

EFECTOS EN LA CRISTALINIDAD DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum* spp.) POR PRETRATAMIENTOS QUÍMICOS USANDO DISPERSIÓN DE RAYOS X EN ÁNGULO AMPLIO (WAXS)

EFFECTS ON THE CRYSTALLINATION OF SUGAR CANE BAGAZO (*Saccharum* spp.) BY CHEMICAL PRETREATMENT USING X-RAY DISPERSION IN WIDE ANGLE (WAXS)

Santana-Hernández, U.¹; Quiroz-Cardoso, O.¹; Rodríguez-Hernández, A.²; Granados-Baeza, M.J.¹; Quinto-Hernández, A.^{1*}

¹Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Zacatepec, Calzada Tecnológico 27, Zacatepec, Morelos, México, 62780. ²Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, 04510.

*Autor de Correspondencia: alfredo.qh@itzzacatepec.edu.mx

RESUMEN

Mediante la técnica de dispersión de rayos X en ángulo amplio (WAXS) usando radiación sincrotrón, se estudiaron los cambios morfológicos en la biomasa lignocelulósica producida de bagazo de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) después de ser sometida a pretratamientos químicos basados en H₂SO₄ o NaOH. Perfiles unidimensionales 1D WAXS fueron obtenidos, con los cuales se determinó el porcentaje de cristalinidad en las fibras y el tamaño de cristal de la celulosa embebida en la matriz lignocelulósica. Estos parámetros proporcionan información directa sobre las modificaciones cristalinas de las muestras de bagazo estudiadas, observando que el pretratamiento con NaOH promovió una transformación de celulosa cristalina a amorfa. Los resultados son relevantes en el tema de la producción de bioetanol a partir de desechos agroindustriales.

Palabras clave: cristalinidad, WAXS, Celulosa, Deshecho agroindustrial.

RESUMEN

Using the technique of wide-angle X-ray scattering (WAXS) using synchrotron radiation, it is studied in the morphological changes in the lignocellulosic biomass produced by the sugar bagasse of *Saccharum* spp., after being a chemical pre-treatments in H₂SO₄ or NaOH. 1D WAXS one-dimensional profiles were obtained, with which the percentage of crystallinity in the fibers and the crystal size of the cellulose embedded in the lignocellulose matrix was determined. These parameters seek information on the crystalline modifications of the bagasse samples studied, observing that pretreatment with NaOH promotes a transformation of crystalline to amorphous cellulose. The results are relevant in the issue of bioethanol production from agroindustrial waste.

Keywords: crystallinity, WAXS, Agroindustrial waste.

Agroproductividad: Vol. 10, Núm. 10, octubre. 2017, pp: 67-72.

Recibido: agosto, 2017. **Aceptado:** octubre, 2017.

INTRODUCCIÓN

El incremento en la demanda de energía ha inducido la búsqueda de nuevas y eficientes fuentes de energía renovables. En este aspecto, una de las alternativas emergentes es el uso de biocombustibles, de los cuales el biodiesel, biogás, y bioetanol han recibido la mayor atención. La clave para una producción efectiva de los biocombustibles es la biomasa (Mussatto *et al.*, 2010). Para el caso específico del bioetanol, las biomásas provenientes del maíz (*Zea mays* L.) y del jugo de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) son los de mayor uso a nivel mundial, siendo respectivamente Estados Unidos y Brasil sus mayores productores (Claassen *et al.*, 1999; Shai-bani, Ghazvini, Andalibi y Yaghmaei, 2011). En México, el empleo de cualquiera de estas biomásas para la producción de biocombustibles es inviable pues comprometería su consumo alimenticio. Una posibilidad atractiva a explorar para producir bioetanol es el uso de desechos agroindustriales, tal como lo es el bagazo de caña de azúcar (Pandey *et al.*, 2000), debido a su alto contenido celulósico. Es claro que, teniendo una red de más de 57 ingenios azucareros en el país (<http://www.sagarpa.gob.mx>) generando este desecho al cual comúnmente no se le da uso, permitiría el desarrollo de una agroindustria con materia prima cuyo valor comercial es básicamente nulo. El desarrollo de este tipo debe ser considerada de interés público, pues puede llegar a ser un importante detonador en la economía de la nación. Los componentes principales del bagazo de caña de azúcar son hemicelulosa (25%), lignina (25%) y celulosa (Mosier *et al.*, 2005). Este último polisacárido es rodeado de un entramado jerárquico formado de lignina y hemicelulosa, que lo aísla de cualquier agente externo que induzca su degradación (Figura 1), el cual frecuentemente es llamado microfibrilla.

La problemática de producir bioetanol de residuos agrícolas se origina a partir de esta estructura, pues es indispensable usar pretratamientos para separar a la celulosa del resto de los componentes lignocelulosicos, para posteriormente ser empleada con una baja cristalinidad. Esta morfología final en la celulosa permite obtener mayores rendimientos de glucosa, pues fácilmente puede ser transformada a bioetanol a través de procesos posteriores de sacarificación y fermentación. Tradicionalmente los pretra-

tamientos empleados en el material lignocelulosico son de naturaleza física (hidrotermólisis, descarga de vapor o pulverización), química (uso de soluciones ácidas/básicas) o biológica (empleo de microorganismos), los cuales tienen un propósito específico de uso. Un pretratamiento físico involucra la reducción del tamaño y ruptura de la fibra, mientras que los pretratamientos químicos y biológicos se utilizan para degradar lignina y hemicelulosa. A la fecha, se ha determinado comúnmente la efectividad de los tratamientos en materiales lignocelulosicos al cuantificar la lignina y hemicelulosa removidas de los azúcares producidos después del pretratamiento, o del subsecuente rendimiento de etanol. Sin embargo, otra aproximación se puede establecer al identificar cambios estructurales y cristalinos en las fibras pretratadas. Con el advenimiento de nuevas técnicas basadas en radiación sincrotrón para caracterizar la cristalinidad de materiales, se hace posible estudiar los efectos de los pretratamientos directamente a nivel molecular de la celulosa, para posteriormente relacionarlos con el rendimiento de glucosa y etanol que produzca el residuo agrícola. Una de estas técnicas es la dispersión de rayos-X en ángulo amplio (*Wide Angle X-rays Scattering*, o WAXS), la cual ha sido usada previamente para estudiar la estructura cristalina de celulosa aislada (Burger *et al.*, 2010), o en tratamientos químicos (Oh *et al.*, 2005). En este contexto, el objetivo de este trabajo fue determinar los efectos en la cristalinidad de la celulosa en el bagazo de caña de azúcar por WAXS basado en radiación sincrotrón, después de aplicar soluciones de H₂SO₄ y NaOH con descarga de vapor, con el fin de contribuir a entender la correlación entre la efectividad de los pretratamientos químicos

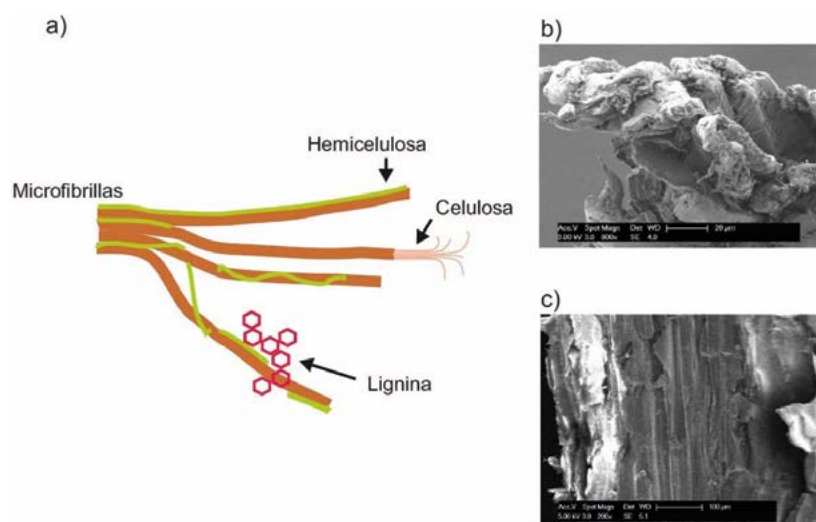


Figura 1. Aspectos morfológicos del bagazo de caña de azúcar: a) esquema de las microfibrillas, y microfotografías de la misma fibra en b) sección transversal, y c) a lo largo de la fibra.

con los cambios estructurales en las fibras y su capacidad para generar celulosa amorfa.

MATERIALES Y MÉTODOS

El bagazo de caña de azúcar se recolectó del Ingenio Azucarero "Emiliano Zapata", de Zacatepec, Morelos, México. Este se pretrató en dos etapas después de secarse por 24 h con radiación solar y reducir su tamaño a fibras con diámetro de 1 mm. La primera etapa se desarrolló en condiciones ácidas con la finalidad

de remover lignina y hemicelulosa, por lo que el bagazo se colocó durante 30 minutos en recipientes de vidrio conteniendo una solución 2% V/V H₂SO₄, a una relación de 5% P/V (masa de bagazo sin tratar/volumen de solución de H₂SO₄), seguido de una explosión de vapor a 121 °C por 30 minutos en autoclave. Se separó la fracción sólida de la líquida y se neutralizó con agua desionizada. La primera fracción se secó en estufa a 50 °C por 24 h, y la segunda se reservó para estudios posteriores. Para potencialmente generar celulosa amorfa, en la segunda etapa el procedimiento se repitió para la fracción ácida resultante, pero utilizando una solución 20% P/V NaOH a una relación 10% P/V (masa de bagazo ácido/volumen de solución básica). Todos los procedimientos se realizaron por duplicado. Los experimentos WAXS se realizaron en la estación BL23A1 SWAXS del National Synchrotron Radiation Research Center (NSRRC); en Hsinchu, Taiwán. Las características del equipo utilizado (Jeng *et al.*, 2010) y de la línea de luz BL23 SWAXS (<http://www.nsrrc.org.tw/>) se encuentran

disponibles. La longitud de onda de los rayos X usada fue de 0.1239851 nm y la distancia muestr/detector fue de 3774.639 mm. El haz de rayos X se fijó perpendicularmente a la dirección de la fibra (Figura 2), de forma tal que los ejes X y Z en los resultantes patrones bidimensionales 2D WAXS (no mostradas en este trabajo) representaron las direcciones axial y radial de la fibra, respectivamente.

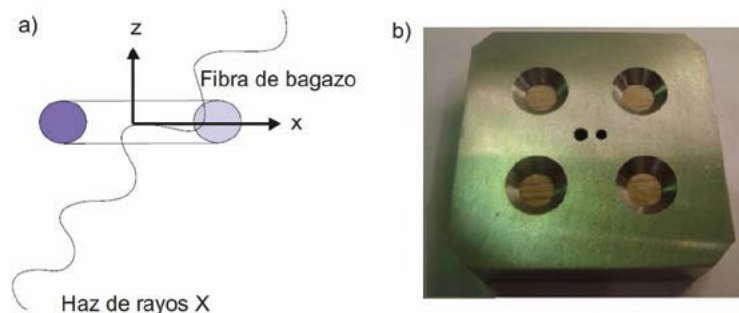


Figura 2. Mediciones WAXS: a) esquema de la posición del haz de rayos X con referencia a la dirección de la fibra y, b) bagazo insertado horizontalmente en una montura durante las mediciones.

Un detector de píxeles tipo PILATUS 1M-F fue utilizado para las mediciones 2D WAXS a través de un protocolo de adquisición de datos establecido. Así, las dispersiones detectadas del haz de rayos X fueron procesadas, manipuladas

y visualizadas usando Albula (Dectris Ltd, Baden, Suiza), para posteriormente someterse a un algoritmo de reducción de datos ad hoc (Lai *et al.*, 2005). Finalmente, las dispersiones se integran en las direcciones radial y axial para obtener perfiles unidimensionales de intensidad 1D WAXS. Las mediciones WAXS se interpretan a través del vector de dispersión de onda q ,

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\theta \quad (\text{en nm}^{-1}) \quad (1)$$

donde θ es el ángulo de dispersión, y λ es la longitud de los rayos X (Guinier y Fournet, 1955). Obtenidos los perfiles 1D WAXS, se explora el significado físico de la información a partir de estimar la intensidad de dispersión de la muestra $I(q)$,

$$I(q) = KP(q)S(q) \quad (2)$$

donde K es una constante que engloba las propiedades del material, mientras que los otros dos términos están en función del ángulo de dispersión: $P(q)$ es un factor que describe la forma y distribución de densidad interna de los cristales bajo estudio, y $S(q)$ es un factor de estructura que indica las interacciones partícula-partícula (Glatter y Kratky, 1982). La significación de $I(q)$ reside en que permite estimar el tamaño de cristal y el porcentaje de cristalinidad del material.

Porcentaje de Cristalinidad. El porcentaje de cristalinidad nos revela el grado de cristalinidad del material (Schnablegger y Singh, 2011), pues indica la proporción del volumen de la muestra que la presenta. Suele calcularse como

$$\% \text{cristalinidad} = \frac{\int_{q_{\min}}^{q_{\max}} q^2 \Delta I_{\text{cristalina}} dq}{\int_{q_{\min}}^{q_{\max}} q^2 \Delta I_{\text{cristalina}} dq + \int_{q_{\min}}^{q_{\max}} q^2 \Delta I_{\text{amorfa}} dq} * 100 \quad (3)$$

En el que $\Delta I_{\text{cristalina}}$ y ΔI_{amorfa} corresponden a la dispersión proveniente de la porción cristalina y amorfa del material, respectivamente.

Tamaño de Cristal. El volumen de material en donde se aplica rigurosamente la operación de simetría de traslación es conocido como tamaño de cristal, por lo que es fácil asociarlo a los alcances del dominio donde se realiza coherentemente la dispersión de rayos X. En un predominio de cristales libres de deformación en la muestra, se estima el tamaño promedio de cristal β usando la fórmula de Scherrer,

$$\beta = \frac{K\lambda}{FWHM_{2\theta} \cos\theta} \quad (4)$$

donde K es el factor de forma del cristal (equivalente a 1, para el caso de la celulosa), λ es la longitud de onda de la radiación empleada, $FWHM_{2\theta}$ es el ancho a la altura media del pico de difracción de la muestra y θ es el ángulo de Bragg en la posición de la señal de difracción (Klug y Alexander, 1974).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 3 muestra los perfiles 1D WAXS generados para el bagazo a) sin tratar, y tratado con solución b) ácida, seguido de otra c) básica, en un rango $q \sim 0-24 \text{ nm}^{-1}$. Una comparación de los perfiles 1D WAXS de las fibras pretratadas con la no tratada reveló cambios notorios.

El perfil 1D WAXS_{radial} del bagazo sin tratar se caracterizó por una banda amplia en la región $q \sim 8-12 \text{ nm}^{-1}$, así como una señal intensa en $\sim 16 \text{ nm}^{-1}$, mientras que en el 1D WAXS_{axial} aparecieron dos remates pequeños en 12.5 y 14.5 nm^{-1} ; este último superpuesto con otro a $\sim 15.5 \text{ nm}^{-1}$. Las señales obtenidas de la muestra pretratada con H_2SO_4 disminuyen drásticamente en ambos patrones WAXS, en comparación con las pretratada con NaOH en que se observa una señal gemela a la de $\sim 16 \text{ nm}^{-1}$, centrada en 14.8 nm^{-1} (1D WAXS_{radial}).

Identificación de celulosa cristalina y amorfa

Para identificar celulosa cristalina en las fibras de bagazo de caña de azúcar, se compararon los patrones 1D WAXS (Figura 3) con la indexación monoclinica de celulosa I de Sugiyama, (Sugiyama *et al.*, 1991), la cual reporta un espaciamiento de 0.62, 0.53 y 0.39 nm para los planos $(1\bar{1}0)$, (010) y (200) , respectivamente. Estos planos cristalinos han sido identificados en términos de q previamente en patrones 1D WAXS en algodón puro (Elazzouzi-Hafraoui *et al.*, 2008), los cuales se muestran en el Cuadro 1. Similarmente, la celulosa amorfa se ha identificado en el rango $q=14.2-14.5 \text{ nm}^{-1}$ (o en ángulo de dispersión $2\theta=20^\circ-22^\circ$) (Park *et al.*, 2010) en muestras de celulosa comercial. Indicado lo anterior, la fibra no tratada (Figura 3a) reveló la presencia de estructura lamelar debido a una superposición de las bandas $(1\bar{1}0)$ y (110) , además del plano (200) de la celulosa

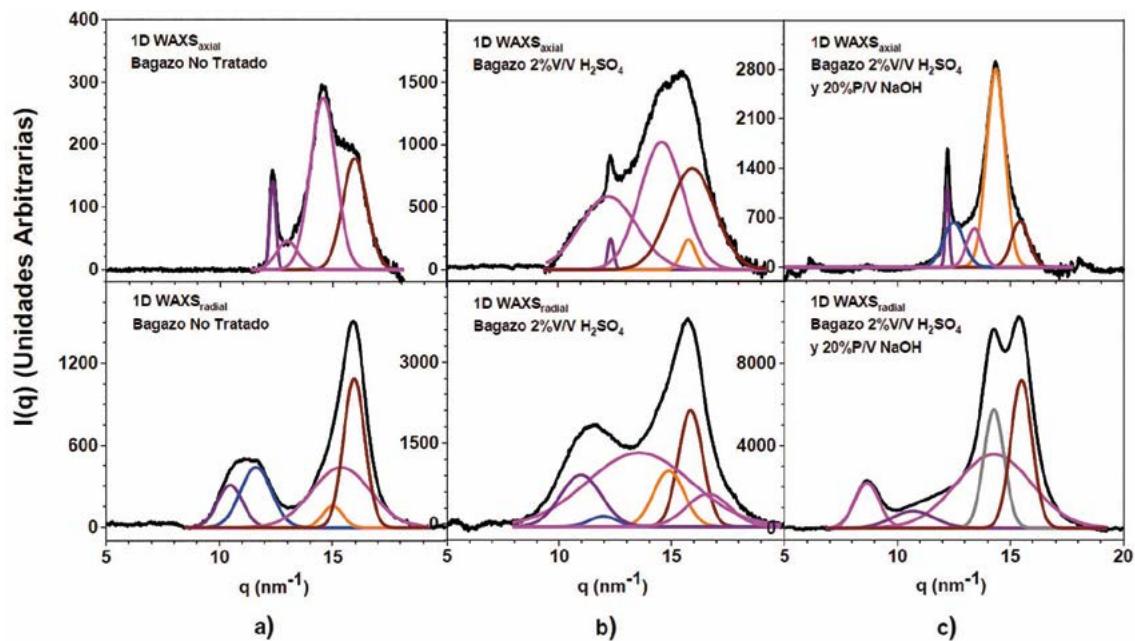


Figura 3. Perfiles 1D WAXS de las muestras tratadas químicamente: a) bagazo no tratado, b) bagazo tratado con H_2SO_4 , y c) tratado con $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{NaOH}$. Las líneas continuas en negro, púrpura, azul, naranja y café corresponden a los datos experimentales WAXS, y a los planos $(1\bar{1}0)$, (110) , (102) y (200) de la celulosa I, respectivamente. La identificación de celulosa amorfa es indicada en la línea en color gris. Aquellas en magenta se refieren a material mesomórfico.

Cuadro 1. Identificación de señales del vector q de muestras de bagazo de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) observadas a través de los diagramas 1D WAXS en las direcciones axial y radial de la Figura 3.

Señales a identificar	q (nm ⁻¹)							
	(1 $\bar{1}$ 0)		(110)		(200)		Amorfo I	
Referencia	10.60 ^a		11.90 ^a		16.50 ^a		14.20 – 14.50 ^b	
Tratamiento/Dirección	Axial	Radial	Axial	Radial	Axial	Radial	Axial	Radial
Muestra No Tratada		10.71	12.34	11.72	15.93	15.85	14.54	14.62
Pretratamiento con H ₂ O ₄		10.79	12.32	11.63	15.79	15.78	14.61	14.39
Pretratamiento con NaOH			12.25		15.42	15.50	14.35	14.27

^a Señales observadas en celulosa cristalina de algodón puro (I β), (Elazzouzi-Hafraoui *et al.*, 2008).

^b Señales observadas de celulosa amorfa en muestra comercial (Park *et al.*, 2010).

cristalina, al observarse la señal intensa a 15.93 nm⁻¹. Las soluciones ácidas y básicas lograron disolver la matriz formada por la lignina y la hemicelulosa de la muestra sin tratar, por lo que se espera que las señales que revelan su cristalinidad (Figura 3a) se modifiquen.

La pérdida de cristalinidad a nivel molecular se percibe en el incremento de las bandas correspondientes a material mesomórfico, siendo especialmente notorio en la fibra tratada con H₂SO₄ (Figura 3b). Esto no necesariamente sugiere la aparición de celulosa amorfa, sino que la fibra en su conjunto se transformó a un material predominantemente con esta condición. La presencia de celulosa amorfa en el bagazo en realidad se evidencia con la aparición de una nueva señal en $q \sim 14.5$ nm⁻¹ del patrón 1D WAX radial de la muestra tratada con solución de NaOH (línea en gris de la Figura 3c), sugiriendo así un cam-

bio estructural en esta dirección de la fibra. Una identificación completa para los planos cristalinos de la Celulosa I, y de la celulosa amorfa, en términos de q se presenta en el Cuadro 1.

Tamaño de cristal y Porcentaje de cristalinidad

Identificadas las señales de q para la celulosa cristalina y amorfa en los perfiles 1D WAXS, se procedió a estimar porcentajes de cristalinidad y tamaños de cristal para las diferentes fibras. Para calcular el porcentaje de cristalinidad se consideraron todas las señales observadas en los patrones 1D WAXS, haciendo uso de la Ecuación (3); mientras que para el tamaño de cristal se eligió la señal más predominante a lo largo de las direcciones radial y axial de la fibra, la cual se identificó en el plano (200). La posición de este plano permite estimar el tamaño de cristal usando la Ecuación (4). Los patrones 1D WAXS de las muestras fue-

ron analizadas y deconvolucionadas empleando PeakFit (Systat Software) para estimar ambos parámetros. Los valores obtenidos de estos se presentan en el Cuadro 2.

El cuadro anterior sugiere que en todas las muestras existe una mayor tasa de cristalinidad en dirección radial que en la axial, lo cual es esperado dada la estructura jerárquica de las microfibrillas, pues presentan arreglos de planos paralelos en dirección radial. Después de aplicado el pretratamiento ácido se nota un ligero decremento en el porcentaje de cristalinidad de las fibras, aun con la aparición de material mesomórfico adicional, y otro aún más notorio en el tamaño de cristal. Esto indica que la remoción de una porción de la matriz lignocelulosa no afectó significativamente la cristalinidad de las fibras, aunque sí logró hacerlo respecto a su tamaño de partícula. Sin embargo, al aplicarse el pretratamiento con NaOH, es

Cuadro 2. Porcentaje de cristalinidad y tamaño de cristal evaluadas para las diferentes muestras de bagazo de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) de este estudio.

Muestra	Dirección Radial			Dirección Axial		
	Posición (200) (q nm ⁻¹)	Tamaño de cristal (nm)	% Cristalinidad	Posición (200) (q nm ⁻¹)	Tamaño de cristal (nm)	% Cristalinidad
No tratada	15.93	4.60	90.94	15.85	4.73	47.24
H ₂ SO ₄	15.78	3.99	88.42	15.79	3.85	46.56
H ₂ SO ₄ /NaOH	15.50	5.12	55.83	15.42	6.29	25.94

interesante observar una reducción drástica en el porcentaje de cristalinidad en ambas direcciones, y un incremento en el tamaño de cristal (~12% en la dirección radial, y 33% en la dirección axial, con respecto a la fibra no tratada). La baja de cristalinidad en esta última etapa sugiere una transformación efectiva de celulosa cristalina a amorfa, inducida por la solución de NaOH. El aumento en el tamaño de cristal después de haber ocurrido la desdignificación en medio básico se explica al considerarse una posible re cristalización de la celulosa remanente, como se ha observado anteriormente en celulosa natural (Hermans *et al.*, 1950; Kroon *et al.*, 1996). Los resultados obtenidos sugieren que este último pretratamiento permitió que una gran porción de la celulosa cristalina de la muestra original fuese transformada a celulosa amorfa, a lo largo de la fibra, acompañada de una re cristalización paralela.

CONCLUSIONES

La cristalinidad es un parámetro importante en el pretratamiento de materiales lignocelulósicos con destino a la producción de bioetanol, pues afecta directamente el rendimiento de este. Aquí, se ha explorado el uso de WAXS basado en radiación sincrotrón para abordar esta situación en el pretratamiento ácido y básico de bagazo de caña de azúcar. Los pretratamientos han permitido observar efectos importantes en el porcentaje de cristalinidad y tamaño de cristal de la celulosa en las fibras, siendo evidente tales efectos en el pretratamiento básico.

AGRADECIMIENTOS

Al personal de la estación BL23A1 SWAXS del NSRRC por las facilidades otorgadas durante la realización de estos experimentos. Este trabajo fue financiado por el Tecnológico Nacional de México (Proyecto de Investigación 5494.14-P).

LITERATURA CITADA

- Burger C., Hsiao B.S., Chu B. 2010. Preferred Orientation in Polymer Fiber Scattering. *Polymer Reviews* 50(1): 91-111.
- Claassen P.A.M., van Lier J.B., Contreras A.M.L., van Niel E.W.J., Sijtsma L., Stams, A.J.M., Weusthuis R.A. 1999. Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52(6): 741-755.
- Elazzouzi-Hafraoui S., Nishiyama Y., Putaux J.L., Heux L., Dubreuil F., Rochas C. 2008. The shape and size distribution of crystalline nanoparticles prepared by acid hydrolysis of native cellulose. *Biomacromolecules* 9(1): 57-65.
- Glatter O., Kratky O. 1982. *Small angle X-ray scattering*. Academic Press. 119-123p.
- Guinier A., Fournet A. 1955. *Small angle X-ray scattering*. (1st edition ed.). John Wiley and Sons. 126-130p.
- Hermans P.H., Vermaas D., Weidinger A. 1950. Recrystallization of Regenerated Cellulose Upon Mercerization. *Nature* 165(4189): 238-238.
- Jeng U.S., Su C.H., Su C.J., Liao K.F., Chuang W.T., Lai Y.H., Liang K.S. 2010. A small/wide-angle X-ray scattering instrument for structural characterization of air-liquid interfaces, thin films and bulk specimens. *Journal of Applied Crystallography* 43: 110-121.
- Klug H. P., Alexander L.E. 1974. *X-ray diffraction procedures for polycrystalline and amorphous materials* (2nd edition ed.). John Wiley and Sons. p.
- KroonBatenburg L.M.J., Bouma B., Kroon J. 1996. Stability of cellulose structures studied by MD simulations. Could mercerized cellulose II be parallel? *Macromolecules* 29(17): 5695-5699.
- Lai Y.H., Sun Y.S., Jeng U., Huang Y.S., Song Y.F., Dronyak R., Liang K.S. 2005. A new small angle X-ray scattering station at NSRRC. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms* 238(1-4): 205-213.
- Mosier N., Wyman C., Dale B., Elander R., Lee Y.Y., Holtzapple M., Ladisch M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 96(6): 673-686.
- Mussatto S.I., Dragone G., Guimaraes P.M.R., Silva J.P.A., Carneiro L.M., Roberto I. C., Teixeira, J.A. 2010. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnology Advances* 28(6): 817-830.
- Oh S.Y., Yoo D.I., Shin Y., Kim H.C., Kim H.Y., Chung Y.S., Youk J.H. 2005. Crystalline structure analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide by means of X-ray diffraction and FTIR spectroscopy. *Carbohydrate Research* 340(15): 2376-2391.
- Pandey A., Soccol C.R., Nigam P., Soccol V.T. 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology* 74(1): 69-80.
- Park S., Baker J.O., Himmel M.E., Parilla P.A., Johnson D.K. 2010. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for Biofuels* 3.
- Schnablegger H., Singh Y. 2011. *The SAXS guide: Getting acquainted with the principles* (2nd edition ed.). Anton Paar GmbH. p.
- Shaibani N., Ghazvini S., Andalibi M.R., Yaghmaei S. 2011. Ethanol production from sugarcane bagasse by means of enzymes produced by solid state fermentation method. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 59: 1836-1839.
- Sugiyama J., Vuong R., Chanzy H. 1991. Electron-Diffraction Study on the 2 Crystalline Phases Occurring in Native Cellulose from an Algal Cell-Wall. *Macromolecules* 24(14): 4168-4175.