

PRETRATAMIENTO ALCALINO DE BAGAZO DE CAÑA PARA MEJORAR LA PRODUCCIÓN DE BIOMETANO

SUGARCANE BAGASSE ALKALINE PRETREATMENT TO IMPROVE BIOMETHANE PRODUCTION

Aimeé González Suárez^{1}, Giselle Hernández Alfonso¹ e Ileana Pereda Reyes¹*

¹ Centro de Estudios de Ingeniería de Procesos (CIPRO), Universidad Tecnológica de La Habana "José Antonio Echeverría" (CUJAE). Calle 114 No. 11901, Marianao 19390. La Habana, Cuba.

Recibido: Marzo 25, 2019; Revisado: Abril 12, 2019; Aceptado: Mayo 27, 2019

RESUMEN

El bagazo de caña de azúcar constituye un residuo agroindustrial lignocelulósico abundante en la industria azucarera cubana. Su compleja estructura limita parcialmente su biodegradación, por lo que se hace necesario la aplicación de un pretratamiento, siendo el alcalino el más efectivo para las biomásas con alto contenido de lignina. El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto del pretratamiento alcalino sobre la deslignificación del bagazo de caña, y su biodegradabilidad anaerobia respecto al bagazo sin pretratar. Se estudiaron dos álcalis (NaOH y KOH) con dos niveles de concentración (0,5 y 1% p/v), y dos tiempos de contacto (1 y 3 h) a temperatura ambiente. Los resultados fueron evaluados en términos de % deslignificación, rendimiento de metano y cinética del proceso según el modelo de primer orden. La máxima reducción de lignina (36,5%) y rendimiento de metano (192 mLCH₄/gSV) fueron obtenidos con NaOH (0,5%-3h), logrando un 94,6% de incremento en el rendimiento de metano respecto al bagazo sin pretratar. El estudio cinético confirmó que con esta variante se mejoran los parámetros respecto al bagazo sin pretratar.

Palabras clave: bagazo de caña; digestión anaerobia; pretratamiento alcalino; rendimiento de metano.

ABSTRACT

The sugar cane bagasse constitutes an abundant lignocellulosic agro-industrial residue in Cuban sugar industry. However, its complex structure partially limits biodegradation, for that reason it is necessary to apply a pretreatment, being the alkaline the most effective for biomasses with a high lignin content. This work objective is to evaluate the effect of alkaline pretreatment in cane bagasse delignification, and its anaerobic biodegradability with respect to without pretreatment bagasse. Two alkalis (NaOH and KOH) with two concentration levels (0.5 and 1% w/v), and two contact times (1 and 3 h), were studied at room temperature. Results were evaluated in terms of % delignification, methane yield and process kinetics according to a first order model. Maximum lignin reduction (36.5%) and methane yield (192 mLCH₄/g VS) were obtained with NaOH (0.5% -3h), achieving a 94.6% increase in methane yield respect to without pretreating bagasse. Kinetic study confirmed that kinetic parameters are improved compared to without pretreatment bagasse, with this variant.

Keywords: sugarcane bagasse; anaerobic digestion; alkaline pretreatment; methane yield.

1. INTRODUCCIÓN

La necesidad de encontrar nuevas fuentes de energía es un problema constante en el desarrollo tecnológico moderno, el cual adquiere mayor trascendencia debido al agotamiento previsible de los recursos naturales y fuentes de combustibles fósiles. En la actualidad, el estudio de los biocombustibles, ha ganado importancia debido principalmente a los problemas ambientales y energéticos. Esto ha originado la búsqueda de alternativas energéticas basadas en el uso de recursos renovables como los residuos agroindustriales. Estos residuos, se consideran en su mayoría sustratos lignocelulósicos, como la cáscara de arroz, pajas, residuos cafetaleros, desechos forestales y bagazo de diferentes biomásas, con gran potencial para la producción de bioenergía. Sin embargo, el mayor obstáculo que brindan estas biomásas en su biodegradación por vía anaerobia es la compleja estructura de lignina. Este compuesto se considera no biodegradable y de naturaleza recalcitrante, constituyendo una barrera para los microorganismos en la degradación de la holocelulosa durante la hidrólisis (Wunna et al., 2017). Debido a esto, el pretratamiento de biomásas lignocelulósicas puede representar una solución factible para mejorar la biodegradabilidad del material, con la consecuente aceleración de la hidrólisis e incrementos en el rendimiento de metano (Bolado et al., 2016). El presente trabajo se enfoca en el estudio preliminar del pretratamiento alcalino, los cuales son aplicados básicamente en materiales lignocelulósicos con un elevado contenido de lignina, como la paja de trigo y el bagazo de caña de azúcar (Taherdanak y Zilouei, 2014). El empleo de diferentes álcalis como hidróxidos de sodio, potasio, calcio y amonio son efectivos modificando la estructura y solubilizando la lignina presente en el material. Además, reduce el grado de inhibición durante el proceso de degradación anaerobia y proporciona un menor costo de producción (Bolado et al., 2016). Por otra parte, la presencia de una pequeña cantidad de álcalis residual en la biomasa pretratada ayuda a prevenir la disminución del pH

durante la etapa de acidogénesis (Taherdanak y Zilouei, 2014), siendo el tratamiento alcalino más efectivo y compatible con la digestión anaerobia en comparación con otros métodos de pretratamientos como los termoquímicos (Zhu et al., 2010). La mayoría de los estudios consultados en la literatura se enfocan en el pretratamiento termo-alcalino de biomásas lignocelulósicas, lo cual favorece la deslignificación del material, alcanzando valores superiores al 50% (Grace et al., 2013). Sin embargo, esta combinación de métodos incide negativamente en el costo económico del proceso a escala industrial. Es por ello, que el presente trabajo tiene como objetivo principal evaluar el efecto del pretratamiento alcalino del bagazo de caña a temperatura ambiente, sobre la solubilización de lignina, el rendimiento de metano y la cinética de biodegradabilidad en sistemas en discontinuo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Sustrato e inóculo

El bagazo de caña (BC), proveniente del Central Azucarero Industrial “Héctor Molina Riaño”, fue secado a 35°C en la estufa, molido y tamizado hasta obtener un tamaño de partícula inferior a 2 mm. Se almacenó en bolsas de nylon selladas 4°C hasta su uso. El inóculo empleado en los ensayos anaerobios provino de una planta de biogás a escala piloto que trata residuales porcinos, ubicada en el Instituto de Investigaciones Porcinas en San José de las Lajas, Mayabeque. Posteriormente, se almacenó durante tres días en condiciones anaerobias para el agotamiento de posibles sustratos en su composición.

2.2. Pretratamiento alcalino

El pretratamiento incluyó el estudio de dos álcalis NaOH y KOH, con dos niveles de concentración (0,5 y 1,0% p/v) y dos tiempos de contactos (1 y 3 h), respondiendo a un diseño experimental multifactorial categórico 2². Ambos estudios fueron realizados bajo las mismas condiciones experimentales. Se utilizó una relación sólido-líquido de 1:20 (1 g de bagazo: 20 mL de solución alcalina), correspondiendo a una carga de sólidos de 5%. La mejor variante de pretratamiento se seleccionó utilizando como criterio el % deslignificación. A partir del diseño experimental se evaluó el efecto de las diferentes condiciones de pretratamiento, en términos de % deslignificación y rendimiento de metano (Y_{CH_4}). Se analizaron las diferencias significativas entre las variantes, a través del análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de múltiples rangos (método de Tukey), empleando el paquete estadístico *Statgraphics Centurion XVI.II*.

2.3. Ensayo anaerobio en sistema discontinuo

El ensayo anaerobio se desarrolló según el método eudiómetro DIN 38414-8 (VDI-4630, 2006). Como sustratos se emplearon el bagazo de caña sin pretratar (BC-S/P), y la mejor variante de pretratamiento de bagazo de caña con NaOH y KOH. Los experimentos fueron desarrollados en reactores de vidrio de 500 mL de capacidad, en condiciones mesofílicas (38 ± 1°C), durante 23 días de digestión. Las variantes se estudiaron por triplicado y en cada frasco se adicionó 300 mL de inóculo e igual masa de sustrato (5,23 g), con una relación sustrato/inóculo (π) de 0,5 (VDI-4630, 2006). Se utilizó un reactor control (frasco con inóculo sin sustrato), con el objetivo de restar en la determinación del rendimiento de metano del sustrato, el metano formado a partir de la

materia orgánica aportada por el inóculo. Los reactores se agitaron manualmente una vez al día y el volumen de gas se midió diariamente como el equivalente del volumen desplazado de solución de hidróxido de sodio (NaOH 15% p/v). Los valores se reportaron en condiciones de temperatura y presión estándar (0°C y 1 atm), según la ley de gas ideal (VDI-4630, 2006). El proceso fue evaluado en términos de Y_{CH_4} , y los parámetros cinéticos: constante cinética aparente (k_0) y rendimiento de metano específico (Y_m) obtenidos según el modelo de 1^{er} orden ($Y=Y_m(1-e^{-k_0 \cdot t})$).

2.4 Métodos analíticos

La composición de celulosa, hemicelulosa y lignina del bagazo se determinó según las normas: ANSI/ASTM D1103-60, ANSI/ASTM D1106-56 y ANSI/ASTM D1105-56, respectivamente. La caracterización físico-química del bagazo de caña y el inóculo comprendió además el análisis de los sólidos totales (ST) y sólidos volátiles (SV), según los métodos estandarizados (APHA, 2012). El pH se determinó empleando un pHmetro CRISSON PH 25.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización del bagazo de caña e inóculo

En la tabla 1 se presenta la caracterización de los materiales empleados en la investigación. Se aprecia un elevado contenido de SV en el bagazo, lo que lo convierte en un material con potencialidades para ser biodegradado por vía anaerobia. Estudios anteriores han referido valores similares de SV para el bagazo de caña, en un intervalo de 96-98% (Cao et al., 2017).

Tabla 1. Caracterización de las materias primas empleadas

<i>Parámetros</i>	<i>Bagazo de caña</i>	<i>Inóculo</i>
<i>Físico-químicos</i>		
pH	-	7,3
ST (gST/g biomasa)	0,7073	0,6932
SV (gSV/g biomasa)	0,0532	0,0245
SV (%ST)	98,0	46,0
<i>Fibras</i>		
Lignina (%)	26,7	-
Celulosa (%)	37,4	-
Hemicelulosa (%)	35,0	-

Se destaca el elevado contenido de lignina presente en el bagazo, aspecto característico de las biomásas agroindustriales. Los valores de lignina, celulosa y hemicelulosa, se encuentran en los intervalos: 15–35%; 25–47% y 20–35%, respectivamente, referidos en la literatura para este tipo de biomasa (Costa et al., 2014). La celulosa y hemicelulosa forman una red de polímeros con la lignina, que dificulta su degradación anaerobia, resultando en bajos valores de producción de metano. El pretratamiento alcalino puede eliminar parcialmente la fracción de lignina, y solubilizar la fracción de hemicelulosa, favoreciendo la hidrólisis de la celulosa y la conversión a metano (Talha et al., 2016). El

inóculo muestra un contenido de SV adecuado para garantizar una concentración apropiada de biomasa microbiana en la arrancada del proceso anaerobio.

3.2. Pretratamiento alcalino

El contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa después del pretratamiento alcalino de bagazo de caña se muestra en la tabla 2. Los resultados preliminares indican que es posible solubilizar la lignina contenida en la estructura del bagazo entre 5-36%, correspondiendo los mayores valores de solubilización de lignina (36,5% y 16,5%), al pretratamiento con NaOH (0,5% - 3h) y KOH (0,5% - 3h), respectivamente. En estas variantes, las fracciones de celulosa y hemicelulosa incrementaron en un 18% y 3%, alcanzándose el mayor valor con el empleo de NaOH (0,5% - 3h). Estos resultados son consistentes con los reportados por Maryana et al., (2014) y Talha et al., (2016), quienes evaluaron el efecto del pretratamiento termo-alcalino en el bagazo de caña, bajo diferentes condiciones de concentración de NaOH (1-4%), temperatura (100-121°C) y tiempos de contacto (15, 30 y 45 min). La máxima reducción de lignina (92%) fue alcanzada con la combinación de NaOH 1%, 100°C y 45 min.

Tabla 2. Contenido de lignina (L), celulosa (Cel.) y hemicelulosa (Hem.) del bagazo de caña: sin pretratar (BC-S/P) y pretratado (BC-PT). % solubilización de lignina

<i>Bagazo de caña (BC)</i>		<i>Condiciones pretratamiento</i>	<i>L (%)</i>	<i>Cel. (%)</i>	<i>Hem. (%)</i>	<i>Solubilización lignina (%)</i>
BC S/P		-	26,7	37,4	35,0	-
BC P/T	NaOH	0,5% -1h	24,2	39,3	36,2	9,9
		0,5% -3h	17,0	44,2	38,4	36,5
		1,0% -1h	24,8	38,5	36,2	7,2
		1,0% -3h	23,1	38,1	38,2	13,6
	KOH	0,5% -1h	23,5	38,7	37,4	12,5
		0,5% -3h	22,3	38,5	38,3	16,5
		1,0% -1h	24,8	39,5	35,3	7,4
		1,0% -3h	25,3	38,4	35,6	5,4

El empleo del pretratamiento alcalino a elevadas temperaturas, permite alcanzar valores elevados de solubilización de lignina, sin embargo, esta técnica influye negativamente sobre la factibilidad económica del proceso a escala industrial. En el presente estudio, se alcanzan valores de solubilización de lignina con ambos álcalis (NaOH y KOH), inferiores a este intervalo (36,5 y 16,5%, respectivamente). Aunque, es de destacar que las condiciones de pretratamiento difieren: álcali 0,5%, 25°C y 3h, requiriéndose de una menor concentración de álcalis y un mayor tiempo para lograr el % de deslignificación obtenido, sin incurrir en un consumo adicional de energía. Los resultados previos indican que las mejores condiciones de pretratamiento con NaOH y KOH son: concentración de 0,5% y 3 h de tiempo de contacto.

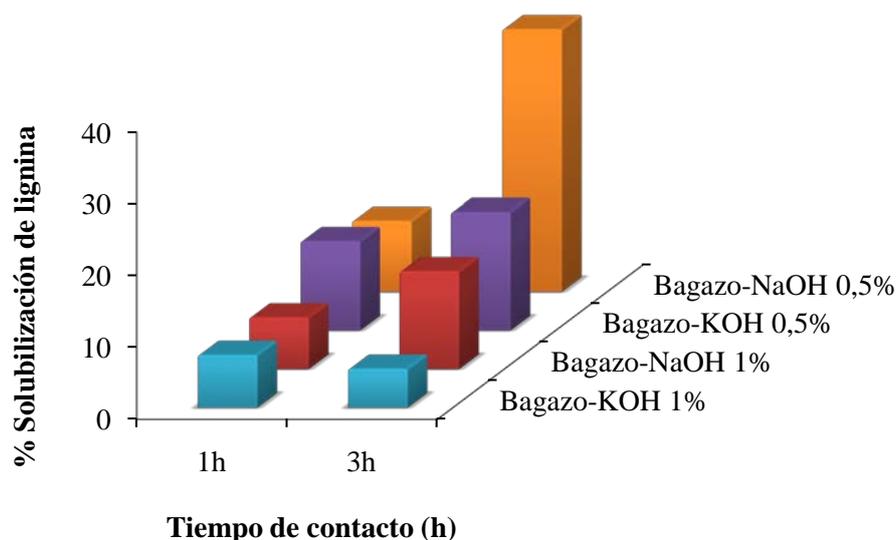


Figura 1. Solubilización (%) de lignina en el bagazo de caña pretratado

3.3. Efecto del pretratamiento alcalino sobre el rendimiento de metano

La figura 2 muestra el comportamiento de la degradación anaerobia del bagazo de caña sin pretratar y pretratado con NaOH y KOH (0,5% - 3h), durante los 23 días de experimentación. La desviación estándar se representa como barras de error.

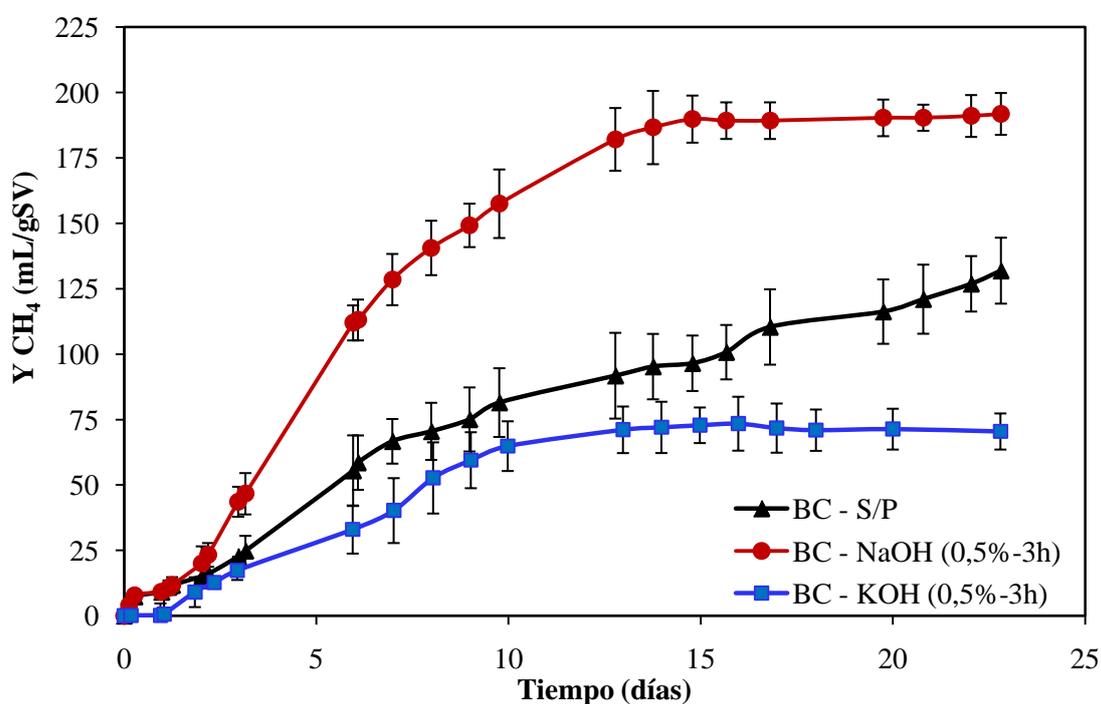


Figura 2. YCH₄ obtenido en la degradación de bagazo de caña sin pretratar (BC S/P) y pretratado con NaOH y KOH

El mayor rendimiento de metano acumulado fue de 192 mL/gSV, durante la degradación de bagazo de caña pretratado con NaOH (0,5%-3h), con un incremento significativo del 94,7%, respecto al bagazo sin pretratar (98,6 mL/gSV). Este

comportamiento indica que el pretratamiento con NaOH permite acelerar la velocidad de producción de metano, debido a una mayor solubilización de lignina y degradación de azúcares fermentables en el bagazo pretratado (Costa et al., 2014; Talha et al., 2016). El efecto de deslignificación del NaOH conlleva a la formación de agujeros en la superficie de la biomasa, lo que incrementa el área superficial interna de la fracción lignocelulósica, debilitando la integridad estructural de la lignina (Talha et al., 2016).

Por el contrario, el pretratamiento con KOH (0,5%-3h) mostró el menor valor de rendimiento (73,5 mLCH₄/gSV) (Tabla 2, Figura 2). Este resultado no es coherente con los trabajos previos reportados en la literatura, donde se refieren incrementos de este parámetro entre 16-128%, a partir de la degradación de paja de trigo pretratada con KOH (2-50%) (Liu et al., 2015; Romero-Güiza et al., 2017). Aunque se espera que, a partir del pretratamiento, la biomasa solubilizada se encuentre más disponible para la microbiota anaerobia, los resultados preliminares obtenidos en este estudio muestran que en algunos casos el pretratamiento puede ocasionar una disminución en la biodegradabilidad. Esto puede explicarse por la presencia de compuestos recalcitrantes o inhibitorios posterior al pretratamiento (Ferreira et al., 2013).

Estudios previos sobre pretratamiento alcalino de materiales lignocelulósicos como el bagazo de caña y la paja de trigo, han demostrado que es posible mejorar la biodegradabilidad de estas biomásas con el consecuente incremento en el rendimiento de metano (Bolado et al., 2016; Mancini et al., 2018). Estos autores reportan valores de Y_{CH₄} en el intervalo de 195-420 mL/gSV, con incrementos entre 20 - 157%, respecto a la biomasa no tratada, evaluados bajo condiciones específicas de pretratamiento alcalino (NaOH 1 - 4% p/v; 100 - 184°C y 45 min - 24 h). La variación del Y_{CH₄} puede ser justificado por (i) diferentes condiciones de pretratamientos y operacionales en el proceso anaerobio (Zhao et al., 2012), (ii) efectos sinérgicos por la implementación de la co-digestión (Mata-Alvarez et al., 2014) o (iii) adaptación microbiana del sustrato (Palatsi et al., 2010).

Los valores de Y_{CH₄} referidos en la literatura están en correspondencia con los obtenidos en el presente trabajo, aunque en algunos casos superan a los indicados en este estudio. Esto se debe a la aplicación del pretratamiento termoalcalino, donde se combina una elevada temperatura de reacción con la acción alcalina, logrando una mayor eficiencia de conversión en el proceso anaerobio. La elevada temperatura permite una mayor solubilización de la fracción de hemicelulosa con la reducción del grado de polimerización, así como la producción de ácido acético, el cual actúa como catalizador de la reacción (Hu et al., 2011). Al mismo tiempo, el álcali promueve la solubilización de la lignina, incrementa la porosidad del material y consecuentemente una mayor accesibilidad para las exoenzimas durante la hidrólisis (Zhang et al., 2004).

Los resultados obtenidos a partir del bagazo de caña pretratado con 0,5% NaOH y 3 h, confirman que el pretratamiento alcalino puede ser una alternativa viable para mejorar el rendimiento de metano de biomásas lignocelulósicas.

3.3.1. Cinética de la biodegradabilidad

En la tabla 3 se indican los valores predichos obtenidos según el modelo de 1^{er} orden, así como los coeficientes de correlación para cada variante evaluada. El modelo cinético muestra que ambos pretratamientos alcalinos tuvieron una influencia positiva sobre la

tasa de hidrólisis. Esto significa que la solubilización de la materia orgánica es una consecuencia del efecto de la concentración de álcali y el tiempo de residencia.

Tabla 3. Modelos cinéticos obtenidos para el rendimiento de metano acumulado a partir del bagazo sin pretratar y pretratado con NaOH y KOH

<i>Variantes</i>	<i>Modelo cinético</i>	<i>R²</i>
BC S/P	$y(t) = 112,7 (1 - e^{-0,079 \cdot t})$	98,3
BC-NaOH (0,5%-3h)	$y(t) = 223,2 (1 - e^{-0,109 \cdot t})$	97,2
BC-KOH (0,5%-3h)	$y(t) = 78,2 (1 - e^{-0,234 \cdot t})$	95,8

El bagazo pretratado con NaOH muestra el valor más alto de velocidad específica de producción de metano ($Y_m=223,2$ mLCH₄/gSV), con un coeficiente cinético de hidrólisis superior al bagazo sin pretratar, debido al % de solubilización (36,5%) alcanzado durante el pretratamiento. El pretratamiento con KOH muestra el mayor valor de k_0 , aunque la menor Y_m , lo que indica una rápida conversión de los compuestos solubilizados al inicio del proceso anaerobio, seguido de una disminución de la producción de metano, probablemente debido a la presencia de compuestos inhibitorios formados en la etapa de hidrólisis. En cambio, el bagazo S/P expresa la menor constante de hidrólisis, debido a su estructura lignocelulósica, lo que confirma que la biometanización del bagazo de caña es limitado por la hidrólisis.

4. CONCLUSIONES

1. El pretratamiento alcalino puede selectivamente eliminar la fracción de lignina e incrementar la biodegradabilidad del bagazo de caña.
2. El bagazo pretratado con NaOH 0,5% p/v durante 3h a temperatura ambiente, logra el mayor % deslignificación (36,5 %).
3. La digestión anaerobia de bagazo pretratado con NaOH 0,5% y 3h expresó el mayor rendimiento de metano de 192 mL/gSV con 94,7% de incremento, respecto al bagazo sin pretratar, siendo la mejor condición de pretratamiento alcalino. El tiempo de digestión del bagazo pretratado con ambos álcalis se redujo en un 43% comparado con el bagazo sin pretratar.
4. El estudio cinético confirmó que el pretratamiento con NaOH bajo las condiciones estudiadas, mejora la degradabilidad del bagazo, promoviendo un incremento en la conversión a metano.

REFERENCIAS

- APHA-AWWA-WEF, Standard Methods for examination of water and wastewater., American Public Health Association, Washington DC, USA, 2012.
- Bolado, S., Toquer, C., Martín, J., Travaini, R., and García, P., Effect of thermal, acid, alkaline and alkaline-peroxide pretreatments on the biochemical methane potential and kinetics of the anaerobic digestion of wheat straw and sugarcane bagasse., *Bioresour Technol*, Vol. 201, 2016, pp. 182-190.
- Cao, W., Sun, C., Li, X., Qiu, J., and Liu, R., Methane production enhancement from products of alkaline hydrogen peroxide pretreated sweet sorghum bagasse., *Royal Society of Chemistry*, Vol. 10, No.7, 2017, pp. 5701-5707.

- Costa, A., Pinheiro, F., Santos, A., Santaella, S., and Leitao, R., The use of thermochemical pretreatment to enhance the anaerobic biodegradability of sugarcane bagasse., *Chemical Engineering Journal*, Vol. 248, 2014, pp. 363–372.
- Ferreira, L.C., Donoso-Bravo, A., Nilsen, P.J., Fdz-Polanco, F., and Pérez-Elvira, S.I., Influence of thermal pretreatment on the biochemical methane potential of wheat straw., *Bioresour Technol*, Vol. 143, 2013, pp. 251–257.
- Grace, S., Lorenci, A., Thomaz, V., and Ricardo, C., Pretreatment strategies for delignification of sugarcane bagasse: a review., *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Vol. 56, No. 4, 2013, pp. 679-689.
- Hu, F., and Ragauskas, A.J., Hydrothermal pretreatment of switchgrass., *Ind. Eng. Chim. Res*, Vol. 50, No. 8, 2011, pp. 4225–4230.
- Liu, X., Zicari, S.M., Liu, G., Li, Y., and Zhang, R., Pretreatment of wheat straw with potassium hydroxide for increasing enzymatic and microbial degradability., *Bioresource Technology*, Vol. 185, 2015, pp. 150-157.
- Mancini, G., Papirio, S., Lens, P.N.L., and Esposito, G., Increased biogas production from wheat straw by chemical pretreatments., *Renewable Energy*, Vol. 119, 2018, pp. 608-614.
- Maryana, R., Ma'rifatun, D., Wheni, A., Satriyo, K.W., and Rizal, A., Alkaline pretreatment on sugarcane bagasse for bioethanol production., *Energy Procedia*, Vol. 47, 2014, pp. 250-254.
- Mata-Alvarez, J., Dosta, J., Romero-Güiza, M.S., Fonoll, X., Peces, M., and Astals, S., A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013., *Renew. Sust. Energ. Rev.*, Vol. 36, 2014, pp. 412-427.
- Palatsi, J., Illa, J., Prenafeta-Boldú, F.X., Laurenzi, M., Fernandez, B., Angelidaki, I., and Flotats, X., Long-chain fatty acids inhibition and adaptation process in anaerobic thermophilic digestion: batch tests, microbial community structure and mathematical modelling., *Bioresour. Technol.*, Vol. 101, No. 7, 2010, pp. 2243–2251.
- Romero-Güiza, M., Wahid, R., Hernández, V., Møller, H., Fernández, B., Improvement of wheat straw anaerobic digestion through alkali pre-treatment: Carbohydrates bioavailability evaluation and economic feasibility., *Science of the Total Environment*, Vol. 595, 2017, pp. 651-659.
- Taherdanak, M., and Zilouei, H., Improving biogas production from wheat plant using alkaline pretreatment., *Fuel*, Vol. 115, 2014, pp. 714–719.
- Talha, Z., Ding, W., Mehryar, E., Hassan, M., and Bi, J., Alkaline pretreatment of sugarcane bagasse and filter mud. Codigested to improve biomethane production., *BioMed Research International*, Vol. 2016, 2016, pp. 1-10.
- VDI-4630., *Gesellschaft Energietechnik: Vergärung organischer Stoffe (Fermentation of organic materials Characterisation of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests)*, VDI-Handbuch Energietechnik, Germany, 2006, pp. 1-92.
- Wunna, K., Nakasaki, K., Auresenia, J.L., Abella, L.C., and Gaspillo, P.D., Effect of alkali pretreatment on removal of lignin from sugarcane bagasse., *Chemical Engineering Transactions*, Vol. 56, 2017, pp. 1831- 1836.
- Zhang, Y.H.P., and Lynd, L.R., Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems., *Biotechnol. Bioeng.*, Vol.

88, No. 7, 2004, pp. 797–824.

Zhao, X.Q., Zi, L.H., Bai, F.W., Lin, H.L., Hao, X.M., Yue, G.J., and Ho, N.W.Y., Bioethanol from lignocellulosic biomass., *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, Vol. 128, 2012, pp. 25–51.

Zhu, J., Wan, C., and Li, Y. Enhanced solid-state anaerobic digestion of corn stover by alkaline pretreatment., *Bioresour. Technol.*, Vol. 101, No. 19, 2010, pp. 7523-7528.