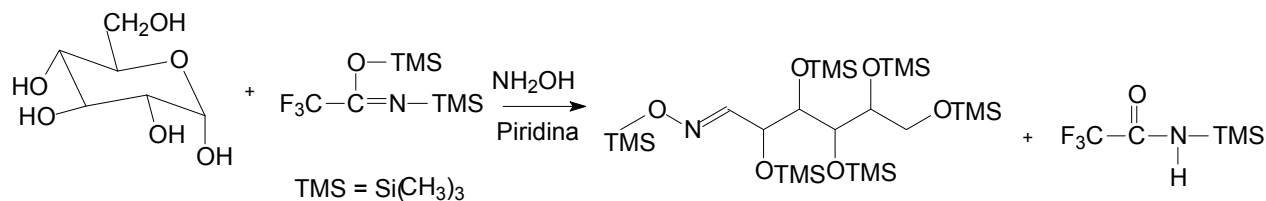
Dozarea glucozei din hidrolizatele acide s-a realizat prin două metode: **dozarea glucozei prin GC-MS** pentru evidențierea prezenței ambilor izomeri  $\alpha$ - și  $\beta$ - glucoză (subcapitolul 5.2.1- *metodă de dozare a glucozei rezultată din hidroliza fracției celulozice folosind GC-MS*), și **dozarea zaharurilor reducătoare** (subcapitol 5.2.2 - *metodă spectrofotometrică de dozare a zaharurilor reducătoare din hidrolizate*), metodă folosită pentru dozarea glucozei totale prin metoda spectrofotometrică folosind ca etaloane de calibrare soluții standard de monozaharidă.

### 5.2.1 Metodă de dozare a glucozei rezultată din hidroliza fracției celulozice folosind GC-MS

Scopul acestui subcapitol este dezvoltarea și validarea unei noi metode de dozare a glucozei obținută din lemn, după etapa de hidroliză.

Metoda se bazează pe derivatizarea fracțiilor ce conțin zaharuri cu un agent de sililare. Ca agenți de sililare s-au folosit: HMDS (hexametildisilazan) în acid trifluoroacetic (TFA) și BSTFA. Determinarea glucozei s-a realizat prin metoda de extracție lichid-lichid, și în final, dozarea prin gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS) [210].

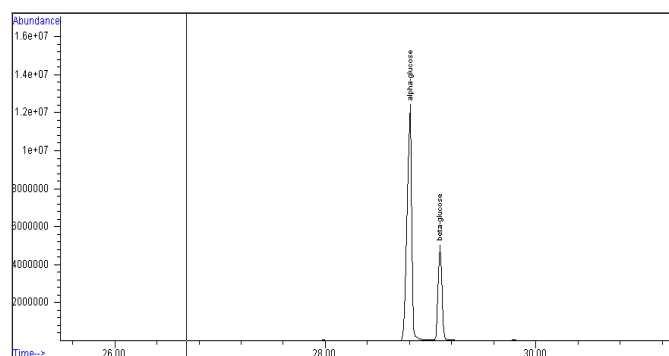
Reacția de sililare dintre glucoză și BSTFA este prezentată în schema 5.2:



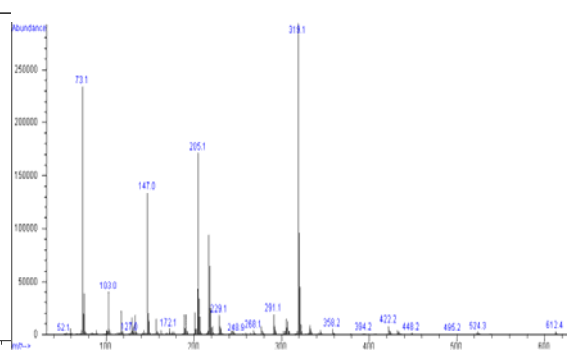
**Schema 5.2** Structura chimică a derivatului sililat de glucoza (BSTFA)

Glucoza se obține din biomasa de lemn atât după autohidroliză (o parte în fracția hemicelulozică), cât și după hidroliză. Separarea celulozei de hemiceluloze necesită un pretratament în condiții energice. Autohidroliza în prezența apei este o metodă fizico-chimică de separare a celulozei. Frația solidă obținută după pretratament este hidrolizată chimic sau enzimatic.

În figura 5.2a se prezintă cromatograma glucozei obținută după oximarea cu hidroxilamină și sililare cu BSTFA iar în Figura 5.3 se prezintă spectrul de masă al derivaților hexasililați.



**Figura 5.2a** Cromatograma SIM a standardului de glucoză după oximare și sililare cu BSTFA



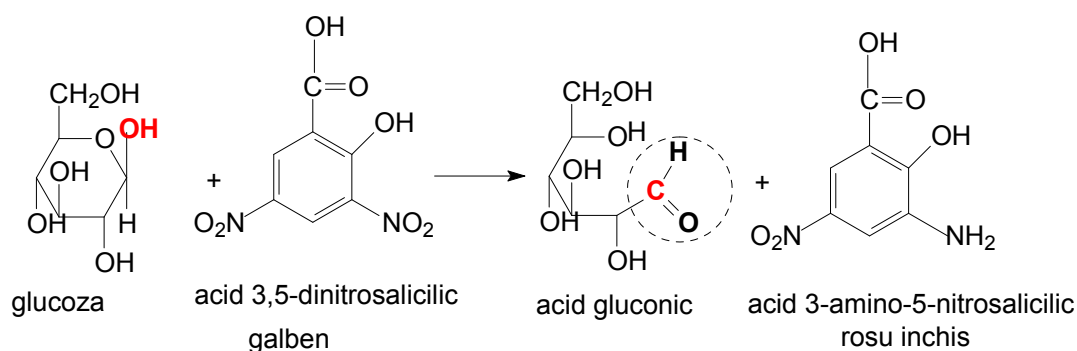
**Figura 5.3** Spectrul MS pentru analiza cantitativă și calitativă a derivaților sililați ai glucozei

Limita de detecție (LOD) pentru glucoză a fost calculată ca fiind „concentrația care corespunde la de trei ori abaterea standard a matorului/referinței” (criteriu 3s, 10 probe mator independente pentru fiecare compus analizat). Limita de detecție a fost calculată ca fiind 0,222 micrograme pentru 1 $\alpha$ -glucoză și respectiv 0,171 micrograme pentru 1 $\beta$ -glucoză.

## 5.2.2 Metodă spectrofotometrică de determinare a zaharurilor reducătoare din hidrolizate

În determinarea carbohidraților, a fost folosită tehnica colorimetrică pentru estimarea concentrației de zaharuri din probele obținute, metoda care utilizează acidul 3,5-dinitrosalicilic (DNS).

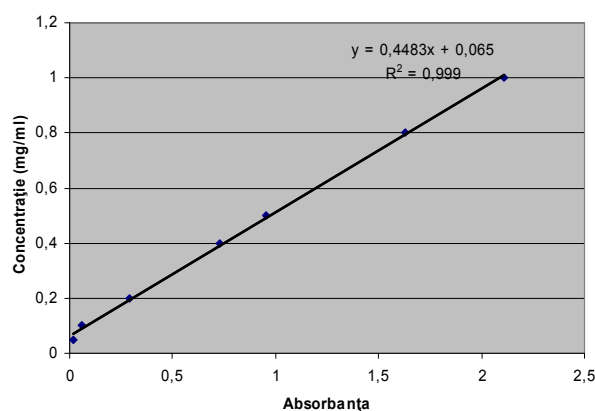
Soluția de DNS are culoare galbenă, dar după reacția cu zaharurile reducătoare reactivul se transformă în acid 3-amino-5-nitrosalicilic, de culoare roșu închis.



*Schema 5.4* Reacția dintre glucoză și reactivul DNS

Metoda de determinare spectrofotometrică directă a zaharurilor reducătoare are următoarele avantaje: este o reacție directă; măsoară capacitatea reducătoare a glucozei; folosește o reacție care se bazează pe modificarea culorii de la galben la roșu închis care se decelează la lungimea de undă de 540 nm; este o reacție stoichiometrică, cantitatea de zaharuri reducătoare este exprimată în glucoză.

Cu ajutorul metodei DNS se poate determina concentrația tuturor glucidelor reducătoare din mediul de hidroliză, nu doar a glucozei.



*Figura 5.4* Curba de calibrare în cazul dozării zaharurilor reducătoare prin metoda cu DNS

### 5.3 Hidroliza acidă a componentei celulozice obținute din deșeurile lemnoase

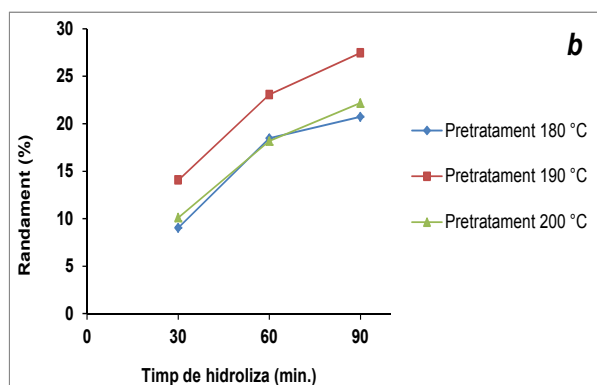
Hidroliza acidă a fost realizată folosind ca materie primă: (a) lemnul rezultat după autohidroliză în diferite condiții de temperatură și timp de staționare și (b) materialul pretratată-delignificat. Experimentele au fost conduse având în vedere că pretratarea s-a realizat la 180, 190 și 200°C, folosind ca timp de staționare 10 minute (condiții de pretratament optime). Reacția în două etape de hidroliză cu acid a fost folosită în cazul celulozei din fracția solidă rezultată din lemnul de brad.

#### 5.3.2 Hidroliza cu acid sulfuric diluat a lemnului pretratată

În literatura nu au fost găsite date privind aplicarea hidrolizei acide asupra lemnului pretratată și delignificat cu clorit de sodiu. În cadrul acestui studiu, s-a folosit ca metodă de hidroliza, tratamentul cu acid sulfuric diluat, în două etape.

Având în vedere considerentele prezentate mai sus, s-a stabilit că hidroliza cu acid sulfuric diluat trebuie să se realizeze în două etape: prima, în care concentrația de acid să fie de 2%, urmată de a doua etapă, în care concentrația de acid să crească la 15%. Aceste condiții de hidroliză acidă au fost stabilite pentru a realiza o degradare mai redusă a celulozei.

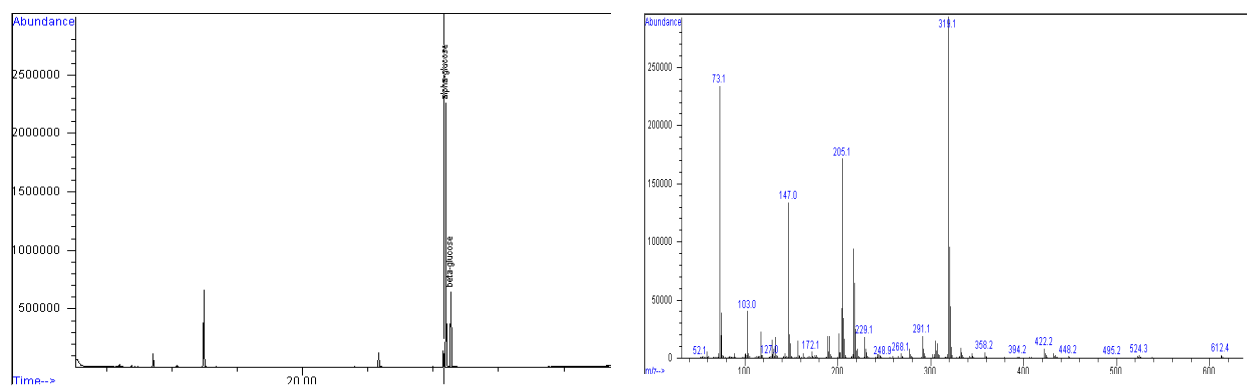
În figura 5.5 (b) sunt prezentate randamentele de hidroliză acidă determinate din valorile zaharurilor reducătoare pentru fiecare etapă de hidroliză acidă cu 15% acid sulfuric.



**Figura 5.5** Randamentele reacției de hidroliză acidă, exprimate ca și concentrație a zaharurilor reducătoare obținute după hidroliza acidă, pentru: hidroliza II (15 %  $H_2SO_4$ ) la 30, 60 și 90 min

Cromatograma hidrolizatului care conține glucoză rezultat la folosirea acidului sulfuric diluat în două etape, este prezentată în Figura 5.6.





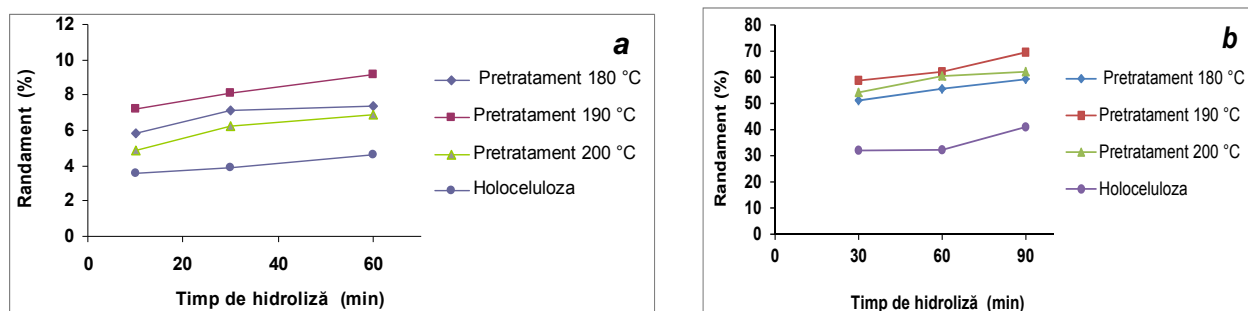
**Figura 5.6** Cromatograma glucozei-TMS oximate obținută din hidroliza chimică cu acid sulfuric diluat

Cei doi izomeri de glucoză se găsesc în hidrolizat în raportul molar de 4:1 ( $\alpha$ -glucoză/ $\beta$ -glucoză).

Hidroliza acidă a lemnului rezultat după autohidroliză a avut loc în două etape. După prima etapă de hidroliză, cu 2%  $H_2SO_4$ , s-au obținut randamente foarte mici de hidroliză. După hidroliza cu 15%  $H_2SO_4$  s-a înregistrat cel mai mare randament, de 27%, pentru lemnul pretratată la 190°C, ceea ce înseamnă că prezența ligninei în hidroliza acidă acționează ca un inhibitor al hidrolizei.

### 5.3.3 Hidroliza cu acid sulfuric diluat a lemnului pretratată și delignificat

În figurile 5.8 (a și b) sunt prezentate randamentele de hidroliză acidă a materialului pretratată și delignificat, determinate din valorile zaharurilor reducătoare pentru fiecare etapă de hidroliză acidă.



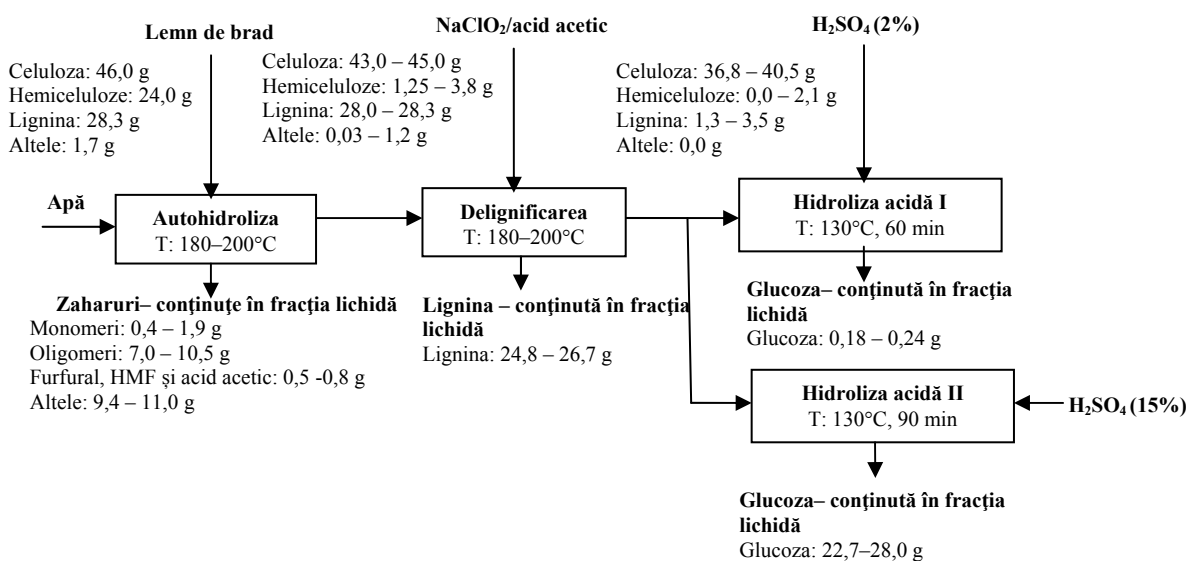
**Figura 5.8** Randamentele hidrolizei acide, exprimate ca și concentrație a zaharurilor reducătoare obținute după hidroliza acidă a materialului pretratată și delignificat, pentru: (a) hidroliza I (2%  $H_2SO_4$ ) la 10, 30 și 60 min și (b) hidroliza II (15%  $H_2SO_4$ ) la 30, 60 și 90 min

Randamentele hidrolizei acide au fost evaluate pentru 10, 30 și 60 minute pentru hidroliza cu  $H_2SO_4$  2%, respectiv la 30, 60 și 90 minute pentru hidroliza materialului tratat și delignificat cu  $H_2SO_4$  15%. Randamentul mai redus al hidrolizei acide cu 2% acid sulfuric

sugerează faptul că la concentrații mici ale acidului, celuloza din componența substratului hidrolizează cu dificultate, motiv pentru care este necesară continuarea reacției cu 15% acid sulfuric.

### 5.3.4 Randamentului global al procesului

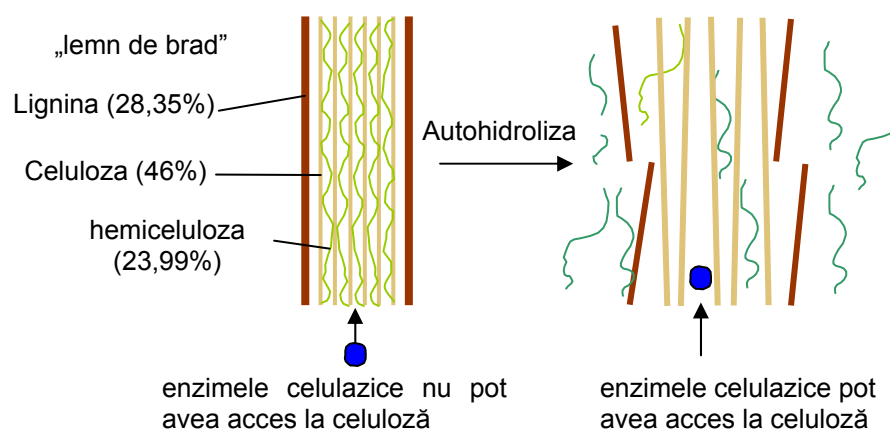
Bilanțul de materiale pentru procesul care implică autohidroliza și delignificarea înainte de hidroliza acidă este prezentat în figura 5.10.



*Figura 5.9 Bilanțul de materiale pentru obținerea glucozei prin hidroliza acidă a materialului pretratată-delignificat-hidrolizat acid în două etape*

## CAPITOLUL 6. HIDROLIZA ENZIMATICĂ A DEȘEURILOR LEMNOASE PRETRATATE

Comparativ cu hidroliza acidă, hidroliza enzimatică este mai promițătoare deoarece nu necesită substanțe chimice, este selectivă și compatibilă cu mediul înconjurător. Celulazele, enzimele care catalizează degradarea celulozei la glucoză reprezintă un amestec ce include endoglucanazele, exoglucanazele și β-glucozidazele.



**Figura 6.2** Reprezentarea schematică a structurii lemnului înainte de pretratament și după autohidroliză, precum și a posibilităților de acces al enzimelor la celuloză

Conținutul mare de lignină din lemn este principala barieră pentru hidroliza enzimatică a celulozei. În experimentele de hidroliză enzimatică s-au utilizat enzimele *Accelcellase 1500*, care au capacitatea de a hidroliza atât celuloza cât și hemicelulozele.

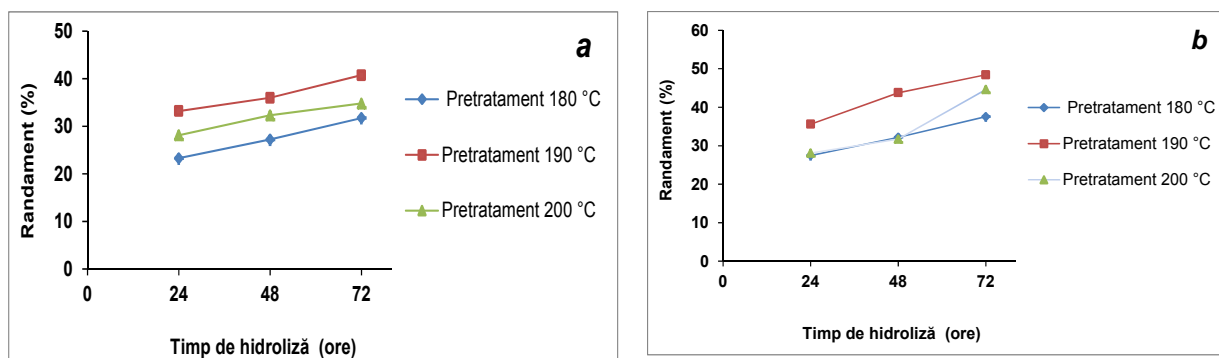
Scopul acestui capitol este prezentarea rezultatelor degradării enzimatice a materialului celulozic rezultat după etapa de pretratament la diferite temperaturi (180, 190 și 200°C), cât și după etapa de delignificare a lemnului pretratată pentru a evalua influența ligninei și hemicelulozelor asupra hidrolizei enzimatice.

## 6.2 Hidroliza enzimatică a deșeurilor lemnoase

Fracțiile solide rezultate după toate pretratamentele efectuate au fost supuse hidrolizei enzimatice modificând concentrația substratului. Concentrațiile substratului de 1% și 2% au fost evaluate în toate experimentele. Hidrolizatul enzimatic a fost analizat prin GC-MS pentru evaluarea componenților constituenți. Concentrația totală a produselor rezultate a fost evaluată ca zaharuri reducătoare. Aceasta exprimată în glucoză a fost monitorizată pe parcursul hidrolizei, prin prelevarea de probe la intervale de 24, 48 și 72 ore.

**Tabel 6.1.** Concentrația zaharurilor reducătoare (mg/g de substrat) rezultate la hidroliza enzimatică a lemnului pretrat

Substrat folosit la hidroliza enzimatică	Timp de hidroliză (ore)					
	1 % concentrația substratului			2 % concentrația substratului		
	24	48	72	24	48	72
Pretrat (180°C)	258,6	302,5	352,6	305,3	357,8	417,5
Pretrat (190°C)	368,9	399,9	452,6	395,6	486,5	538,1
Pretrat (200°C)	312,6	358,9	386,5	312,1	352,5	496,1

**Figura 6.4** Randamentele de hidroliză enzimatică a lemnului pretrat la 24, 48 și 72 ore, exprimate ca și concentrație de zaharuri reducătoare raportate la cantitatea de zaharuri din materia primă, pentru: (a) concentrația substratului de 1% și (b) concentrația substratului de 2%

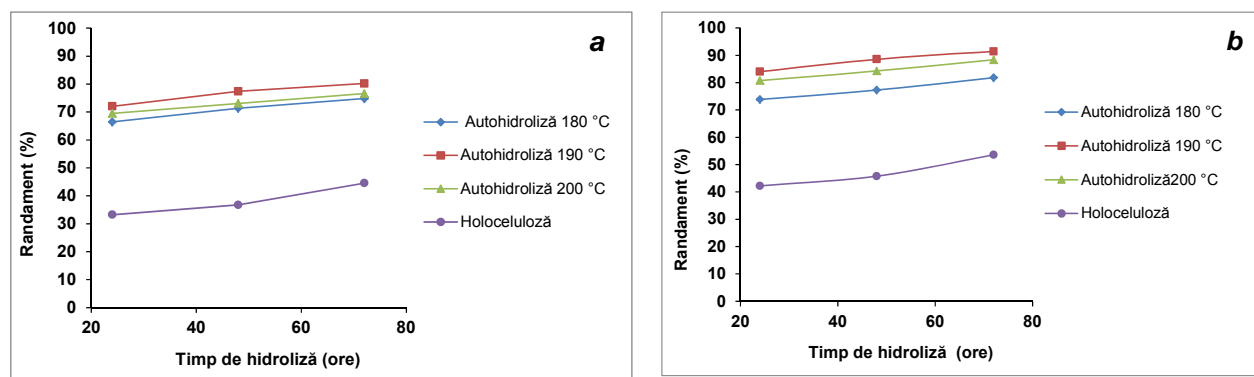
### 6.2.2 Hidroliza enzimatică a lemnului pretrat și delignificat

Concentrația în zaharuri reducătoare pentru lemnul delignificat și cel pretrat și delignificat a fost determinată și rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 6.2.

**Tabel 6.2.** Concentrația zaharurilor reducătoare (mg/g de substrat) obținută prin hidroliza enzimatică a lemnului de brad delignificat și a celui după autohidroliză și delignificat în diferite condiții de temperatură și concentrație a substratului

Substrat folosit la hidroliza enzimatică	Hidroliza enzimatică (ore)					
	1 % concentrația substratului			2 % concentrația substratului		
	24	48	72	24	48	72
Lemn delignificat (Holoceluloza)	369,3	408,4	495,1	469,3	508,4	595,1
Pretrat (180°C)	738,6	792,5	831,0	838,3	877,5	911,0
Pretrat (190°C)	800,2	859,9	891,0	919,9	969,9	998,2
Pretrat (200°C)	772,2	811,9	851,0	912,2	931,9	998,0

În figura 6.5 (a și b) se prezintă randamentele de hidroliză enzimatică determinate pentru valorile zaharurilor reducătoare la 24, 48 și 72 ore.

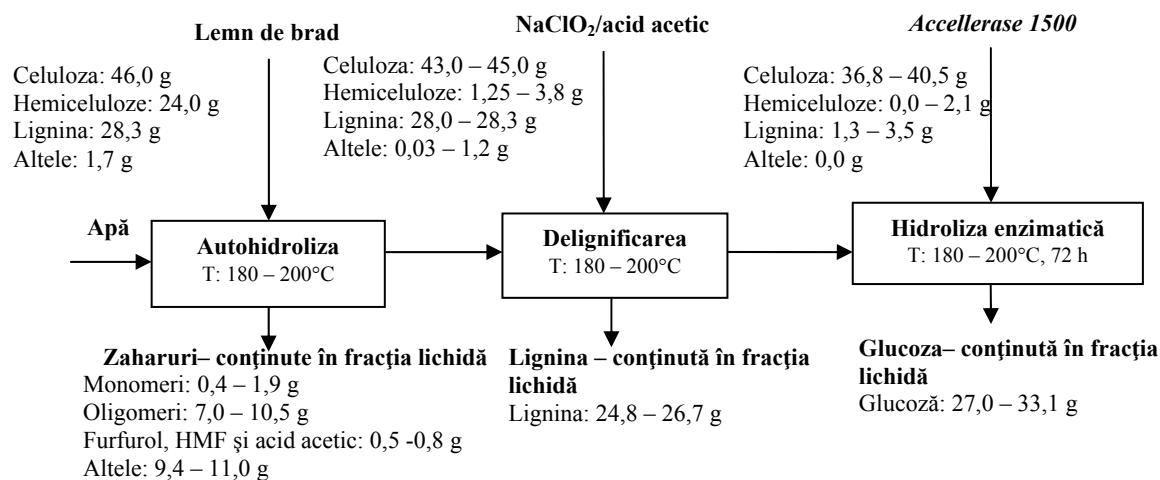


**Figura 6.5** Randamentele hidrolizei enzimaticе la 24, 48 și 72 ore, exprimate ca și concentrație în zaharuri reducătoare raportate la cantitate de zaharuri din material primă, pentru: (a) concentrația substratului de 1% și (b) concentrația substratului de 2 %

Rezultatele relevă faptul că, compoziția chimică a celor trei probe determină diferențe semnificative în reacția de hidroliză. În cazul lemnul pretratată se obține un randament maxim al hidrolizei enzimaticе de 40% (1% concentrația solidelor) și de 48% (2% concentrația solidelor), în timp ce pentru lemnul pretratată-delignificat se constată un randament maxim de 80% (1% concentrație solidelor) și de 91% (2% concentrație solidelor), folosind pretratamentul de autohidroliză la 190°C în toate cazurile.

Conținutul de lignină din lemnul pretratată determină o accesibilitate limitată a enzimei la celuloză, ceea ce sugerează că lignina este un component restrictiv pentru hidroliza enzimatică. Absența ligninei în cazul hidrolizei materialului delignificat face ca enzimele celulazice să aibă acces mai ușor la celuloză, fapt confirmat de randamentul mare al reacției.

Bilanțul de materiale pentru procesul ce implică pretratamentul lemnului este prezentat în Figura 6.7.



**Figura 6.7** Bilanțul de materiale pentru procesul de hidroliză enzimatică ce implică pretratarea lemnului

Din bilanțul de materiale (fig. 6.7) putem deduce că 33,16 g glucoză se pot produce din 46 g celuloză din lemn, după pretratarea de autohidroliză la temperatura de 190°C, delignificare cu clorit de sodiu în mediu acid și hidroliza enzimatică cu *Accellerase 1500*, la 2% concentrație a solidelor. Glucoza obținută după hidroliza enzimatică poate fi fermentată la bioetanol.

## CAPITOLUL 7. FERMENTAȚIA ZAHARIDELOR OBȚINUTE DIN DEȘEURILE LEMNOASE

### 7.1 Principiile generale ale fermentației

Scopul acestui studiu este evaluarea efectului de delignificare a lemnului asupra randamentului de bioetanol. Frațiile lichide rezultate după etapele de hidroliză acidă sau enzimatică, cu sau fără delignificare, au fost supuse fermentației cu *S. cerevisiae*.

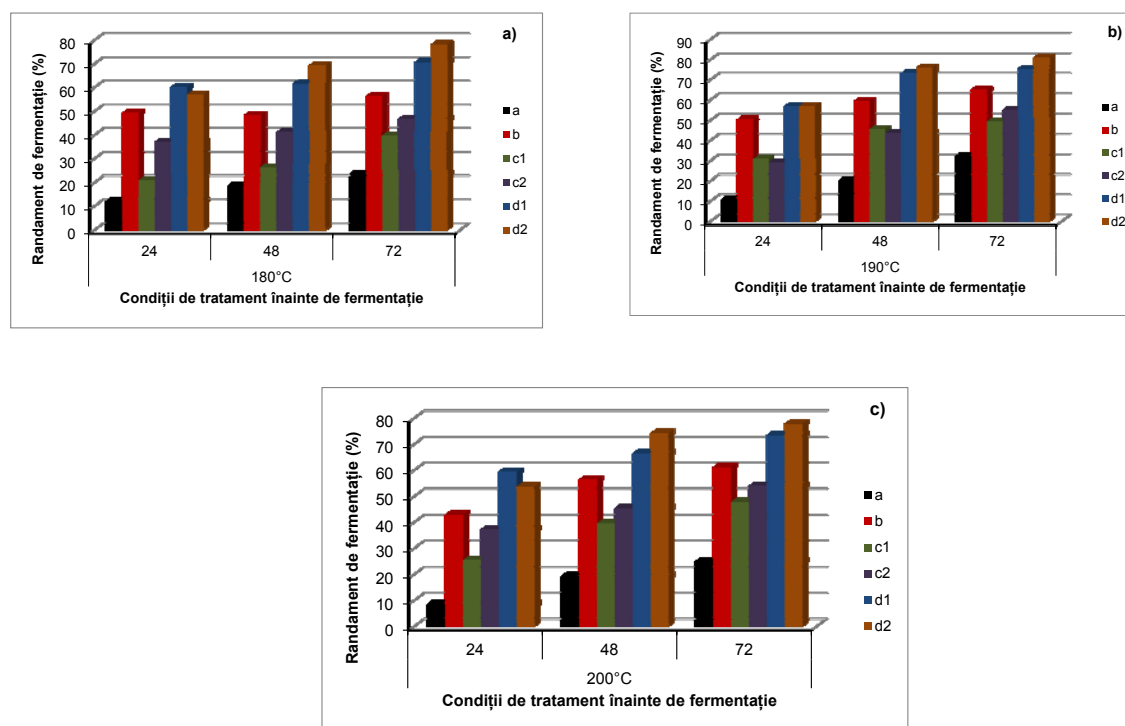
Obținerea bioetanolului de generația a 2-a din lemnul de brad (rumeguș) cuprinde următoarele etape:

- Pretratarea prin autohidroliză – prezentat detaliat în Capitolul 3 al acestei teze de doctorat;
- Delignificarea lemnului pretratat – eliminarea ligninei pentru accesibilitatea mai ușoară a enzimelor sau a acizilor la celuloză (Capitolul 4);

- Hidroliza acidă (Capitolul 5) a lemnului pretratată și a celui pretratată–delignificat sau hidroliza enzimatică a lemnului pretratată și a materialului pretratată–delignificat (Capitolul 6);
- Fermentația soluției de glucoză obținută atât din hidroliza acidă, cât și din cea enzimatică (analizată și prezentată în acest capitol).

## 7.2 Fermentația zaharidelor obținute din lemn la bioetanol

A fost validată o metodă de analiză a etanolului prin gaz cromatografie. Etanolul a fost analizat prin injectarea directă în GC-MS prin „headspace”. Concentrația în etanol a fost măsurată la intervale de 24, 48 și 72 ore pentru fiecare soluție de hidrolizat supusă fermentației cu drojdia de bere. Concentrațiile în etanol obținute pentru fiecare experiment în parte la intervale de 24, 48 și 72 ore de fermentație sunt prezentate în Figura 7.5.



**Figura 7.6** Variația randamentului de fermentație în funcție de condițiile de tratament înainte de fermentație la: (a) temperatura de pretratament de 180°C, (b) temperatura de pretratament de 190°C, și (c) temperatura de pretratament de 200°C (**a** – hidroliza acidă lemn pretratată, **b** - hidroliza acidă lemn pretratată și delignificat, **c1**-hidroliza enzimatică lemn pretratată (1%), **c2**-hidroliza enzimatică lemn pretratată (2%), **d1**- hidroliza enzimatică lemn pretratată și delignificat (1%) și **d2**-hidroliza enzimatică lemn pretratată și delignificat (2%))

Randamentele de fermentație sunt diferite în cazul substratelor hidrolizate acid sau enzimatic. Fermentația lemnului pretratată –hidrolizat acid (*experimentele a*) conduce la un randament maxim de 32% (temperatura de pretratament 190°C) comparativ cu randamentul

de fermentație în cazul lemnului pretratată-hidrolizat enzimatic (*experimentele c<sub>1</sub> și c<sub>2</sub>*) care are valoarea de 49% (concentrația solidelor în hidroliza enzimatică de 1%), respectiv 55% (concentrația solidelor în hidroliza enzimatică de 2%). Aceste rezultate relevă faptul că: în timpul hidrolizei acide se produc mai mulți inhibitori de hidroliză, fiind condițiile mai drastice (temperatură și condiții acide de hidroliză), comparativ cu condițiile de hidroliză enzimatică, care se caracterizează prin selectivitate și prin condiții mai blânde de reacție (pH neutru de hidroliză, temperatură scăzută și timp de reacție mai lung).

Fermentația hidrolizatelor din lemnului pretratată – delignificat oferă cel mai mare randament a cărui valoare este de 75,5% (*experimentul d<sub>1</sub>*), respectiv 80,9% (*experimentul d<sub>2</sub>*), la o temperatura de pretratament de 190°C, comparativ cu fermentația hidrolizatului acid al lemnului pretratată -delignificat pentru care s-a înregistrat un randament maxim de 65% (*experimentul b*) aplicând aceeași temperatura a pretratamentului. Temperatura de pretratament a lemnului influențează, comportarea materialului în procesele de delignificare, hidroliză enzimatică, și în fermentația produselor de reacție. În general, cele mai mari randamente ale fermentației s-au obținut în cazul autohidrolizei la temperatura de 190°C.

## CONCLUZII

În cadrul prezentului studiu, au fost studiate la nivel de laborator două procedee moderne (cu variante experimentale pentru fiecare) de obținere a bioetanolului care poate fi utilizat ca biocarburant de generația a 2-a, prin valorificarea superioară a deșeurilor lemnoase folosind: hidroliza acidă și cea enzimatică. A fost utilizată biomasa lignocelulozică de lemn de brad, datorită compoziției mari de celuloză și hemiceluloze.

A fost dezvoltată o metodă ecologică pentru pretratamentul deșeurilor lemnoase. Extracția hemicelulozelor din lemn s-a realizat prin pretratamentul de autohidroliză, metodă care a folosit apa la temperaturi și presiuni ridicate. Metoda de autohidroliză a separat componentele din lemn în două fracții: **fracția lichidă** care conține carbohidrați, lignina ușor solubilă și produși secundari, și **fracția solidă** care este alcătuită din celuloză și lignină.

A fost determinat conținutul de celuloză, lignină și hemiceluloze din fracția solidă recuperată după autohidroliză, ceea ce a confirmat că lignina și celuloza s-au recuperat aproape cantitativ în fracția solidă.

Au fost elaborate și validate 3 metode noi bazate pe gaz cromatografie și spectrometria de masă, acestea fiind:



- identificarea și cuantificarea carbohidraților din fracția hemicelulozică prin GC-MS, print-o metodă cu dublă derivatizare,
- dozarea 5-hidroximetilfurfuralului și
- dozarea furfuralului.

Pentru fiecare metodă au fost stabiliți parametrii de performanță: limitele de detecție, limitele de cuantificare, domeniile de lucru, studii de recuperare.

Au fost analizați carbohidrații din fracția hemicelulozică și s-a constatat că aceasta este formată dintr-un amestec de pentoze și hexoze.

A fost determinat HMF prin două metode de extracție: lichid-lichid și extracția pe fază solidă. Cele două metode de extracție s-au validat și comparat. Metoda de extracție SPE prezintă mai multe avantaje comparativ cu varianta LLE: grade de recuperare mai bune, rapiditate, consum redus de probă și reactivi, fiind astfel prietenoase în raport cu mediul. Conținutul de HMF din produsele de pretratare s-a încadrat în domeniul 0,03–0,06 g/100 g lemn, concentrația de HMF a crescut odată cu temperatura și timpul de pretratament.

A fost determinat furfuralul rezultat din fracția hemicelulozică prin două metode de extracție: lichid-lichid și headspace SPME. Conținutul de furfural s-a încadrat în domeniul 0,05 g–0,1 g/100 g lemn, în funcție de condițiile de pretratament.

A fost obținut un model matematic care a permis evaluarea conținutului fracțiilor solide și al celor lichide rezultate după pretratamentul lemnului în funcție de variabilele independente (temperatură și timp) folosind sistemul de editare ANFIS din softul MATLAB 7,0. S-a constatat că modelul matematic estimează cu eroare mai mică de 1% rezultatele experimentale.

A fost realizată delignificarea cu clorit de sodiu în mediu acid a lemnului pretratată și a celui netratat, pentru eliminarea ligninei înainte de hidroliză. S-a obținut celuloza după metoda de delignificare aplicată. Randamentele în solide recuperate după delignificarea cu clorit de sodiu au variat între 39,5–47,6 lemn tratat și delignificat/100 g materie primă, în funcție de condițiile experimentale, ceea ce a demonstrat că după metoda de delignificare se obține doar celuloza, cu mici urme de lignină. Eficiența metodei de delignificare s-a dovedit prin determinarea conținutului de lignină eliminată (92–96%) după etapa de delignificare. Celuloza obținută după etapa de delignificare și lemnul pretratată (ne-delignificat) este hidrolizată cu acid sulfuric diluat în două etape de reacție.

Au fost elaborate două metode de dozare a glucozei:

- o metodă nouă de dozare a glucozei prin gaz cromatografie (metodă de analiză calitativă)
- o metodă spectrofotometrică de dozare a zaharidelor reducătoare (metodă de analiză cantitativă).

A fost dezvoltată și validată o metodă nouă de determinare a glucozei din hidrolizatele lemnoase prin gaz cromatografie. Au fost evaluați parametrii de performanță pentru metodă: limita de detecție, limita de cuantificare, domeniu de lucru, studiile de recuperare. Metoda s-a bazat pe derivatizarea glucozei în două etape: oximarea și sililarea cu BSTFA, pentru evidențierea prezenței ambilor izomeri  $\alpha$ - și  $\beta$ - glucoză.

A fost dezvoltată o metodă de obținere a glucozei prin hidroliza chimică a materialelor celulozice rezultate după pretratament, în două etape de reacție. După prima etapă de hidroliză, cu 2%  $H_2SO_4$ , s-au obținut randamente foarte mici (0,6%). După hidroliza cu 15%  $H_2SO_4$ , a rezultat cel mai mare randament, de 27%, pentru lemnul pretratată la 190°C, ceea ce a dus la concluzia că prezența ligninei în substrat acționează ca un inhibitor al hidrolizei.

A fost elaborată o metodă de obținere a glucozei prin hidroliza chimică a materialelor celulozice rezultate după pretratament și delignificare, în două etape de reacție. Cel mai mare randament al hidrolizei acide (70%) s-a obținut pentru lemnul de brad autohidrolizat – delignificat (condiții de pretratament: 190°C, presiunea de 60 de bari și un timp de staționare de 10 minute). Rezultatele au arătat că hidroliza cu acid sulfuric 15% este necesară pentru creșterea randamentului.

Au fost studiate metode de obținere a glucozei prin hidroliza enzimatică a: lemnului autohidrolizat, lemnului autohidrolizat – delignificat și, lemnului delignificat (netratat).

Bilanțul de materiale arată că din 100 g lemn se obțin 33 g glucoză, după pretratamentul de autohidroliză la temperatura de 190°C, presiunea de 60 bari, timpul de reacție de 10 minute, delignificarea cu clorit de sodiu în mediu acid și hidroliza enzimatică cu 2% concentrație a solidelor după 72 ore timp de hidroliză. Randamentul mare de hidroliză enzimatică (91%) s-a datorat eliminării ligninei înainte de hidroliza enzimatică, ceea ce a însemnat că tratamentul cu clorit de sodiu, pe lângă eliminarea ligninei din substrat, îmbunătățește accesibilitatea materialului care devine mult mai susceptibil acțiunii enzimatice.

Tehnologia de transformare a lemnului de brad în bioetanol s-a realizat având prin următoarele etape:

- pretratamentul de autohidroliză,

- delignificarea cu clorit de sodiu a lemnului pretratată,
- hidroliza acidă sau enzimatică,
- fermentația hidrolizatelor acide sau enzimatică la bioetanol cu *S. cerevisiae*.

Etanolul a fost obținut prin fermentarea hidrolizatelor acide și enzimatică cu *S. cerevisiae*. Fermentația produselor din lemnul pretratată-delignificat-hidrolizat enzimatic a dat cel mai mare randament de 81%, comparativ cu cel rezultat din fermentație zaharurilor din lemnul pretratată-delignificat-hidrolizat acid (65%) la temperatura de pretratament de 190°C. Temperatura de pretratament la care are loc autohidroliza lemnului are influență, atât asupra delignificării, hidrolizei enzimatică, cât și asupra fermentației.

### BIBLIOGRAFIE

1. Wyman, Ch. E., Twenty years of trials, tribulations, and research progress in bioethanol technology, *Appl. Biochem. Biotech*, **2001**, 91–93, 5–21.
2. Tan, K. T., Lee, K.T., Mohamed, A. R., Role of energy policy in renewable energy accomplishment: The case of second-generation bioethanol, *Energy Policy*, **2008**, 36, 3360-3365.
3. Balat, M., Balat, H., Öz, C., Progress in bioethanol processing, *Progress in Energy and Combustion Science*, **2008**, 34(5), 551-573.
4. Sánchez, Ó. J., Cardona, C. A., Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks, *Bioresource Technology*, **2008**, 99, 5270–5295.
5. Walter, A., Rosillo-Calle, F., Dolzan, P., Piacente, E., Borges da Cunha, K., Perspectives on fuel ethanol consumption and trade, *Biomass and Bioenergy*, **2008**, 32 (8),730-748.
6. Balat, M., Balat, Recent trends in global production and utilization of bioethanol fuel, *Appl. Energy*, **2009**, 86, 2273-2282.
7. Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Lidén, G., Zacchi, G., Bioethanol– the fuel of tomorrow from the residues of today, *Trends in Biotechnology*, **2006**, 24(12), 549-556.
8. Demirbas, A., Biofuels securing the planet’s future energy needs, *Energy Convers Manage*, **2009**, 50, 2239–49.
9. Demirbas, M.F., Balat. M, Balat. H., Potential contribution of biomass to the sustainable energy development, *Energy Convers Manage*, **2009**, 50, 1746–60.
10. Meher, L.C., Sagar, D.V., Naik, S.N., Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review, *Renew Sustain Energy Rev*, **2006**, 10, 248–68.
11. Demirbas, A., Producing and using bioethanol as an automotive fuel, *Energy Source B*, **2007**, 2, 391–401.
12. Demirbas, A., Fuel alternatives to gasoline, *Energy Source B*, **2007**, 2, 311–20.
13. European Commission - EUR 21350 – BIOMASS - *Green energy for Europe, Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities*, **2005**, <http://publications.eu.int>.
14. Chum, H.L., Overend R.P., Biomass and renewable fuels, *Fuel Processing Technology*, **2001**, 71, 187–195.
15. Demirbas, A., Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections, *Energy Convers Manage*, **2008**, 49, 2106–16.

16. Slade, R., Bauen, A., Shah, N., The greenhouse gas emissions performance of cellulosic ethanol supply chains in Europe, *Biotechnol Biofuels*, **2009**, 2, 1–19.
17. Fredriksson, P. G., Neumazer, E., Ujhelzi, G., Kyoto Protocol cooperation: Does government corruption facilitate environmental lobbying, *Public Choice*, **2007**, 133 (1-2), 231-251.
18. Hamelinck, C. N., Hooijdonk, G., Faaij, A. P.C., Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term, *Biomass and Bioenergy*, **2005**, 28(4), 384-410.
19. Vallander, L., Eriksson, K. E. L. Production of ethanol from lignocellulosic materials: State of the art, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **1990**, 42, 63–95.
20. Knauf M., M. Moniruzzaman, “Lignocellulosic biomass processing: A perspective”. *International Sugar Journal*, **2004**, 106(1263), 147-150.
21. Kondili, E.M., Kaldellis, J.K., Biofuel implementation in East Europe: Current status and prospects, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **2007**, 11(9), 2137- 2151.
22. De Kam, M.J., Morey, R.V., Tiffany, D.G., Biomass integrated gasification combined cycle for heat and power at ethanol plants, *Energy Convers Manage*, **2009**, 50, 1682–90.
23. Balat, H., Prospects of biofuels for a sustainable energy future: A critical assessment, *Energy Educ Sci Technol Part A*, **2010**, 24, 85–111.
24. Neupane, B., Halog, A., Dhungel, S., Attributional life cycle assessment of woodchips for bioethanol production, *Journal of Cleaner Production*, **2011**, 19(6-7), 733-741
25. Ion, V.I., Ion, D. I., Energie din Biomasă, *Tehnica instalațiilor*, **2006**, 7(38), 14-30.
26. Barbara Elvers, Handbook of Fuels: Energy Sources for Transportation, Wiley-VCH Verlag GmbH. & Co. KGaA, Weinheim, **2008**, pag. 97-175.
27. Mabee, W.E., McFarlane, P. N., Saddler, J. N., Biomass availability for lignocellulosic ethanol production, *Biomass and Bioenergy*, **2011**, 35(11), 4519-4529.
28. Hamelinck, C.N., van Hooijdonk, G., Faaij, A.P.C., Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term, *Biomass Bioenergy*, **2005**, 28(4), 384-410.
29. Ali, Y. and M.A Hanna, Alternative Diesel Fuels from Vegetable Oils, *Bioresource Technology*, **1994**, 50, 153-163.
30. Popa, V. I., Enzymatic hydrolysis of hemicelluloses and cellulose in “*Polysaccharides: structural, diversity and functional versatility*” Edited by Severian Dumitriu, Marcel Dekker Inc., New York, **1998**, p.969-1045.
31. Sjostrom, E. *Wood Chemistry Fundamentals and Application* 2nd Edition, Academic Press, San Diego, **1993**.
32. Gullichsen, J., Fogelholm, C.J., (eds), “Papermaking science and technology”, FAPET OY, Helsinki, Finland, 1999.
33. Timell, T.E., Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses, *Wood Sci. Technol*, **1967**, 1(1), 45-70.
34. Jones, P.D., Schimleck, L.R., Peter, G.F., Daniels, R.F, Clark, A., Nondestructive estimation of wood chemical composition of sections of radial wood strips by diffuse reflectance near infrared spectroscopy, *Wood Sci Technol*, **2006**, 40(8), 709-20.
35. Ona, T., Sonod, T., Ohshima, J., Yokota, S., Yoshizawa, N., A rapid quantitative method to assess eucalyptus wood properties for kraft pulp production by ft–raman spectroscopy, *J Pulp Pap Sci*, **2003**, 29(1), 6-10.
36. Frédérique, B., Bjarne, H., Chemical composition of early wood and latewood in Norway spruce heartwood, sapwood and transition zone wood, *Wood Sci Technol*, **2004**, 38(4), 245-256.

37. Oksman, K., Etang, J. A., Mathew, A. P., Jonoobi, M., Cellulose nanowhiskers separated from a bio-residue from wood bioethanol production, *Biomass and Bioenergy*, **2011**, *35(1)*, 146-152
38. Gnansounou, E., Dauriat, A., Ethanol fuel from biomass: a review, *J Sci Ind Res*, **2005**, *64*, 809–21.
39. Balat, M., Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review, *Energy Conversion and Management*, **2011**, *52(2)*, 858-875.
40. Gnansounou, E., Production and use of lignocellulosic bioethanol in Europe: Current situation and perspectives, *Bioresource Technology*, **2010**, *101*, 4842–4850.
41. Leustean, I., Bioethanol from lignocellulosic materials, *J Agroalimentary Process Technol*, **2009**, *15*, 94–101.
42. Hsu, T.A., Ladisch, M.R., Tsao, G.T., Alcohol from cellulose, *Chem Technol*, **1980**, *10*, 315–9.
43. Crabtree, S.P., Lawrence, R.C., Tuck, M.W., Tyers D.V., Optimize Glycol Production From Biomass, *Hydrocarbon Processing*, **2006**, *85(2)*, 87-92.
44. Taherzadeh, M.J., Karimi, K., Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review, *Int J Mol Sci*, **2008**, *9*, 1621–51.
45. Zheng, Y., Pan, Z., Zhang, R., Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production, *Int J Agric Biol Eng*, **2009**, *2*, 51–68.
46. Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M. J., Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review, *Bioresource Technology*, **2010**, *101*, (13), 4851-4861.
47. Galbe, M., Zacchi, G., Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*, **2007**, *108*, 41–65.
48. Mousdale, M.D., Biofuels – Biotechnology, Chemistry and Sustainable Development, CRC Press, Taylor & Francis Group, **2008**, 62.
49. Amen-Chen, C., Pakdel, H., & Roy, C., Production of monomeric phenols by thermochemical conversion of biomass: A review, *Bioresource Technology*, **2001**, *79(3)*, 277-299.
50. Wyman, C.E., Handbook on Bioethanol: Production and Utilization. Taylor Francis, Washington, **1996**, p. 417
51. Wyman, C.E., Dale, B.E., Elander, R.T., Holtzapple, M., Ladisch, M.R., Lee, Y.Y., Mitchinson, C., Saddler, J.N., Comparative sugar recovery and fermentation data following pretreatment of poplar wood by leading technologies, *Biotechnology Progress*, **2009**, *25*, 333–339.
52. Zhu, J.Y., Pan, X.J., Wang, G.S., Gleisner, R., Sulfite pretreatment for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine, *Bioresource Technology*, **2009a**, *100*, 2411–2418.
53. Saha, B.C., Iten, L.B., Cotta, M.A., Wu, Y.V., Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol, *Process Biochem*, **2005**, *40*, 3693–3700.
54. Mosier, N., Hendrickson, R., Ho, N., Sedlak, M., Ladisch, M.R., Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover, *Bioresour. Technol.*, **2005a**, *96*, 1986–1993.
55. Soderstrom, J., Pilcher, L., Galbe, M., Zacchi, G., Two-step steam pretreatment of softwood by dilute H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> impregnation for ethanol production, *Biomass Bioenergy*, **2003**, *24*, 475–86.
56. Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Gírio, F.M., Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments, *J. Sci. Ind. Res.*, **2008**, *67*, 849–864.
57. Taherzadeh, M.J., Karimi, K., Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review, *Int. J. Mol. Sci.*, **2008**, *9*, 1621–1651.

58. Pan, X.J., Gilkes, N., Kadla, J., Pye, K., Saka, S., Gregg, D., Ehara, K., Xie, D., Lam, D., Saddler, J., 2006a. Bioconversion of hybrid poplar to ethanol and co-products using an organosolv fractionation process: optimization of process yields, *Biotechnology and Bioengineering*, **2006a**, 94, 851–861.
59. Papatheofanous, M.G., Billa, E., Koullas, D.P., Monties, B., Koukios, E.G., Two stage acid-catalyzed fractionation of lignocellulosic biomass in aqueous ethanol systems at low temperatures, *Bioresour. Technol.*, **1995**, 54, 305–310.
60. Zhao, X., Cheng, K., Liu, D., Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1995**, 82, 815–827.
61. García-Cubero, M.T., González-Benito, G., Indacochea, I., Coca, M., Bolado, S., Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw, *Bioresour. Technol.*, **2009**, 100, 1608–1613.
62. Hayes, D.J., An examination of biorefining processes, catalysts and challenges, *Catal. Today*, **2009**, 145, 138–151.
63. Kumar, R., Wyman, C.E., Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies, *Biotechnol. Prog.*, **2009a**, 25, 302–314.
64. Lee, J.W., Gwak, K.S., Park, J.Y., Park, M.J., Choi, D.H., Kwon, M., Choi, I. G., Biological pretreatment of softwood *Pinus densiflora* by three white rot fungi, *J Microbiol*, **2007**, 45, 485–91.
65. Cristóbal, C., Encarnación, R., Mercedes, B., Paloma, M., Negro, M., Castro, M., Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning, *Fuel*, **2008**, 87, 692–700.
66. Encarnación, R., Cristóbal, C., Paloma, M., Ballesteros, M., Castro. M., Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks, *Enzyme and Microbial Technology*, **2008**, 42, 160–166.
67. Heerah, A.S., Mudhoo, A., Mohee, R., Sharma, S.K., Steam pre-treatment of lignocellulosic wastes for biomethanogenesis: a preliminary study, *Rasayan J Chem*, **2008**, 1, 503–14.
68. Alfani, A., Gallifuoco, F., Saporosi, A., Spera, A., Cantarella, M., Comparison of SHF and SSF process for the bioconversion of steam-exploded wheat straw, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **2000**, 25, 184–192.
69. Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Cabanas, A., Manzanares, P., Ballesteros, M., Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw, *Appl Biochem Biotechnol*, **2006**, 130, 496–508.
70. Sassner, P., Martensson, C.G., Galbe, M., Zacchi, G., Steam pretreatment of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-impregnated *Salix* for the production of bioethanol, *Bioresour Technol*, **2008**, 99, 137–45.
71. Han, G., Deng, J., Zhang, S., Bicho, P., Wu, Q., Effect of steam explosion treatment on characteristics of wheat staw, *Industrial Crops and Products*, **2010**, 31(1), 28-33.
72. Alizadeh, H., Teymouri, F., Gilbert, T.I., Dale, B.E., Pretreatment of switchgrass by ammonia fiber explosion (AFEX), *Appl Biochem Biotechnol*, **2005**, 121, 1133–1141.
73. Teymouri, F., Laureano-Perez, L., Alizadeh, H., Dale, B.E., Ammonia fiber explosion treatment of corn stover, *Appl Biochem Biotechnol*, **2004**, 115, 951–63.
74. Nguyen, T. D., Kim, K., Han, S. J., Cho, H. Y., Kim, J. W., Park, S. M., Park, J. C., Sim, S. J., Pretreatment of rice staw with ammonia and ionic liquid for lignocellulosic conversion to fermentable sugars, *Bioresource Technology*, **2010**, 101(19), 7432-7438.
75. Hamelinck, C.N., Hooijdonk, G. Van, Faaij, A.P.C., Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term, *Biomass Bioenergy*, **2005**, 28, 384–410.

76. Laser, M., Schulman, D., Allen, S.G., Lichwa, J., Antal Jr, M.J., Lynd, L.R., A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol, *Bioresour. Technol*, **2002**, *81*, 33–44.
77. Yu, Y., Lou, X., Wu H., Some recent advances in hydrolysis of biomass in hot-compressed water and its comparisons with other hydrolysis methods, *Energy Fuels*, **2008**, *22*, 46–60.
78. Pérez, J.A., Ballesteros, I., Ballesteros, M., Sáez, F., Negro, M.J., Manzanares, P., Optimizing liquid hot water pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel-ethanol production, *Fuel*, **2008**, *87*, 3640–3647.
79. Wan,C., Zhou, Y.,Yebo Li,Y., Liquid hot water and alkaline pretreatment of soybean straw for improving cellulose digestibility, *Bioresource Technology*, **2011**, *102(10)*, 6254-6259.
80. Liu, J., Takada, R., Karita,S., Watanabe, T., Honda, Y., Watanabe, T., Microwave-assisted pretreatment of recalcitrant softwood in aqueous glycerol, *Bioresource Technology*, **2010**, *101(23)*, 9355-9360.
81. Nitayavardhana, S., Shrestha, P., Rasmussen, M. L., Lamsal, B.P., Leeuwen, J., Khanal, S. K., Ultrasound improved ethanol fermentation from cassava chips in cassava-based ethanol plants, *Bioresource Technology*, **2010**, *101*, 2741-2747.
82. Zang, W., Ajapur, V.K., Krishnamurthz, K., Feng, H., Zang, R., Rababah, T.M., Expedited extraction of xzlan from corncob bz power ultraound, *Int. J. Agric & Biol. Eng.*, **2009**, *2(4)*, 76-83.
83. Cheng, Q., Wang, S., & Han, Q., Novel process for isolating fibrils from cellulose fibers by high-intensity ultrasonication. II. Fibril characterization, *Journal of Applied Polymer Science*, **2010**, *115(5)*, 2756–2762.
84. Cheng, Q., Wang, S., & Rials, T. G., Poly(vinyl alcohol) nanocomposites reinforced with cellulose fibrils isolated by high intensity ultrasonication. Composites Part A, *Applied Science and Manufacturing*, **2009**, *40(2)*, 218–224.
85. Wang, S., Cheng, Q., A novel process to isolate fibrils from cellulose fibers by high-intensity ultrasonication. Part 1: Process optimization, *Journal of Applied Polymer Science*, **2009**, *113(2)*, 1270–1275.
86. Chang, V.S, Holtzapple, M.T., Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity, *Appl Biochem Biotechnol*, **2000**, *84-86*, 5-37.
87. Yoon, H.H., Wu, Z.W., Lee, Y.Y., Ammonia-recycled percolation process for pretreatment of biomass feedstock, *Appl Biochem Biotechnol*, **1995**, *51/52*, 5-19.
88. Mosier, N. S., Ladisch, C. M., Ladisch, M. R., Characterization of acid catalytic domains for cellulose hydrolysis and glucose degradation, *Biotechnol Bioeng*, **2002**, *79*, 610–8.
89. Rahman, S.H.A., Choudhury, J.P., Ahmad, A.L., Kamaruddin, A.H., Optimization studies on acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch fiber for production of xylose, *Bioresource Technol*, **2007**, *98*, 554–559.
90. Sun, Y., Cheng, J., Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review, *Bioresource Technol.*, **2002**, *83*, 1–11.
91. Lenihan, P., Orozco, A., O'Neill, E., Ahmad, M.N.M., Rooney, D.W., Walker, G.M., Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass, *Chemical Engineering Journal*, **2010**, *156(2)*, 395-403.
92. Karimi, K, Emtiazi, G, Taherzadeh, M.J., Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*, *Enzyme Microbiol Technol*, **2006**, *40*, 138–44.
93. Iranmahboob, J, Nadim, F, Monemi, S., Optimizing acid-hydrolysis: a critical step for production of ethanol from mixed wood chips, *Biomass Bioenergy*, **2002**, *22*, 401–4.

94. Bose, S. K., Barber, V. A., Alves, E. F., Kiemle, D. J., Stipanovic, A. J., Francis, R. C., An improved method for the hydrolysis of hardwood carbohydrates to monomers, *Carbohydrate Polymers*, **2009**, *78(15)*, 396-401.
95. Adel, A. M., El-Wahab, Z. H.A., Ibrahim, A. A., Mona T. Al-Shemy, M. T., Characterization of microcrystalline cellulose prepared from lignocellulosic materials. Part I. Acid catalyzed hydrolysis, *Bioresource Technology*, **2010**, *101(12)*, 4446-4455.
96. Demirbas, A., Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass, *Energy Source*, **2005**, *27*, 327-37.
97. Li, H., Kim, N., Jiang, M., Kang, J. W., Chang, H. N., Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic residues pretreated with phosphoric acid- acetone for bioethanol production, *Bioresource Technology*, **2009**, *100(13)*, 3245-3251.
98. Zhang, J., Zhang, B., Zhang, J., Lin, L., Liu, S., Ouyang, P., Effect of phosphoric acid pretreatment on enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose, *Biotechnology Advances*, **2010**, *28(5)*, 613-619.
99. Mussatto, S.I., Fernandes, M., Adriane M.F., Milagres, A.M.F., Roberto, I.C., Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain, *Enzyme and Microbial Technology*, **2008**, *43*, 124-129.
100. Pan, X., Gilkes, N., Saddler, J.N., Effect of acetyl groups on enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates, *Holzforschung*, **2006**, *60*, 398-401.
101. Taherzadeh, M.J. and Niklasson, C., Ethanol from lignocellulosic materials: Pretreatment, acid and enzymatic hydrolyses, and fermentation, *ACS Symp. Ser.*, **2004**, *889*, 49-68.
102. Saha, B.C. and Bothast, R.J., Enzymes in lignocellulosic biomass conversion, *ACS Symp. Ser.*, **1997**, *666*, 46-56.
103. Voca, N., Varga, B., Kricka, T., Curic, D., Jurisic, V., Matin, A., Progress in ethanol production from corn kernel by applying cooking pre-treatment, *Bioresource Technology*, **2009**, *100(10)*, 2712-2718.
104. Ballesteros, I., Oliva, J.M., Negro, M.J., Manzanares, P., Ballesteros, M., Enzymic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particule sizes, *Process Biochemistry*, **2002**, *38*, 187-192.
105. Abuja, P. M., Schmuck, M., Pilz, I., Tomme, P., Claeysens, M., Esterbauer, H., "Structural and functional domains of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*.", *European Biophysics Journal*, **1988**, *15*, 339-342.
106. Lee, R. L., Weimer, P. J., Willem, H. Z., Isak, Pretorius, S., "Microbial Cellulase Utilization: Fundamentals and Biotechnology.", *American Society for Microbiology*, **2002**, *66*, 506-577.
107. Zhang, Y. P., Lynd, L. R., "Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems.", *Biotechnology and Bioengineering*, **2004**, *88*, 797-824.
108. Zhou, J., Wang, Y.H., Chu, J., Zhuang, Y.P., Zhang, S.L., Yin, P., Identification and purification of the main components of cellulases from a mutant strain of *Trichoderma viride* T 100-14, *Bioresour Technol*, **2008**, *99*, 6826-33.
109. Kim, S. H., Holtzapple, M. T., Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover, *Bioresource Technology*, **2005**, *96*, 1994-2006.
110. Zhang, Y.H.P., Himmel, M.E., Mielenz, J.R., Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies, *Biotechnol Adv*, **2006**, *24*, 452-81.
111. Rezaei, F., Richard, T.L., Logan, B.E., Enzymatic hydrolysis of cellulose coupled with electricity generation in a microbial fuel cell, *Biotechnol Bioeng*, **2008**, *101*, 1163-9.
112. Handbook of plant-based biofuels, Edited by Ashoc-Pandey, Taylor & Francis Group, **2009**, 141-159.



113. Gírio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R., Hemicelluloses for fuel ethanol: A review, *Bioresource Technology*, **2010**, *101(13)*, 4775-4800.
114. Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K.D., Steiner, W., Zupancic, S., Production of fungal xylanases, *Bioresour Technol*, **1996**, *58*, 137–61.
115. Kovács, K., Szakács, G., Zacchi, G., Enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated spruce using crude *Trichoderma reesei* and *Trichoderma atroviride* enzymes, *Process Biochemistry*, **2009**, *44*, 1323-1329.
116. Lee, J., “Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol.”, *Journal of Biotechnology*, **1997**, *56*, 1-24.
117. Sassner, P., Galbe, M., Zacchi, G., Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated *Salix* at high dry-matter content, *Enzyme and Microbial Technology*, **2006**, *39*, 756-762.
118. Katahira, S., Mizuike, A., Fukuda, H., Kondo, A., Ethanol fermentation from lignocellulosic hydrolysate by a recombinant xylose- and celooligosaccharide-assimilating yeast strain, *Appl Microbiol Biotechnol*, **2006**, *72*, 1136–43.
119. Zaldivar, J., Nielsen, J., Olsson, L., Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration, *Appl Microbiol Biotechnol*, **2001**, *56*, 17–34.
120. Lin, Y., Tanaka, S., Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects, *Appl Microbiol Biotechnol*, **2006**, *69*, 627–42.
121. Cantarella, M., Cantarella, L., Gallifuoco, A., Spera, A., Alfani, F., Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF and SSF, *Process Biochemistry*, **2004**, *39(11)*, 1533-1542.
122. Haagensen, F., Skiadas, I. V., Gavala, H. N., Ahring, B. K., Pre-treatment and ethanol fermentation potential of olive pulp at different dry matter concentration, *Biomass and Bioenergy*, **2009**, *33(11)*, 1643-1651.
123. Öhgren, K., Bengtsson, O., Gorwa-Grauslund, M. F., Galbe, M., Hahn-Hägerdal, B., Zacchi, G., Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB 3400, *Journal of Biotechnology*, **2006**, *126(4)*, 488-498.
122. Kamke, F. A., Lee J. N, Adhesive penetration in wood – a review, *Wood Fiber Sci*, **2007**, *39(2)*, 205-220.
123. Puls, J., Saake, B., Industrially isolated hemicelluloses, In: *Hemicelluloses: Sci. and Tech*, P. Gatenholm and M. Tenkanen, Eds, **2004**, 25–35.
124. Tunc, M., van Heiningen, A. R. P., Hemicellulose extraction of mixed southern hardwood with water at 150°C: Effect of time, *Ind Eng Chem Res*, **2008**, *47(18)*, 7031-7037.
125. Bouchard, J., Nguyen, T.S., Chornet, E., Overend, R.P., Analytical Methodology for Biomass, Pretreatment. Part 2: Characterization of the Filtrates and Cumulative Product Distribution as a Function of Treatment Severity, *Bioresource Technology*, **2005**, *96(36)*, 121–131
126. Zeng, M., Mosier, N.S., Huang, C.P., Sherman, D.M., Ladisch, M. R., Microscopic examination of changes of plant cell structure in corn stover due to hot water pretreatment and enzymatic hydrolysis, *Biotechnol. Bioeng*, **2007**, *97*, 265-278.
127. Dien, B. S., Li, X. L., Iten, L. B., Jordan, D. B., Nichols, N. N., O’Bryan, P. J., Cotta, M. A., Enzymatic saccharification of hot-water pretreated corn fiber for production of monosaccharides, *Enzyme Microb. Tech.*, **2006**, *39*, 1137-1144.

128. Sreenath, H. K., Koegel, R. G., Moldes, A. B., Jeffries, T. W., Straub, R. J., Enzymic saccharification of alfalfa fibre after liquid hot water pretreatment, *Process Biochem.*, **1999**, *35*, 33-41.
129. Jeoh, T., Steam explosion pretreatment of cotton gin waste for fuel ethanol production, Master's thesis, Virginia Polytechnic Inst., Blacksburg, Virginia, **1998**.
130. Fengel, D., Wegener, G., Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions, Walter de Gruyter, Berlin, Germania, **1984**, 613.
131. Tunc, M. S., Heiningen, A. R. P., Characterization and molecular weight distribution of carbohydrates isolated from the autohydrolysis extract of mixed southern hardwoods, *Carbohydrate Polymers*, **2011**, *83(1)*, 8-13.
132. Ferial, M. J., López, F., García, J. C., Pérez, A., Zamudio, M. A. M., Alfaro, A., Valorization of *Leucaena leucocephala* for energy and chemicals from autohydrolysis, *Biomass and Bioenergy*, **2011**, *35(2)*, 2224-2233.
133. Varga, D., van der Zee, M. E., Influence of steaming on selected wood properties of four hardwood species, *Holz Roh Werkst*, **2008**, *66*, 11–18.
134. 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*, **2005**, *96*, 1959-1966.
135. Amidon, T.E., The Biorefinery in New York: Woody Biomass into Commercial Ethanol, *Pulp & Paper Canada*, **2006**, *107 (6)*, 47-50.
136. Sun, J. X., Sun X. F., Sun, R. C., Su, Y. Q, Fractional Extraction and Structural Characterization of Sugarcane Bagasse Hemicelluloses, *Carbohydrate Polymers*, **2004a**, *56*, 195-204.
137. Kern, Z., Popa, I., Climate-growth relationship of tree species from a mixed stand of Apuseni Mts, Romania, *Dendrochronologia*, **2007**, *24*, 109-115.
138. Sluiter, A., Hames, B., Hyman, D., Payne, C., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Wolfe, J., *NREL Laboratory Analytical Procedure, "Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid samples"*, **2008**.
139. Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, NREL Laboratory Analytical Procedure, "Determination of ash in biomass", *NREL/TP-510-42622*, **2008**.
140. Tina Ehrman, Standard Method for the Determination of Extractives in Biomass, LAP-010, **1994**.
141. Teramoto, Y., Seung-Hwan, L., Takashi, E., Pretreatment of woody and herbaceous biomass for enzymatic saccharification using sulfuric acid-free ethanol cooking, *Bioresource Technology*, **2008**, *99*, 8856–8863.
142. Van Soest P.J., Wine R.H., Determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **1968**, *51*, 780–785.
143. Morrison I.M., A semi-micro method for the determination of lignin and its use in predicting the digestibility of forage crops, *J. Sci. Food Agric.*, **1972**, *23*, 455–463.
144. Blasi, D., Signorelli, G., Di Russo C., Rea, G., Product distribution from pyrolysis of wood and agricultural residues, *Ind Chem Res*, **1999**, *38*, 2216.
145. Soudham, V. P., Acetosolv delignification of *Dichrostachys cinerea* biomass for ethanol production, **2009**, *Master Thesis*, pag.32-35.
146. Garrote, G.; Dominguez, H.; Parajó, J. C, Hydrothermal processing of lignocellulosic materials, *Holz Roh- Werkst*, **1999**, *57*, 191-202.
147. Nakagame, S., Chandra, R. P., Kadla, J. F., Saddler, J. N, The isolation, characterization and effect of lignin isolated from steam pretreated Douglas-fir on the enzymatic hydrolysis of cellulose, *Bioresour Technol*, **2011**, *102*, 4507-4517.

148. Zhu, J.Y., Pan, J., Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation, *Bioresour Technol*, **2010**, *101*, 4992-5002.
149. Popa, V. I., Spiridon, I., Hemicelluloses: Structure, Properties, in "Polysaccharides. Structural Diversity and Functional Versality", Edited by Severian Dumitriu, Marcel Dekker Inc., New York, **1998**, p. 297.
150. Liu, H., Zhu, J. Y., Fu, S. Y, Effects of lignin-metal complexation on enzymatic hydrolysis of cellulose, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2010**, *58*, 7233-7238.
151. Mosier, N., Ladisch, C., Ladisch, M., Characterization of acid catalytic domains for cellulose hydrolysis and glucose degradation, *Biotechnol Bioeng*, **2002**, *79*, 610–618.
152. Lavoie, J. M., Capek-Menard, E., Gauvin, H., Chornet, E., Production of pulp from *Salix viminalis* energy crops using the first process, *Bioresour. Technol*, **2010**, *101*, 4940–4946.
153. Pandey, K. K., Pitman, A. J., FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi, *International Biodeterioration & Biodegradation*, **2003**, *52*, 151 – 160.
154. Shaw, M.D., Karunakaran, C., Tabil, L.G., Physicochemical characteristics of densified untreated and steam exploded poplar wood and wheat straw grinds, *Biosystems and engineering*, **2009**, *103*, 198-207.
155. Alriols, M. G., Tejado, A., Blanco, M., Mondragón, I., Labidi, J., Agricultural palm oil tree residues as raw material for cellulose, lignin and hemicelluloses production by ethylene glycol pulping process, *Chemical Engineering Journal*, **2009**, *148*, 106-114.
156. Sun, X. F., Sun, R. C. Fowler, P., Baird, M. S., Isolation and characterization of cellulose obtained by a two-stage treatment with organosolv and cyanamide activated hydrogen peroxide from wheat straw, *Carbohydrate Polymers*, **2004**, *55*, 379-391.
157. Rojas-Escudero, E., Alarcón-Jiménez, A. L., Elizalde-Galván, P., Rojo-Callejas, F., Optimization of carbohydrate silylation for gas chromatography, *Journal of Chromatography A*, **2004**, *1027*, 117–120.
158. Medeiros, P. M., Simoneit, B.R.T, Analysis of sugars in environmental samples by gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **2007**, *1141*, 271–278.
159. **Senila, L.**, Gog, A., Senila, M., Roman, C., Silaghi-Dumitrescu, L., Analysis of carbohydrates obtained from wood by gas chromatography-mass spectrometry, *Revista de Chimie*, **2011**, *62*, nr. 2, 149-153.
160. Leppänen, K., Spetz, P., Pranovich, A., Hartonen, K., Kitunen, V., Ilvesniemi, H., Pressurized hot water extraction of Norway spruce hemicelluloses using a flow-through system, *Wood Sci Technol*, **2011**, *45*, 223-236.
161. Palm, M., Zacchi, G., Extraction of hemicellulosic oligosaccharides from spruce using microwave oven or steam treatment, *Biomacromolecules*, **2003**, *4*, 617.
162. **Senila, L.**, Gog, A., Senila, M., Roman, C., Silaghi-Dumitrescu, L., Development of a GC-MS method for 5-hydroxymethylfurfural determination in wood after steam-explosion pretreatment, *Revista de Chimie*, **2012**, vol. 63, nr.6, 559-563.
163. Gaspar, E. M. S. M., Lopes, J. F, Simple gas chromatographic method for furfural analysis, *Journal of Chromatography A*, **2009**, *1216*, 2762-2767.
164. Khalil, M. I., Sulaiman, S. A., Gan, S. H., High 5-hydroxymethylfurfural concentration are found in Malaysian honey samples stored for more than one year, *Food and Chemical Toxicology*, **2010**, *48*, 2388-2392.
165. Sebök, Á., Vasanitas-Zsigrai, A., Palkó, G., Záray, G., Molnár-Perl, I., Identification and quantification of ibuprofen, naproxen, ketoprofen and diclofenac present in waste-

- waters, as their trimethylsilyl derivatives, by gas chromatography mass spectrometry, *Talanta*, **2008**, 76, 642-650.
166. Jöbstl, D., Husøy, T., Alexander, J., Bjellaas, T., Leitner, E., Murkovic, M., Analysis of 5-hydroxymethyl-2-furic acid (HMFA) the main metabolite of alimentary 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) with HPLC and GC in urine, *Food Chemistry*, **2010**, 123, 814-818.
  167. Teixidó, E., Santos, F. J., Puignou, L., Galceran, M. T., Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in food by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **2006**, 1135, 85-90.
  168. Beránek, J., Kubátová, A., Evaluation of solid-phase microextraction methods for determination of trace concentration aldehydes in aqueous solution, *Journal of Chromatography A*, **2008**, 1209, 44-54.
  169. Andujar-Ortiz, I., Moreno-Arribas, M.V, Martiín-Álvarez, P.J., Pozo-Bayón, M. A., Analytical performance of three commonly used extraction methods for the gas chromatography-mass spectrometry analysis of wine volatile compounds, *J Chromatogr A*, **2009**, 1216, 7351-7357.
  170. Du, X., Qian, M., Quantification of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone using solid-phase extraction and direct microvial insert thermal desorption gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr A*, **2009**, 1208, 197-201.
  171. Pontes, M., Marques, J. C., Câmara, J. S., Screening of volatile composition from Portuguese multifloral honeys using headspace solid-phase microextraction-gas chromatography–quadrupole mass spectrometry, *Talanta*, **2007**, 74, 91-103.
  172. UNCTAD/GATT, Making and marketing furfural: added value for agro-industrial wastes, *Abstracts for Trade Information Services*, International trade center, Geneva, **1979**, p. 3.7.
  173. **Senila, L.**, Senila, M., Costiug S., Miclean M., Varaticeanu, C., Roman, C., Autohydrolysis of *Albies alba* wood using adaptive neural fuzzy interference system mathematical modeling, *International Journal of Green Chemistry*, **2012**, trimis spre publicare.
  174. Sun, X. F., Sun, R. C. Fowler, P., Baird, M. S., Isolation and characterization of cellulose obtained by a two-stage treatment with organosolv and cyanamide activated hydrogen peroxide from wheat straw, *Carbohydrate Polymers*, **2004**, 55, 379-391.
  175. Palm, M.; Zacchi, G., Extraction of hemicellulosic oligosaccharides from spruce using microwave oven or steam treatment, *Biomacromolecules*, **2003**, 4, 617.
  176. Ruiz, E., Cara, C., Manzanares, P., Ballesteros, m., Castro, E., Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hyhrolysis of sunflower stalks, *Enzyme and Microbial Technology*, **2008**, 42, 160-166.
  177. Taherzadeh, M.J., Gustafsson, L., Linden, J. C., Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **2000**, 53, 701.
  178. Rackemann, D. W., Doherty, W. O. S., The conversion of lignocellulosics to levulinic acid, *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, **2011**, 5(2), 115-126.
  179. Jang, J. S. R., ANFIS: Adaptive-Network-Based Fuzzy Inference System. *IEEE Transaction on Systems, Man and Cybernetics*, **1993**, 23, 665-685.
  180. Jiang, M., Zhao, M., Zhou, Z., Huang, T., Chen, X., Wang, Y., Isolation of cellulose with ionic liquid from steam exploded rice straw, *Industrial Crops and Products*, **2011**, 33,734-738.
  181. Jiménez, L., Angulo, V., Caparrós S., Ariza, J., Comparison of polynomial and neural fuzzy models as applied to the ethanolamine pulping of vine shoots, *Bioresource Technology*, **2007**, 98, 3440-3448.

182. Zamuido, M.A.M., Pérez, A., López, F., García, J.C., Feria, M.J., Neutral fuzzy model applied to autohydrolysis of *Paulownia* trihybrid, *Journal Taiwan Institute of Chemical Engineers*, **2011**, *42*, 292-297.
183. Caparrós, S., Ariza, J., López, F., Díaz, M. J., Optimizing cellulosic paper obtained from *Arundo donax* L. under hydrothermal treatment, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, **2007**, *13*, 465-473.
184. Nakagame, S., Chandra, R. P., Kadla, J. F., Saddler, J. N, The isolation, characterization and effect of lignin isolated from steam pretreated Douglas-fir on the enzymatic hydrolysis of cellulose, *Bioresour Technol*, **2011**, *102*, 4507-4517.
185. Sjöström, E., *Wood Chemistry: Fundamentals and Application*, Ed. Academic Press: Orlando, **1993**, pag. 293.
186. Freudenberg, K., Neish, A. C., Constitution and Biosynthesis of Lignin, ed. Springer, G.F. si Kleinzeller, A. Springer-Verlag: New York, **1968**, pag. 129.
187. Salmela, M., Alén, R., Vu, M. T. H., Description of kraft cooking and oxygen-alkali delignification of bamboo by pulp and dissolving material analysis, *Ind Crop Prod*, **2008**, *28*, 47-55.
188. Romani, A., Garrote, G., López, F., Parajó, J. C., *Eucalyptus globulus* wood fractionation by autohydrolysis and organosolv delignification, *Bioresour Technol*, **2011**, *102*, 5896-5904.
189. Grierer, J., Chemistry of delignification, *Wood Sci. Technol*, **1986**, *20(1)*, 1-33.
190. Sabiha-Hanim, S., Noor, M. A. M., Rosma, A., Effect of autohydrolysis and enzymatic treatment on oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) frond fibres for xylose and xylooligosaccharides production, *Bioresour Technol*, **2011**, *102*, 1234-1239.
191. **Senila, L.**, Senila, M., Varaticeanu, C., Roman, C., Silaghi-Dumitrescu, L., Autohydrolysis pretreatment and delignification of silver fir wood to obtain fermentable sugars for bioethanol production, *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, **2012**, DOI: 10.1080/15567036.2012.658139, in press.
192. Cara, C., Ruiz, E., Ballesteros, I., Negro, M. J., Castro, E., Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline delignification, *Process Biochem*, **2006**, *41*, 423-129.
193. Várnai, A., Siika-aho, M., Viikari, L., Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicellulose, *Enzyme Microb Tech*, **2010**, *46*, 185-193.
194. Hu, R., Lin, L., Liu, t., Liu, S., Dilute sulfuric acid hydrolysis of sugar maple wood extract at atmospheric pressure, *Bioresource Technology*, **2010**, *101*, 3586-3594.
195. Yat, S. C., Berger, A., Shonnard, D. R., Kinetic characterization for dilute sulfuric acid hydrolysis of timber varieties and switchgrass, *Bioresource Technology*, **2008**, *99*, 3855-3863.
196. Neureiter, M., Danner, H., Frühauf, S., Kromus, S., Thomasser, C., Braun, R., Narodoslawsky, Dilute acid hydrolysis of presscakes from silage and grass to recover hemicellulose-derived sugars, *Bioresource Technology*, **2004**, *92*, 21-29.
197. Saucedo-Luna, J., Castro-Montoya, A. J., Rico, J. L., Campos-García, J., Optimization of acid hydrolysis of bagasse from Agave tequilana Weber, *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, **2010**, *9(1)*, 91-97.
198. Eikenes, M., Fongen, M., Roed, L., Stenström, Z., Determination of chitosan in wood and water samples by acidic hydrolysis and liquid chromatography with online fluorescence derivatization, *Carbohydrate Polymers*, **2005**, *61*, 29-38.
199. Sievers, C., Marzalletti, T., Hoskins, T.J.C., Olarte, M.B.V., Agrawal, P.K., Jones, C. W., Quantitative solid state NMR analysis of residues from acid hydrolysis of loblolly pine wood, *Bioresource Technology*, **2009**, *100*, 4758-4765.

200. Gámez, S., González-Cabriales, J. J., Ramírez, A., Garrote, G., Vázquez, M., Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid, *Journal of Food Engineering*, **2006**, *74*, 78–88.
201. Liao, W., Liu, Y., Liu, C., Wen, Z., Chen, S., Acid hydrolysis of fibers from dairy manure, *Bioresource Technology*, **2006**, *97*, 1687–1695.
202. Willför, S., Pranovich, A., Tamminen, T., Puls, J., Laine, C., Suurnäkki, A., Saake, B., Uotila, K., Simolin, H., Hemming, J., Holmbom, B., Carbohydrate analysis of plant materials with uronic acid-containing polysaccharides—A comparison between different hydrolysis and subsequent chromatographic analytical techniques, *Industrial Crops and Products*, **2009**, *29*, 571–580.
203. Kim, K.H., Tucker, M., Nguyen, Q., Conversion of bark-rich biomass mixture into fermentable sugar by two-stage dilute acid-catalyzed hydrolysis, *Bioresource Technology*, **2005**, *96*, 1249–1255.
204. Karimi, K., Kheradmandinia, S., Taherzadeh, M. J., Conversion of rice straw to sugars by dilute-acid hydrolysis, *Biomass and Bioenergy*, **2006**, *30*, 247–253.
205. Romero, I., Ruiz, E., Castro, E., Moya, M., Acid hydrolysis of olive tree biomass, *Chemical Engineering Research and Design*, **2010**, *88*, 633–640.
206. Lenihan, P., Orozco, A., O’Neill, E., Ahmad, M.N.M., Rooney, D.W., Walker, G.M., Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass, *Chemical Engineering Journal*, **2010**, *156*, 395–403.
207. Cho, D. H., Shin, S.-Y., Bae, Z., Park, C., Yong Kim, Z.H., Ethanol production from acid hydrolysates based on the construction and demolition wood waste using *Pichia stipitis*, *Bioresource Technology*, **2011**, *102*, 4439–4443.
208. Senila, L., Gog, A., Senila, M., Roman, C., Irimie, F., Analysis of glucose obtained from wood carbohydrates by gas chromatography-mass spectrometry, *Studia Chimica*, **2010**, *3*, 51–56.
209. Li, H., Kim, N., Jiang, M., Kang, J. W., Chang, H. N., Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic residues pretreated with phosphoric acid-acetone for bioethanol production, *Bioresource Technology*, **2009**, *100*, 3245–3251.
210. Kamm, B., Kamm, M., Schmidt, M., Starke, I., Kleinpeter, E., Chemical and biochemical generation of carbohydrates from lignocellulose-feedstock (*Lupinus nootkatensis*) – quantification of glucose, *Chemosphere*, **2006**, *62*, 97–105.
211. Wahjudi, P. N., Patterson, M. E., Lim, S., Yee, J. K., Mao, C. S., Lee, W. N., Measurement of glucose and fructose in clinical samples using gas chromatography/mass spectrometry, *Clin Biochem*, **2010**, *43(1-2)*, 198–207.
212. Kona, P. R., Qureshi, N., Pai, J. S., Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and corn steep liquor, *Bioresource Technology*, **2001**, *78*, 123–126.
213. Miller, G. L., Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Anal. Chem*, **1959**, *31*, 426–428.
214. Sun, L., Chen, Z. J., The novel functions of ubiquitination in signaling, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **2004**, *16(2)*, 119–126.
215. Soto, M. L., Domínguez, H., Lema, M. J., Enzymatic saccharification of alkali-treated sunflower hull, *Bioresour Technol*, **1994**, *49*, 53–59.
216. Monavari, S., Galbe, M., Zacchi, G., The influence of ferrous sulfate utilization on the sugar yields from dilute-acid pretreatment of softwood for bioethanol production, *Bioresour Technol*, **2011**, *102(2)*, 1103–1108.
217. Kubicek, C. P., The cellulase proteins of *Trichoderma reesei*: structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation, *Adv Biochem Eng Biotechnol*, **1992**, *45*, 1–26.

218. Xiao, Z., Zhang, X., Gregg, D. J., Saddler, J. N., Effects of sugar inhibition on cellulases and  $\beta$ -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates, *Appl Biochem Biotechnol*, **2004**, *113*, 1115–1126.
219. <http://www.danisco.com/wps/wcm/connect/24b049004237d8e3b052bd4000716f1c/ACCELLERASE%2B1500%2Bprod%2Binfo%2Bsheet.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=24b049004237d8e3b052bd4000716f1c>.
220. Olsson, L., Hahn-Hägerdal, B., Fermentative performance of bacteria and yeast in lignocellulose hydrolysates, *Proc Biochem*, **1993**, *28*, 249-257.