

Valorisation de la biomasse lignocellulosique pour la production de bioéthanol de deuxième génération

Nouredine Eloutassi ^{1*}, Bouchra Louaste ², Latifa Boudine ² et Adnane Remmal ²

¹ Centre Régional des Métiers de l'Éducation et de la Formation, CRMEF
B.P. 49, 30000, VN Fès, Maroc

² Laboratoire de Biotechnologie, Département de Biologie, Faculté des Sciences
Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Fès, Maroc

(reçu le 16 Décembre 2012 – accepté le 16 Décembre 2014)

Résumé - Les différentes exploitations industrielles sur les plantes entraînent la formation de considérables déchets lignocellulosiques nommés biomasse. La présente étude a pour but la valorisation de cette biomasse en produisant du bioéthanol de deuxième génération, il s'agit d'une valorisation optimale qui passe par l'exploitation de la totalité des débouchés dans une approche intégrée de type "bioraffinerie" pour la production des sucres simples fermentescibles à haute valeur ajoutée. Dans une première étape, la biomasse a été dépolymérisée par un traitement à la vapeur. Ensuite, un traitement par l'acide sulfurique a été effectué pour la saccharification et la libération des sucres simples. Dans une deuxième étape et dans le but de réduire les composés phénoliques, le substrat issu a été décanté et filtré puis traité par le dihydroxyde de calcium. Parallèlement à l'hydrolyse chimique, la biomasse a été prétraitée par la steam explosion pour rendre tous ces composés accessibles à l'hydrolyse enzymatique. En plus, les techniques et les variables d'hydrolyse chimique et biologique (la température, la pression, le temps, la concentration et les conditions de détoxification et de production d'enzyme) ont été optimisés. En conclusion, ce travail a permis de mettre au point un procédé biotechnologique pour valoriser la biomasse solide, qui permet non seulement de réduire l'impact environnemental, mais aussi de diminuer les coûts et d'ajouter une valeur socio-économique à ces déchets.

Abstract - The various industrial operations on plants lead to the formation of enormous lignocellulosic waste named biomass. The aim of this study is the valuation of this biomass by producing bioethanol of the second-generation; it is an approach of "biorefinery" that produces fermentable simple sugars of high value. In a first step, the biomass was depolymerized by a steam treatment. Then, treatment with sulfuric acid was carried out to saccharification and release of simple sugars. In a second step and in order to reduce the phenolic compounds, the resulting substrate was decanted and filtered and then treated with calcium dihydroxide. Parallel to the chemical hydrolysis, biomass was pretreated by steam explosion to make available all these compounds before performing to enzymatic hydrolysis. In addition, the techniques and the chemical and biological hydrolysis variables (temperature, pressure, time, concentration and conditions of detoxification and enzyme production) were optimized. In conclusion, this work is a development of a biotechnological process to value the solid biomass, which can not only reduce environmental impact, but also reduce costs and add value socioeconomic to this waste.

Mots clés: Déchets lignocellulosiques - Traitements physicochimique et biologique - Mono et polysaccharide.

1. INTRODUCTION

Généralement, l'industrie agroalimentaire et de transformation des plantes fournissent des quantités importantes de déchets lignocellulosiques qui sont mal exploitées. Aussi, avec l'augmentation du prix de pétrole et l'aggravation des émissions de gaz à effet de serre (équivalents de CO₂) justifient la recherche de matières premières et de technologies alternatives capables de réduire la dépendance en ces combustibles

* eloutassinouredine@gmail.com

fossiles et de protéger l'environnement [1, 2]. Le bioéthanol est déjà utilisé pour substituer une fraction du volume d'essence dans nombreux pays [3-5].

En effet la biomasse lignocellulosique des plantes contient des sucres polymérisés en cellulose et hémicellulose peut fournir du bioéthanol après plusieurs étapes de prétraitement et d'hydrolyse physique, chimique et biologique dites 'bio raffinerie'. Le bio raffinage peut être défini comme un processus durable de transformation de la biomasse en produits bio basés (alimentation, produits chimiques, matériaux) et en bioénergie (biocarburants, électricité, chaleur). Le concept de bio raffinerie est analogue à celui du raffinage de pétrole (Fig. 1 et 2) qui produit différents carburants et produits chimiques [1, 2, 6, 7].

Dans le cadre de notre travail, les déchets issus de l'industrie de transformation des plantes ont été traités pour la production de sucres monomères. L'étude est divisée en deux grandes phases. La première est une étude détaillée de l'hydrolyse chimique de la matière lignocellulosique. Tandis que la deuxième phase, c'est un traitement biologique par des enzymes. Les deux phases ont été accompagnées par un prétraitement à la vapeur, dite aussi la technique du steam explosion.

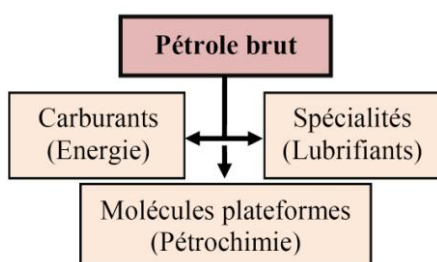


Fig. 1: Raffinage du pétrole en carburants, molécules plateformes et spécialités

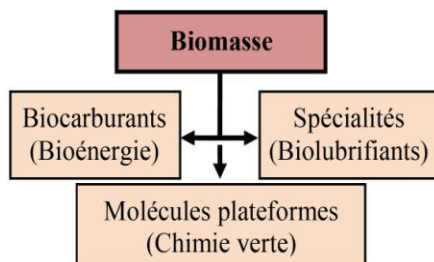


Fig. 2: Raffinage de la biomasse en biocarburants, molécules plateformes et spécialités

2. MATERIAUX ET METHODOLOGIE

2.1 Prétraitement à la vapeur / steam explosion

La steam explosion ou le prétraitement à la vapeur est un procédé thermo-mécano-chimique qui hydrolyse la matière lignocellulosique. Le procédé est composé de deux phases distinctes: le vapocraquage et la décompression explosive.

Dans ces conditions, 1 kg de déchets de la biomasse résiduelle de l'industrie de distillation de romarin [8] a été rincé avec de l'eau pure et filtré. Le résidu est prétraité à la vapeur dans un autoclave (20 min à 270 °C), le temps de la dépressurisation était de 1 à 2 s. chaque 5 mn (Fig. 3).

2.2 Hydrolyse acide

Le résidu est traité ensuite par l'acide sulfurique dans un extracteur à reflux. La concentration de l'acide sulfurique et le temps de traitement ont été optimisés par la méthode de planification des expériences [9]. Les conditions optimales utilisées pour rompre les liaisons osidiques et produire des monomères sont 0.5 % d'acide sulfurique pendant 50 min.

2.3 Elimination des inhibiteurs de la fermentation

La précipitation des composés phénoliques résultants de différents hydrolyses sont, postérieurement, des inhibiteurs de la fermentation alcoolique, est réalisée par

l'augmentation du pH de l'hydrolysate à 9 avec le dihydroxyde de calcium ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) [3, 10, 11].

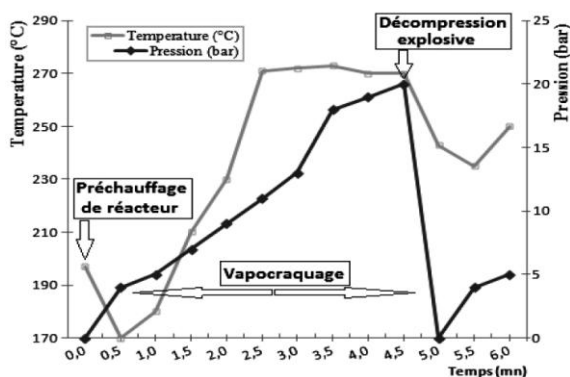


Fig. 3: Principe du prétraitement à la vapeur / steam explosion

2.4 Hydrolyse enzymatique

Dans le processus biologique, l'hydrolyse est catalysée par des enzymes appelées génériquement cellulases (composés d'endo- et d'exo-glucanases et de β -glucosidases). Ainsi, comme dans les processus acides, un prétraitement est nécessaire pour exposer la cellulose à l'attaque des enzymes. La préparation des enzymes a été obtenue à partir du surnageant du milieu de culture de la souche *Trichoderma reesei* cultivée sur la cellulose comme source de carbone et d'énergie [12].

2.5 Analyses

La teneur en sucres réducteurs est déterminée par la méthode de l'acide dinitrosalicylique (DNS). La méthode phénol-acide sulfurique est utilisée pour évaluer la proportion de chaque sucre monomère, issu de l'hydrolyse [13, 14].

Les trois fractions de la biomasse lignocellulosique; la cellulose, l'hémicellulose et la lignine ont été recherchées [15, 16].

Les composés phénoliques ont été analysés par la méthode Folin-Ciocalteu modifiée [3, 17].

3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

Cette étude consiste à une bio raffinerie de la biomasse pour produire de la bioéthanol de deuxième génération.

La figure 4 résume les différentes étapes de ce travail. Elle comporte le prétraitement à la vapeur (steam explosion) suivi par l'hydrolyse acide et l'hydrolyse enzymatique qui ont été terminés par l'élimination des composés phénoliques et des acides organiques résultants.

● Constituants du résidu lignocellulosique

La biomasse lignocellulosique est une des principales ressources renouvelables présentes sur terre [5, 18, 19]. Elle est composée essentiellement de trois polymères, la cellulose, l'hémicellulose et la lignine (Fig. 5).

Les teneurs de différents constituants sont variables d'une espèce végétale à l'autre [11]. Dans ce travail, la biomasse lignocellulosique est résiduelle de l'industrie de

distillation de romarin et de parties non distillées. La teneur de leurs trois composées principales est-

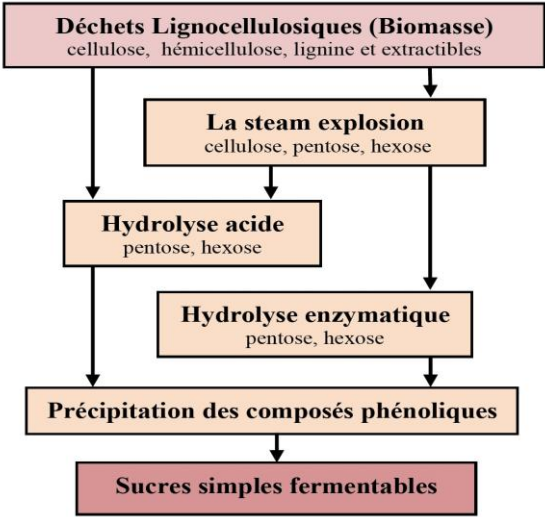


Fig. 4: Processus de traitement physico-chimique et biologique de la Biomasse

Cellulose

La cellulose est une molécule linéaire non ramifiée constituée de milliers de monomères de glucoses liés par des liaisons osidiques. Environ 80 molécules de cellulose s’associent par des liaisons hydrogène pour former des microfibrilles. Un grand nombre de microfibrilles entrelacées forme une fibrille de cellulose [15, 16, 20, 21]. Nous avons trouvé que la cellulose est la composante principale de déchets lignocellulosique. Elle est de l’ordre de 48%. L’hydrolyse de la cellulose conduit à la production de sucres monomères fermentescibles (cellubiose, glucose et xylose).

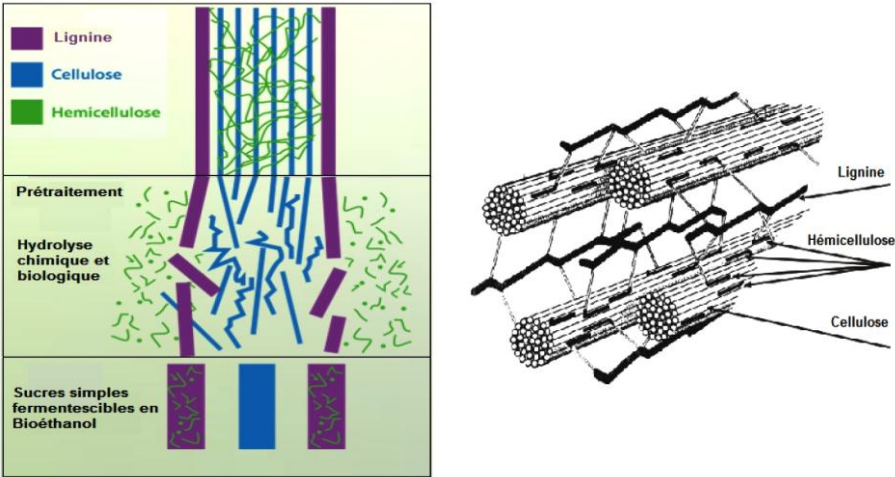


Fig. 5: Constituants de la matière lignocellulosique et les résultats schématisques du procédés

Hémicelluloses

Les hémicelluloses sont des polysaccharides non cellulotiques se distinguant de la cellulose par le fait qu'ils soient des polymères hétérogènes (hétéropolysaccharides) à chaînes plus courtes et branchées [12, 15, 16]. Elle représente 33% de la biomasse non traitée. Après traitement, cette fraction est essentiellement constituée de pentoses (comme la xylose) et de glucose.

La lignine et les extractibles

La lignine se présente dans les interstices qui cimentent les chaînes de cellulose et d'hémicelluloses. Elles contiennent des molécules ayant des propriétés pharmaceutiques importantes (Téropénoïds, stéroïdes, composés phénolique et les composés inorganiques). Elle peut diminuer le rendement de la fermentation alcoolique [15, 16, 21, 22]. Dans notre échantillon, la lignine est de l'ordre de 17 %.

4. TRAITEMENT DE LA MATIERE LIGNOCELLULOSIQUE

4.1 Prétraitement à la vapeur

Le prétraitement à la vapeur ou appelé encore steam explosion est une technique très prometteuse pour la biomasse ligno cellulotique avant bioconversion. Il brise les liaisons hydrogène qui relient les molécules de cellulose et d'hémicellulose et autorise un fractionnement efficace des composants constitutifs [6, 7, 23], ce qui les rend plus disponibles pour l'hydrolyse acide et l'hydrolyse enzymatique.

Le prétraitement a été optimisé à 270 °C pendant 20 min. les résultats sont présentés sur la figure 5, qui montre la déstructuration de la matière ligno cellulotique. On remarque une variation considérable de la libération des composés phénoliques en fonction du temps de prétraitement, tandis que le taux des sucres dans le milieu reste constant.

Comme décrit dans la partie, 'matériel et méthodes', le procédé est composé de deux phases, le vapocraquage et la décompression explosive. Dans la première phase, le vapocraquage consiste à faire pénétrer par diffusion, puis à condenser, la vapeur sous haute pression à l'intérieur de la structure du matériau.

L'eau condensée à température élevée va initier l'hydrolyse des groupements acétyles contenus dans les xylanes et induire la formation d'acides organiques. Selon la sévérité des conditions de pression et de température, ainsi les acides formés catalysant l'hydrolyse des fractions hémicellulosiques, induire des modifications dans la structure des lignines et modifier le degré de cristallinité de la fraction cellulotique.

Alors que durant la deuxième phase, la décompression explosive provoque une chute brutale de pression, qui va entraîner la revaporisation d'une partie de l'eau condensée. L'expansion brutale de la vapeur induit des forces de cisaillement qui modifient les propriétés physiques (granulométrie, surface spécifique, rétention d'eau...) du matériau.

Dans la littérature, le prétraitement de la biomasse est absolument indispensable pour l'étape biologique car les enzymes sont très peu actives sur la biomasse à l'état brut [18, 19, 23, 24].

En même temps, pour qu'un prétraitement soit efficace et augmente la valeur des différents composants de la biomasse, il est important d'établir des conditions limitant la formation de produits de dégradation qui peuvent inhiber l'étape de fermentation [23, 25, 26].

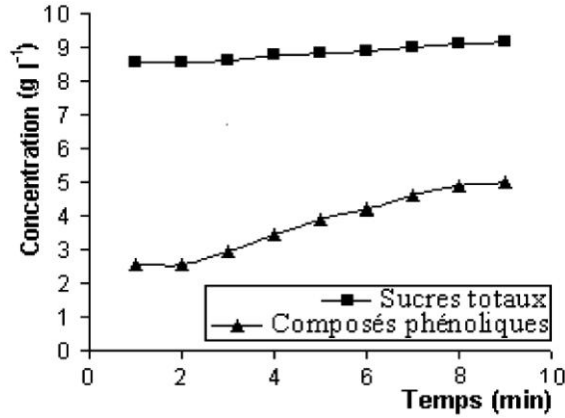


Fig. 5: Libération des sucres totaux et des composés phénoliques pendant le prétraitement

4.2 Hydrolyse acide

Plusieurs concentrations d’acide sulfurique ont été testées sur le substrat prétraité à la vapeur. Le dosage des sucres [13] nous a permis de déterminer les conditions optimales d’hydrolyse acide de la cellulose et de l’hémicellulose en sucre simple qui sont de 0.5 % d’acide sulfurique à 100 °C (**Tableau 1**).

Tableau 1: Libération des sucres totaux et des composés phénoliques après 50 min de l’hydrolyse acide

Acide sulfurique (%)	Sucres totaux (g.l ⁻¹)	Composés phénoliques totaux (g.l ⁻¹)
0.1	10.85	14.25
0.5	22.5	14.25
1	22.5	14.25
2	22.5	14.25
5	22.5	14.25
10	22.5	14.25
20	22.5	14.25

L’application seule de l’hydrolyse acide amène à la dépolymérisation des hémicelluloses et l’obtention des résidus de pentoses. Selon la sévérité des conditions employées, une partie des résidus pentoses peut subir une réaction de déshydratation qui conduit à la formation de furfural.

La manière exacte de mettre en œuvre cette hydrolyse acide est très variable, mais il a été souvent combiné avec une explosion à la vapeur, ce qui conduit à la désintégration de la matière et l’obtention des résidus xylose sous la forme de sucres monomères [6, 7, 18, 19].

4.3 Précipitation des composés phénoliques totaux

Le prétraitement et l’hydrolyse acide provoquent la libération de composés phénoliques qui inhibent postérieurement la fermentation alcoolique. Dans le but d’améliorer le rendement en éthanol à partir du substrat de l’hydrolyse, le Ca (OH)₂ a été utilisé pour sa capacité à précipiter les composés phénoliques [18, 22].

La réduction de concentration des composés phénoliques qui est passée de 14.25 g/l à 5 g/l (**Tableau 2**) se traduit par une nette amélioration (40 %) du rendement de la fermentation alcoolique. Ce dernier résultat sera traité dans une autre étude.

Tableau 2: Evolution des composés phénoliques et des sucres en fonction des étapes de traitements de la biomasse lignocellulosique

Constituants de La biomasse	Concentration du départ	Traitement à la vapeur	Hydrolyse acide	Réduction des composés phénoliques
<i>Etapes de préparation de la matière lignocellulosiques</i>				
Glucose	6.05	6.55	9.6	9.5
Xylose	2.02	2.25	7.33	7.2
Mannose	0.015	0.02	2.37	2.37
Galactose	0.225	0.25	1.2	1.2
Cellulose et hémicellulose	8.8	9.2	0	0
Composés phénoliques totaux	2.5	5.1	14.25	5

4.4 Traitement enzymatique

Essentiellement, la biodégradation de la matière lignocellulosique est réalisée par des bactéries (*Ruminococcus*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermonospora*, *Streptomyces*...) et des champignons (*Aspergillus*, *Schizophyllum*, *Penicillium*, *Trichoderma*...).

Pour ce travail, on a utilisé *Trichoderma reesei* dans l'hydrolyse enzymatique, car elle a été l'espèce la plus étudiée pour la production de cellulases à des concentrations importantes et elle a fait l'objet d'utilisation industrielle. De plus, outre des cellulases, *T. reesei* produit des hémicellulases qui participent au processus d'hydrolyse des parois végétales [10, 12, 18, 24].

Dans un premier temps, il est nécessaire de récupérer les enzymes produites par ce champignon dans le milieu de culture et éventuellement de les conditionner avant leur mise en œuvre en hydrolyse. Les conditions optimales sont une température de 45-50 °C et un pH de 4,8 pendant un temps de culture et d'action optimisé à 40h (Fig. 7).

Ce principe est simple, car les sucres complexes sont brisés en sucres simples par l'action synergique des enzymes qui peut être définie par une bonne coordination dans l'hydrolyse. Les trois types d'enzymes impliquées dans le processus sont les cellulases endo 1,4 β -glucanases et exo 1,4 β -glucanases, qui hydrolysent les celluloses en cellobiose, et les β -glucosidases qui hydrolysent les cellobioses en glucose [10, 18].

Ainsi, la figure 7 présente déjà des rendements élevés des sucres simples (75%-85%) par l'hydrolyse enzymatique en plus, de grandes améliorations sont encore attendues (85% - 95%) si ce procédé est lié à la phase de steam explosion de la biomasse.

Aussi, les conditions sont relativement douces dans lesquelles elle est effectuée afin d'éviter de dénaturer les molécules initiales et de diminuer le cout de procédé. Et finalement, l'hydrolyse enzymatique génère peu de composés phénoliques et d'effluents à traiter et n'engendre pas de problèmes de corrosion [10, 12].

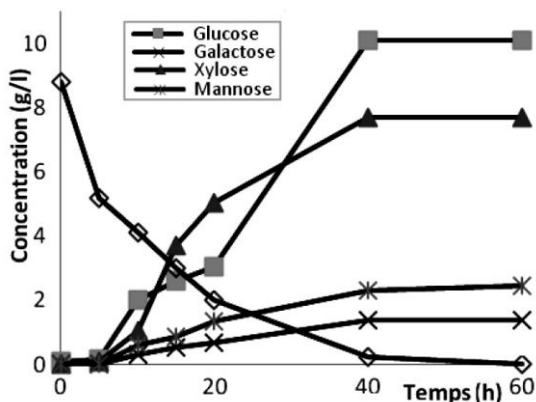


Fig. 6: hydrolyse enzymatique de la biomasse et formation des sucres simples monomères

5. CONCLUSION

Le présent article vise à présenter les effets de l'application d'une série de traitements de la matière lignocellulosique pour la production de bioéthanol de seconde génération. Il reprend les différents principes de multiples techniques utilisées et ses effets sur les fractions constitutives de la biomasse dans un contexte de bio raffinerie.

Les résultats obtenus dans ce travail permettent d'envisager des recherches plus approfondies pour la mise au point d'un procédé de valorisation de milliers de tonnes de matière lignocellulosique produite par les industries agroalimentaires et de transformations des plantes.

Ce procédé a le mérite d'être à la fois dépolluant, car il réduit énormément la quantité de déchets solides et valorisant par la production des substances simples qui peuvent être considérée comme une très bonne forme d'énergie renouvelable, propre et ne génère pas de gaz carbonique (CO_2) supplémentaire dans l'atmosphère.

Ce genre de procédé peut aussi améliorer les revenus des unités industrielles des pays producteurs de déchets et permettre le développement d'activités industrielles propres qui créeraient des opportunités d'emploi et offriraient une meilleure compétitivité sur le marché international.

REFERENCES

- [1] A. Margeot et F. Monot, 'Procédé de Production d'Alcool dans un Contexte de Bio Raffinerie', Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle, 2009, WO 2009/098365 A2.
- [2] P. Laurent, J. Roiz, J.L. Wertz, A. Richel et M. Paquot, 'Le Bioraffinage, une Alternative Prometteuse à la Pétrochimie', Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement, Vol. 15, N°4, pp. 597 - 610, 2011.
- [3] L.J. Jönsson, E. Palmqvist, N.O. Nilvebrant and B. Hahn-Hägerdal, 'Detoxification of Wood Hydrolyzates with Laccase and Peroxidase from the White-Rot Fungus *Trametes Versicolor*', Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 49, N°6, pp. 691 - 697, 1998.
- [4] J.C. Ogier, D. Ballerini, J.P. Leygue, J. Pourquie and L. Rigal, 'Production d'Ethanol à partir de Biomasse Lignocellulosique', Oil & Gas Science and Technology, Revue IFP, Vol. 54, N°1, pp. 67 - 94, 1999.

- [5] D. Ganesh and S.E.O. Saratale, '*Lignocellulosics to Ethanol: The Future of the Chemical and Energy Industry*', African Journal of Biotechnology, Vol. 11, N°5, pp. 1002 – 1013, 2012.
- [6] A. Khelfa, '*Etude des Etapes Primaires de la Dégradation Thermique de la Biomasse Lignocellulosique*', Doctorat d'Etat, Université Paul Verlaine, Metz, France, 2009.
- [7] R. Zeitoun, '*Procédés de Fractionnement de la Matière Végétale. Application à la Production des Polysaccharides du Son et de la Paille de Blé*', Thèse de Doctorat, Université de Toulouse, 2011.
- [8] N. Eloutassi, '*Contribution à la Valorisation de Rosmarinus officinalis Marocain*', Doctorat National, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Fès, Maroc, 2004.
- [9] R. Carlson and A. Nordahl, '*Exploring Organic Synthetic, Experimental Procedures*', Topics in Current Chemistry, Vol. 166, pp. 1 – 64, 1993.
- [10] R. Kumar, S. Singh and V.O. Singh, '*Bioconversion of Lignocellulosic Biomass: Biochemical and Molecular Perspectives*', Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, Vol. 35, N°5, pp. 377 – 391, 2008.
- [11] I. Diddenen, J. Destain and P. Thonart, '*La Production de Bioéthanol à Partir de la Biomasse Lignocellulosique*', Forêt Wallonnen, Vol. 104, pp. 39 – 45, 2010.
- [12] M. Warzywoda, D. Ballerini et F. Monot, '*Procédé de Production d'Enzymes Cellulolytiques et Hémicellulolytiques Utilisant les Résidus de Distillation de Fermentation Ethanolique d'Hydrolysats Enzymatiques de Matériaux (Ligno-) cellulosiques*', Fascicule de Brevet Européen 2011, 44, 5.
- [13] M. Dubois, A.K. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith, '*Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*', Analytical Chemistry, Vol. 28, pp. 350 – 356, 1956.
- [14] Xl. Xionggang, W. Xinlin, W. Yuanfeng, C. Qinjie and X. Jianbo, '*Determination of Tea Polysaccharides in Camellia Sinensis by a Modified Phenol-Sulfuric Acid Method*', Archives of Biological Sciences, Belgrade, Vol. 62, N°2, pp. 669 – 676, 2010.
- [15] B. Godin, F. Ghysel, R. Agneessens, T. Schmit, S. Goffot, S. Lamaudière, G. Sinnaeve, J.P. Goffart, P.A. Gerin, D. Stilmant et J. Delcarte, '*Détermination de la Cellulose, des Hémicelluloses, de la Lignine et des Cendres dans Diverses Cultures Lignocellulosiques Dédiées à La Production de Bioéthanol de Deuxième Génération*', Biotechnology, Agronomy, Society and Environment, Vol. 14, pp. 549 - 560, 2010.
- [16] B. Godin, R. Agneessens, S. Gofflot, S. Lamaudière, G. Sinnaeve, P.A. Guerin et J. Delcarte, '*Revue sur les Méthodes d'Analyse des Polysaccharides Structuraux des Biomasses Lignocellulosiques*', Biotechnology, Agronomy, Society and Environment, Vol. 15, pp. 165 – 182, 2011.
- [17] D.J. Box, '*Investigation of the Folin Ciocalten Phenol Reagent for the Determination of Polyphenolic Substances in Natural Waters*', Water Resource Research, Vol. 17, pp. 511 – 516, 1983.
- [18] H. Boussarsar, '*Application de Traitements Thermique et Enzymatique de Solubilisation et Saccharification de la Fraction Hemicellulosique en Vue de la Valorisation de la Bagasse de Canne à Sucre*', Doctorat d'Etat, Université de Reims Champagne-Ardenne, France, 2008.
- [19] M.J. Donohue, '*La Production de Carburants à Partir de la Biomasse Lignocellulosique par Voie Biologique: Etat de l'Art et Perspectives*', Technologie – Innovation, Vol. 15, N°3, pp. 172 – 177, 2008.
- [20] N.A. Campbell, '*Structure et Fonction des Macromolécules dans la Biologie*', De Boeck Université, 3^{ème} Edition, pp. 68 - 70, 1995.

- [21] Y. Lee, P. Iyer and R.W. Torget, '*Dilute Acid Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass*', In: *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, Vol. 65, pp. 94 – 11, 1999.
- [22] T.A. Clark and K.L. Mackie, '*Fermentation Inhibitors in Wood Hydrolysates Derived from the Softwood Pinus Radiata*', *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Vol. 34b, pp. 101 – 110, 1984.
- [23] N. Jacquet, C. Vanderghem, C. Blecker et M. Paquot, '*La Steam Explosion: Application en tant que Prétraitement de la Matière Lignocellulosique*', *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, Vol. 14, N°2, pp. 561 - 566, 2010.
- [24] C.E. Wyman, '*What is (and is not) Vital to Advancing Cellulosic Ethanol*', *Trends in Biotechnology*, Vol. 25, N°5, pp. 153 - 157, 2007.
- [25] M.A. Kabel, G. Bos, J. Zeevalking, A.G. Voragen and H.A. Schols, '*Effect of Pretreatment Severity on Xylan Solubility and Enzymatic Breakdown of the Remaining Cellulose from Wheat Straw*', *Bioresource Technology*, Vol. 98, N°12, pp. 20 – 34, 2007.
- [26] Y. Zheng, P. Zhongli and Z. Ruihong, '*Overview of Biomass Pretreatment for Cellulosic Ethanol Production*', *International Journal of Agricultural & Biological Engineering*, Vol. 2, N°3, pp. 51 – 68, 2009.