

## Predspracovanie biomasy kryolýzou

\*Štefan Boháček, Jozef Balberčák, Juraj Schwartz, Andrej Pažitný, Katarína Bombilajová,  
Vladimír Kuňa  
Výskumný ústav papiera a celulózy, a.s., Bratislava  
[bohacek@vupc.sk](mailto:bohacek@vupc.sk)

### Abstrakt

Kvapalné palivá druhej generácie, ako napr. bioetanol vyrobený z biomasy, sú kľúčovou témou pre energiu budúcnosti hlavne v oblasti dopravy. Bioetanol druhej generácie je produktom alcoholickej fermentácie jednoduchých sacharidov, ktoré sú získané z biomasy hydrolýzou celulózy a hemicelulóz. Ciele súčasného výskumu sú zamerané na vývoj nových druhov predspracovania biomasy pred enzymatickou hydrolýzou, medzi ktoré patrí aj kryolýza. Poznanie kinetiky procesu zmrazovania dokonale impregnovanej pórovitej biomasy na nano a mikro úrovniach je dôležité z hľadiska vyhodnotenia jej vplyvu na efektívnosť následných procesov.

**Kľúčové slová:** Kryolýza, zmrazovanie - rozmrazovanie, biomasa, celulóza, fermentácia, bioetanol, predspracovanie, biopalivá druhej generácie.

### Úvod

Drevo ako najrozšírenejšia lignocelulózová surovina s vysokým obsahom celulózy pozostáva z komplexných heterogénnych makromolekulových látok s bunkovou štruktúrou a základnými stavebnými jednotkami akými sú celulóza, hemicelulózy, lignín a sprievodné extraktívne látky (sacharidy, glykozidy, tuky, vosky, živice, pigmenty a anorganické látky). Počas výroby bioetanolu je dôležité konvertovať biomasu do zmesi hexóz a pentóz za účelom ich fermentácie na etanol. Konverziu na monomerické sacharidy je možné dosiahnuť pomocou kyslej alebo enzymatickej hydrolýzy. Enzymatická hydrolýza je vhodnejšia predovšetkým z pohľadu environmentálneho, ale aj z hľadiska selektivity procesu, a celkového výťažku, pretože počas kyslej hydrolýzy sa časť monosacharidov degraduje. Pred enzymatickou hydrolýzou je dôležité predspracovať biomasu a sprístupniť kryštalickú štruktúru celulózy enzýmom. Cieľom predspracovania je čiastočná delignifikácia, oddelenie hemicelulóz a dekrystalizácia celulózových zložiek. Predúprava kryolýzou (zmrazovaním) môže byť vysoko efektívna s nízkymi environmentálnymi dopadmi.

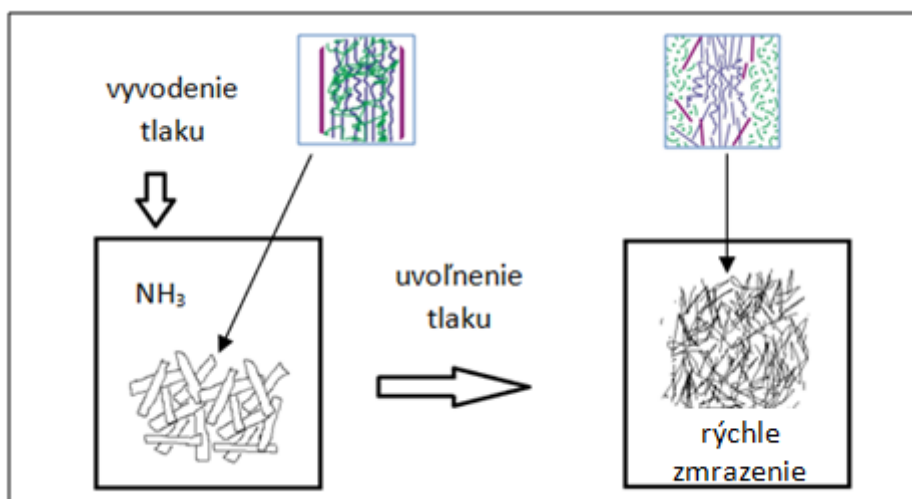
**Metóda predspracovania zmrazovaním** je jedna z viacerých metód predspracovania. Metóda má potenciál na to, aby bola energeticky efektívnou lacnejšou metódou predspracovania. Malé kryštály ľadu na mikro a nano úrovni sa tvoria v lúmenoch vodou dokonale naimpregnovanej biomasy a zväčšovaním objemu pri zmene skupenstva a ostrými hranami rastúcich kryštálikov zároveň spôsobujú deštrukciu v substráte. Pomalé zmrazovanie má aj tú výhodu, že zmena skupenstva nastáva postupne z vonkajšej strany,

pričom zamrznutý povrch sa stane tvrdým, krehkým a uzavretým, a ďalšia zmena skupenstva vody na ľad vo vnútri lignocelulózových častíc spôsobuje želanú deštrukciu kryštalickej štruktúry celulózy, a tak sa sprístupní enzýmom. Pri pomalom zmrazovaní sú kryštáliky ľadu väčšie ako pri rýchlom zmrazení. Metóda nazvaná "rýchle zmrazovanie" bola vytvorená pre zmrazovanie potravín. Keď zamrzne voda v potravinách, kryštály ľadu sa vytvoria v rozmedzí teplôt  $-1^{\circ}\text{C}$  a  $-5^{\circ}\text{C}$ . Ak sa rýchlo tento teplotný rozsah prekoná (ideálne do 30 minút), väčšina kryštálov nenarastie do príliš veľkých rozmerov a bunky sa neporušia.

### Výskum v oblasti predspracovania drevnej hmoty kryolýzou

Ciele výskumu sú zamerané na vplyv kinetiky procesu zmrazovania dokonale impregnovanej pórovitej biomasy na nano a mikro úrovniach, ako novej progresívnej metódy pre predspracovanie lignocelulózových surovín na efektívnosť následných procesov hydrolýzy celulózy a hemicelulózy a fermentácie vzniknutých monosacharidov, teda na celkovú efektívnosť výroby bioetanolu druhej generácie. Hlavným cieľom je nájdenie optimálnych podmienok zmrazovania biomasy za účelom dosiahnutia maximálnej efektívnosti výroby bioetanolu druhej generácie.

Niektorí výskumníci už skúmali vplyv predspracovania biomasy zmrazovaním, ale ucelená teória stále chýba. **Dale a Moreira (1982)** vyvinuli novú metódu, ktorú nazvali „freeze-explosion“ na zvýšenie reaktivity celulózy. Celulóзовý materiál je impregnovaný kvapalinou, ktorá sa pri uvoľnení tlaku odparuje, čím sa zníži teplota okolia (obr.1). Enzymatickou hydrolýzou slamy sa dosiahla viac ako 90%-ná konverzia celulózy na glukózu, pričom sa použila táto technika s využitím tekutého amoniaku.



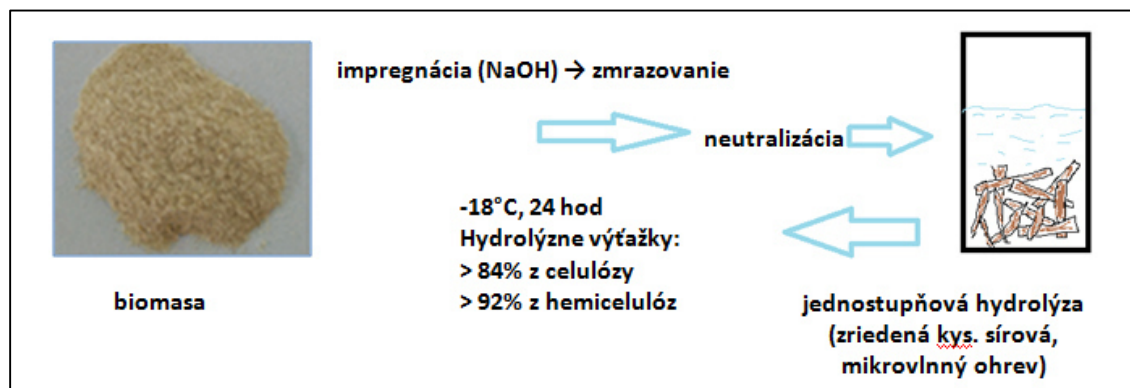
Obr. 1: Predúprava biomasy tekutým amoniakom v reaktore pod tlakom. V súčasnosti je známa pod názvom AFEX<sup>TM</sup> (ammonia fiber expansion pretreatment) a uplatňuje sa teplota  $60-100^{\circ}\text{C}$  pod tlakom 17-20 ATM.

**Chang a kol. (2001)** využil zmrazovanie ryžovej slamy na preukázanie zvýšenia jej prístupnosti- stráviteľnosti enzýmami zo 48% na 84%. Podľa výsledkov enzymatickej hydrolýzy nespracovanej ryžovej slamy s 150 U celulózou a 100 U xylanázou počas 48 hodín poskytla  $226,77 \text{ g.kg}^{-1}$  a  $93,84 \text{ g.kg}^{-1}$ . Výťažky cukrov z predúpravy zmrazovaním za rovnakých podmienok však boli  $417,27 \text{ g.kg}^{-1}$  a  $138,77 \text{ g.kg}^{-1}$ . V tomto výskume bol najvyšší

výtťažok glukózy získaný v množstve 371,91 g.kg<sup>-1</sup>. **Yang a kol. (2009)** skúmal potenciál sušenia switchgrass (*Panicum virgatum*) pomocou zmrazovania. Switchgrass obsahuje 24.34–30.95% glukanu, 14.68–18.58% xylanu a 17.39–19.46% lignínu. Vzorky potom upravoval zriedenou kyselinou sírovou s koncentráciou 0.5, 1.0 alebo 1.5% počas 30, 45 alebo 60 min pri 121 °C a tlaku 15 psi. Fermentáciu uskutočnil pomocou kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* a dosiahol výtťažok 0.083 g etanolu/g pre odrodu St6-3F, čo predstavuje cca 60% teoretickej hodnoty.

**Wang a kol. (2013)** skúmali pozitívny účinok zmrazovania a následného rozmrazovania pšeničnej slamy impregnovanej zriedenou kyselinou sírovou. Podmienky optimalizovali na 12 hodín pri -20°C a 1 hodinu pri teplote miestnosti (25°C). Po dvojnásobnom opakovaní a úprave s 2% hmotn. kyseliny sírovej počas 16 hodín pri 80°C, s 20 U/g celulázy, nastala konverzia 67% celulózy a hemicelulózy na glukózu a xylózu. Výtťažok furfuralu klesol o 65% a čas kyslej hydrolýzy sa skrátil o 20%. **Boháček a kol. (2014)** opísal novú metódu predspracovania opakovaným kontrolovaným zmrazovaním a rozmrazovaním za účelom otvorenia kryštalickej štruktúry celulózy a zväčšenia mernej povrchovej plochy vybraných druhov lignocelulóзовých materiálov pre sprístupnenie hydrolytickými enzýmami. Metóda využíva cyklické zmrazovanie a rozmrazovanie - ľadové kryštáliky, ktoré sa vytvoria počas zmrazovania rozrušia lignocelulóзовý komplex a vodíkové väzby a enzýmy budú mať lepší prístup k celulóze počas procesu enzymatickej hydrolýzy. **Boháček a kol. (2016)** opísal metódu predspracovania kontrolovaným zmrazovaním kombinovaným s mechanickým predspracovaním za účelom zvýšiť mernú povrchovú plochu vybraných druhov lignocelulóзовých materiálov. Táto metóda využíva kombináciu účinku zmrazovania a mechanického predspracovania – kryštály ľadu, ktoré sa vytvoria počas zmrazovania narušia komplex lignínu a celulózy a taktiež už vytvorené vodíkové väzby. Následné drvenie/mletie zmrznutej biomasy znásobuje efekt narušených väzieb. Enzýmy majú potom lepší prístup k celulóze počas kontrolovanej enzymatickej hydrolýzy. **Rooni et al. (2016)** uskutočnil poľné testy na jačmennej slame v Estónsku. Porovnanie uskutočnil na pomletej biomase, ktorá bola napustená vodou a zmrazovaná pri -18°C a potom sa nechala roztopiť pri teplote okolo 22°C. Zmrazovacie cykly sa opakovali niekoľkokrát. Najvyššia účinnosť hydrolýzy (19,42%) sa dosiahla v laboratórnych testoch, pri ktorých bola biomasa zmrazená a rozmrazená celkom štyrikrát. Najlepší výsledok z poľného testu bol 10,28%. Výtťažky fermentácie sa pohybovali až do 88,80 g na kilogram biomasy. **Smichi a kol. (2016)** vykonali testy na *Juncus maritimus*, ktorý obsahoval 41.5% celulózy a 31.3% hemicelulóz. Uskutočnil porovnanie predúpravy so zriedenou kyselinou a zmrazovaním-rozmrazovaním. Maximálnu koncentráciu glukózy (53.78 ± 3.24) g L<sup>-1</sup> za pomoci zmrazovania a rozmrazovania a enzymatickej sacharifikácie (55 °C, pH 5.0 a 48 h) sa dosiahli použitím CellicCTec2 Novozymes. Koncentráciu (49.14 ± 5.24) g L<sup>-1</sup> dosiahol kyslou hydrolýzou. Maximálny výtťažok etanolu dosiahol fermentáciou pomocou *Saccharomyces cerevisiae* po kyslej hydrolýze (84.28 ± 5.11)% a (1.04 ± 0.10) g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> po zmrazovaní a rozmrazovaní. **Jeong a kol. (2016)** študoval efekt zmrazovania na mongolský dub (*Quercus mongolica*), ktorý bol upravený 1%-nou kyselinou sírovou. Študoval degradáciu hemicelulóz aj následnú enzymatickú hydrolýzu. Výsledky ukázali, že obsah redukujúcich cukrov sa mierne zvyšoval až do 120 minútového zmrazenia. Obsah xylózy bol najvyšší (18,22 g/ 100 g) pri špecifickom pomere tuhej látky k mraziacemu roztoku 5 : 3 (hmotn. / obj.). Keď sa ako mraziaci roztok použila destilovaná

voda, výtťažok glukózy sa maximalizoval na 36,2% s mierou konverzie 87,92%. **Su a Fang (2017)** sa sústredili na dosiahnutie hydrolýzy odpadov z tropickej biomasy v jednom stupni (obr. 2), pričom uskutočnili zmrazovanie biomasy s 3% hmot. NaOH a následnú kyslú hydrolýzu pomocou zriedenej kyseliny sírovej v mikrovlnnej rúre. Výťažky cukrov z celulózy (glukózy) a hemicelulózy (xylózy, manózy a arabinózy) v predspracovanej bagase boli 84,0% a 92,7%, zvýšené o 273,4% a 59,3% v porovnaní s neošetrenými vzorkami. Najlepšie podmienky (140°C, 30 s, substrát/rozpúšťadlo = 1/60 a 0.4 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) aplikovali aj na šupky *Jatropha* a *Plukenetia*. Dosiahli výtťažky glukózy a hemicelulóзовých cukrov 85,7%, 93,3%, 85,0% a 92,9%.



Obr. 2: Jednostupňová kyslá hydrolýza za pomoci mikrovlnného ohrevu impregnovanej bagasy (3% hm. NaOH) predúpravenej zmrazovaním.

**Deng a kol. (2018)** študovali účinok zmrazovania a rozmrazovania na anaeróbnú digestciu pri výrobe metánu z ryžovej slamy. Účinok (zvýšenie 88% - 117%) bol sledovaný pri teplotách (-4°C) a (-20°C) počas 24-48 hod. Technický čas sa skrátil o 8 dní a maximálna produkcia metánu bola získaná za podmienok -20°C a 48 hodín. **Echeverria a kol. (2018)** porovnával účinok acidifikácie a zmrazovania a ich kombinácie na zložky kukurice a na ich enzymatickú hydrolýzu. Kukurica, ktorá obsahovala celulózu (40.95%), hemicelulózy (38.94%) a nízky obsah lignínu (16.54%), bola mrazená pri -20°C počas 12 h s 0.25 M kyselinou sírovou, pH 2.0, a rozmrazovaná pri 121°C počas 20 min. Enzymatická hydrolýza 150 U<sub>celulóza</sub>/g<sub>substrát</sub> v 10 mL acetát pri 100 otáčky/min, 37°C a pH 5.48 počas 72 h. Najvyššie výtťažky celulózy (64.12%), lignínu (19.76%) a malé množstvo hemicelulózy (10.16%) bolo namerané pri kombinácii metód. Mikroskopické sledovanie pri vzorkách s kombinovaným predspracovaním, vykazuje rozdelenú a menej aglomerovanú štruktúru. **Yuan a kol. (2019)** skúmal zvýšenie produkcie biometánu z kukuričných stoniek pomocou ich zmrazovania a rozmrazovania s predchádzajúcou úpravou amoniakom s koncentráciou (2%, 4% a 6%) pri obsahu vlhkosti (50% a 60%) a teplotách (-20°C a 20°C). Optimálne podmienky boli stanovené na -20°C, obsah vlhkosti 70% a koncentrácia amoniaku 2%. Výtťažok biometánu sa zvýšil o 41.08% oproti neupraveným vzorkám. Najvyšší úbytok lignínu sa prejavil pri -20°C s 2%-nou koncentráciou amoniaku, čo predstavuje 63.36% z neupravenej vzorky. **Li a kol. (2019a)** skúmali, prirodzené zmrazovanie-rozmrazovanie kukuričných stoniek pre výrobu biometánu v anaeróbných podmienkach. Predúpravu zmrazovaním-rozmrazovaním uskutočnil

pre obdobie (7, 14, 21 a 28 dni) a pomer sušina/voda (1:2, 1:4, 1:6, 1:8 a 1:10). Najlepšie výsledky dosiahol pri 21 dňoch a pomere 1: 6. Ten istý autor vo svojej ďalšej práci (Li a kol. 2019b) skúmal predúpravu kombinovaného zmrazovania a rozmrazovania (-20°C and 20°C) s prídavkom amoniaku (NH<sub>3</sub>). Zaujímal sa o mechanizmy štruktúrnej deštrukcii kukuričných stoniek. Teoretický výpočet ukázal, že poškodenie kryštalickej celulózy sa pripisuje vonkajším vodíkovým väzbám vytvoreným medzi vodou a celulórou alebo NH<sub>3</sub> a celulórou, čo viedlo k deštrukcii sietí vodíkových väzieb vo vnútri celulózy.

### **Vedecká úroveň výskumu a výskumných metód**

Podľa terajších poznatkov je predspracovanie nevyhnutné pre konverziu biomasy na vhodné produkty biopalív druhej generácie. Progresívne metódy, ktoré dosahujú priaznivé výsledky bez chemického spracovania zahŕňa energeticky náročnú parnú explóziu, ktorá vyžaduje pracovať s teplotou nad 180°C a tomu zodpovedajúcim vysokým tlakom. Výskum v oblasti iónových kvapalín, ktorý by mohol umožniť pracovné teploty pod 100°C je momentálne iba v počiatočnom vývoji. Preto metódy zmrazovania až do -20°C sa zdajú byť výhodné z energetického a environmentálneho aspektu, nakoľko sa v niektorých častiach sveta dajú realizovať aj v prírodných podmienkach v zimnom období.

Výskum v oblasti zmrazovania sa uskutočňuje v rôznych priemyselných odvetviach, obzvlášť za účelom konzervovania (hlboké mrazenie a rýchle zmrazovanie). Na rozdiel od snahy poškodiť bunecné steny, ako je to v prípade predspracovania biomasy pre následnú hydrolýzu polysacharidov, vedci z iných oblastí sa snažia tento problém eliminovať. Napr. sa rieši eliminácia poškodenia živých ľudských buniek zmrazovaním použitím vhodných roztokov (dimetyl sufoxid), alebo pri zmrazovaní krvných buniek (vysoká koncentrácia glycerolu), resp. ochrana rastlín pred poškodením mrazom. Tak isto sú zaujímavé počítačové simulácie vzniku ľadových zárodokov.

Momentálne neexistuje žiadna signifikantná teória, ktorá by podrobne popísala detailný proces kryolýzy v rámci predspracovania biomasy. Mechanizmy tvorby ľadových kryštálov a ich vplyv na poškodenie morfológického zloženia substrátu biomasy bude potrebné popísať na mikroskopickú a nano úrovni použitím Kryo-elektrónovej mikroskopie. Teóriu sorpcie vody v bunkových stenách bude potrebné opísať na základe mikroskopických záberov substrátov po zmrazovaní.

### **Ciele, na ktoré sa súčasný výskum zameriava**

V rámci kryolitického predspracovania biomasy medzi hlavné úlohy výskumu patrí poznať a opísať mechanizmus deštrukcie vodou impregnovaného pórovitého substrátu biomasy pomocou kryolýzy a následne určiť optimálne podmienky deštrukcie kryštalickej štruktúry celulózy a jej sprístupnenia hydrolytickým enzýmom. Kinetika zmrazovania a rozmrazovania v súlade s poškodením pôvodného substrátu musí byť opísaná na základe získaných výsledkov.

Základným problémom pri výrobe bioetanolu druhej generácie na báze celulózy je kryštalická a pre enzýmy neprístupná štruktúra celulózy v porovnaní so štruktúrou škrobu, ktorá je surovinou pre výrobu bioetanolu prvej generácie, ale aj súčasťou základných potravín a preto v súčasnosti už nie je preferovanou surovinou na výrobu biopalív. Chýba efektívny a lacný spôsob deštrukcie kryštalickej štruktúry a sprístupnenia celulózy hydrolytickým enzýmom.



Kryolýza sa ukazuje ako koncepčné riešenie tohto problému s najvyšším potenciálom implementovateľnosti.

Základom riešenia je sledovanie a charakteristika vplyvu kinetiky zmrazovania na účinnosť deštrukcie kryštalickej štruktúry celulózy. Sledovať by sa mal vplyv intenzity zmrazovania pri rôznych výkonoch chladenia/mrazenia na prístupnosť štruktúry celulózy.

### **Vedecká hypotéza**

Je potrebné potvrdiť alebo vyvrátiť sformulovanú predbežnú vedeckú hypotézu, že pri rýchlom a intenzívnom zmrazení biomasy dokonale impregnovanej vodou, najprv prebehne zmena stavu kvapalnej vody na ľad na povrchu častíc lignocelulóзовého materiálu, a tá má za následok utesnenie jednotlivých častíc a zvýšenie ich krehkosti. Po následnom postupnom znížení teploty by sa mali vytvárať ostré nano- a mikrokryštáliky ľadu v lúmenoch buniek biomasy smerom dovnútra častíc, pričom súčasne dochádza ku zväčšeniu objemu pri fázovej premene vody na ľad v lúmenoch buniek, čo spôsobuje narušenie kryštalickej štruktúry celulózy a zvyšuje jej prístupnosť v následných procesoch hydrolyzy.

Štruktúra lignocelulózy je hustá a obsahuje kryštalickú oblasť, čo sťažuje, aby molekuly vody do nej prenikli. Objem vody v lignocelulózovej štruktúre sa však po vytvorení ľadu zväčšuje a kapacita zadržiavania vody sa zvyšuje s predlžovaním doby tuhnutia v určitom rozsahu, čo priaznivejšie vedie k zväčšeniu veľkosti medzier vo vzorkách a zväčšeniu plochy pre atak mikroorganizmov (**Chang a kol. 2011**). Počas procesu mrazenia je nižšia povrchová teplota v porovnaní s vnútornou časťou lignocelulózy (**Chang a kol. 2011**). Keď teplota mrazu klesá, objem voľnej vody v povrchových póroch sa najskôr rozširuje a molekula vody v póroch musí prekonať pri pohybe viskóznú odolnosť, výsledné tlakové gradienty vody majú výrazné poškodiť lignocelulóзовú štruktúru (**Chang a kol. 2011**). K adsorpcii molekuly vody dochádza iba v amorfnej oblasti celulózy. Viazaná voda vytvára vodíkové väzby s hydroxylovými skupinami v amorfnej oblasti celulózy. Vnútorný objem lignocelulózovej štruktúry sa zvýši v dôsledku zníženia súdržnosti, tuhé látky zmäknú a dôjde k napučaniu. Deštrukcia lignocelulózovej štruktúry nastáva v dôsledku expanzie objemu vody počas zmrazovania.

**Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV–18–0533.**

### **Použitá literatúra**

1. Boháček, S., Fišerová, M., Gigac, J., Pažitný, A., Russ, A., Letko, M., Mikulášik, R., Ihnát, V., 2014: "Metóda zvýšenia prístupnosti lignocelulóзовých materiálov voči hydrolytickým enzýmom počas výroby biopalív ", Výskumný ústav papiera a celulózy a.s., Bratislava. PA 50076-2014 (IPO SR, 12.12.2014).
2. Pažitný, A., Russ, A., Kuňa, V., Balberčák, J., Ihnát, V., Stankovská, M., Boháček, S., Gigac, J., Medo, P., Schwartz, J., 2016: "Metóda zvýšenia výťažku monosacharidov

počas výroby biopalív z lignocelulóзовých materiálov ", Výskumný ústav papiera a celulózy, a.s., Bratislava. PA 50083 – 2016 (IPO SR, 06.12.2016).

3. Dale, B.E.; Moreira, M.J., 1982: Freeze-explosion technique for increasing cellulose hydrolysis. In: Journal Volume: 12; Conference: 4. symposium on biotechnology in energy production and conservation, Gatlinburg, TN, USA.
4. Deng, Y., Qiu, L., Yao, Y., Qin, M., 2018: A technology for strongly improving methane production from rice straw: freeze–thaw pretreatment. RSC Adv. (8): 22643-22651.
5. Echeverria, C., Bazan, G., Gonzalez, J.S., Lescano, L., Pagador, S., Linares, G., 2018: Pre-treatment by Acidification and Freezing on Corn cob Polymers and its Enzymatic Hydrolysis. Asian Journal of Scientific 11 (2): 222-231.
6. Chang, K.L., Thitikorn-amorn, J., Hsieh, J.F., Ou, B.M., Chen, S.H., Ratanakhanokchai, K., Huang, P.J., Chen, S.T., 2011: Enhanced enzymatic conversion with freeze pretreatment of rice straw. Biomass and Bioenergy 35(1): 90-95.
7. Jeong, H.S., Jang, S.K., Kim, H.Y., Yeo, H., Choi, J.W, Choiac, I.G., 2016: Effect of freeze storage on hemicellulose degradation and enzymatic hydrolysis by dilute-acid pretreatment of Mongolian oak. Fuel Volume 165: 145-151.
8. Li, J., Wachemo, A.Ch., Yuan, H., Zuo, X., Li, X., 2019a: Natural freezing-thawing pretreatment of corn stalk for enhancing anaerobic digestion performance. Bioresource Technology 288: 121518.
9. Li, J., Wachemo, A.Ch. Yu, G., Li, X., 2019b: Enhanced anaerobic digestion performance of corn stalk pretreated with freezing-thawing and ammonia: An experimental and theoretical study. Journal of Cleaner Production, Available online 2 November 2019, 119112.
10. Rooni, V., Raud, M., Kikas, T., 2017: The freezing pre-treatment of lignocellulosic material: A cheap alternative for Nordic countries. Energy 139: 1-7.
11. Smichi, N., Messaoudi, Y., Moujahed, N., Gargouri, M., 2016: Ethanol production from halophyte *Juncus maritimus* using freezing and thawing biomass pretreatment. Renewable Energy 85: 1357-1361.
12. Su, T.CH., Fang, Z., 2017: One-pot microwave-assisted hydrolysis of cellulose and hemicellulose in selected tropical plant wastes by NaOH-freeze pretreatment. ACS Sustainable Chem. Eng. 2017, 5, 6: 5166-5174.
13. Wang, X.M., Wang, L.J., Yu, M., Chen, H., 2013: Freeze-thaw and sulfuric acid pretreatment of wheat straw for fermentable sugar release. Advanced Materials Research (724-725) : 257-260.
14. Yang, Y., Sharma-Shivappa, R.R., Burns, J.C., Cheng, J., 2009: Saccharification and fermentation of dilute-acid-pretreated freeze-dried switchgrass. Energy Fuels 23, 11: 5626-5635.
15. Yuan, H., Lan, Y., Zhu, J., Wachemo, A.Ch., Li, X., Yu, L., 2019: Effect on anaerobic digestion performance of corn stover by freezing–thawing with ammonia pretreatment. Chinese Journal of Chemical Engineering 27(1): 200-207.