

# استفاده از روش پاسخ سطح و طراحی مرکب مرکزی در بهینه سازی قندسازی از دورریز هرس درخت سپیدار در فرایند بیواتانول به روش هیدرولیز با اسید رقیق

علی آراسته نوده\*<sup>+</sup>، سوسن خسرویاری

گروه مهندسی شیمی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران

**چکیده:** محدود بودن منابع سوخت های فسیلی و نیاز روزافزون به سوخت، آلودگی هوا و نیاز به سوخت های سبز باعث شده تا بیواتانول به عنوان انرژی تجدید شونده مورد توجه قرار گیرد. این سوخت به طور عمده از گیاهان و فراورده های زراعی تولید می شود. به منظور تعیین پارامترهای مؤثر بر تولید شکر قابل تخمیر از هیدرولیز اسید رقیق دورریزهای درخت سپیدار در فرایند بیواتانول از روش پاسخ سطح و طراحی مرکب مرکزی استفاده شده است. چوب درخت نخست با آب مقطر شسته شده و در معرض هوا و نور خورشید خشک شده و توسط آسیاب دیسکی ارتعاشی تا ۵۰ میکرومتر آسیاب و در پلاستیک های زیپ دار در هوای اتاق نگهداری شد و سپس در دماهای معین در محلول اسیدی در اتوکلاو به مدت تعیین شده گرما داده شد. به برای بررسی تأثیر سه متغیر اصلی غلظت اسید، دما و زمان بر روی شکر قابل تخمیر تولید شده دما در ۳ سطح ۱۴۰، ۱۶۰، و ۱۸۰ درجه سلسیوس غلظت اسید در ۳ سطح ۰٫۵، ۱، و ۱٫۵ درصد و زمان در ۳ سطح ۵، ۱۰، و ۱۵ دقیقه به عنوان پایه انتخاب شد. با استفاده از آزمایش های کیفی مولیش، بارفورد و ریزرسینال ترکیب عمده فراورده ی صاف شده گلوکز تشخیص داده شد. غلظت گلوکز با استفاده از روش لین انیون اندازه گیری و به وسیله یک معادله دو مجذور مدل شد. نتیجه ها نشان داد که تولید گلوکز در محلول تعریف شده بیش تر تحت تأثیر توان دوم دما و سپس غلظت اسید و به مقدار کم تر تحت تأثیر زمان است. در دما و غلظت بالای اسید و زمان متوسط می توان بیش ترین فراورده ی گلوکز را تولید نمود.

**واژه های کلیدی:** شکر قابل تخمیر؛ هیدرولیز اسیدی؛ سپیدار؛ روش پاسخ سطحی؛ طراحی مرکب مرکزی.

**KEYWORDS:** Dilute acid; Fermentable sugar; Acid Hydrolysis; Poplar tree; RSM; CCD.

## مقدمه

رشد گیاهان که منبع اصلی تولید این سوخت می باشد باعث می شود که به پاک سازی هوا کمک کند و این سوخت به عنوان سوخت پاک در نظر گرفته شود [۱]. نقطه ضعف سوخت بیواتانول نیز همین استفاده از گیاهان و فراورده های کشاورزی می باشد که در چرخه غذایی انسان ها و حیوانات قرار دارند. اگر بتوان

محدود بودن منابع سوخت های فسیلی و نیاز روزافزون به سوخت، آلودگی هوا و نیاز به سوخت های سبز باعث شده تا بیواتانول به عنوان انرژی تجدید شونده مورد توجه قرار گیرد. داشتن مولکول اکسیژن بیش تر در ترکیب به نسبت سوخت های فسیلی و همچنین استفاده از کربن دی اکسید در هنگام

\*عهدہ دار مکاتبات

+E-mail: aliarastehnodeh@iauu.ac.ir

در فرایند قندسازی باندهای هیدروژنی سلولز و همی سلولز شکسته شده و به قندهای ساده پنتوز<sup>(۵)</sup> و هگزوز<sup>(۶)</sup> تبدیل میگردند [۸]. استفاده از اسید باعث تبدیل سریع سلولز به گلوکز با کمترین تولید فرآورده‌ی جانبی می‌شود. آراسته و همکاران هیدرولیز اسید غلیظ پوست سبز گردو را به‌عنوان یکی دیگر از دورریزهای کشاورزی در محدوده اسید غلیظ مورد بررسی قرار دادند [۱۰]. *ایران محبوب و همکاران* [۱۱] هیدرولیز اسید غلیظ چوب را انجام داده و دریافتند که بیش‌ترین شکر به‌دست آمده (۷۸-۸۲٪ بازده نظری) در هیدرولیز با غلظت سولفوریک اسید حدود ۲۶٪ طی زمان دو ساعت صورت می‌گیرد. فاکتور بحرانی برای اقتصادی کردن این پروژه بازیافت اسید مصرفی می‌باشد [۱۲]. مطالعه‌های زانگ و همکاران [۱۳] نشان می‌دهد فسفریک اسید در ۵۰ °C بلورینگی<sup>(۷)</sup> سلولز را کاهش داده و با تولید فرآورده‌های جانبی بسیار ناچیز همراه است که با یک سم زدایی به‌وسیله جذب کربن فعال می‌توان این بازدارنده‌ها را جذب نمود.

هنگامی که از فرآیندهای اسید رقیق (کم‌تر از ۱۰٪ وزنی) استفاده می‌شود برای انجام هیدرولیز فرایند در دمای بالا انجام می‌گیرد. دمای بالا باعث می‌شود در طی زمان گلوکز تولید شده دوباره تجزیه شود و بهره‌وری به کم‌تر از ۷۰٪ برسد [۱۴]. بنابراین یکی از مهم‌ترین مسئله‌ها در افزایش بهره‌وری انتخاب دقیق میزان اسید، دما و زمان برای تولید فرآورده‌ی دلخواه‌تر می‌باشد [۱]. روبر و همکاران در سال ۲۰۱۲ میلادی [۷] در پژوهشی به هیدرولیز اسید رقیق ساقه‌های گل آفتاب گردان با سولفوریک اسید و مطالعه عامل‌های تأثیر گذار بر آن پرداختند. آن‌ها از روش پاسخ سطحی برای تحلیل نتیجه‌ها استفاده کردند و نشان دادند که در هر ۱۰۰ گرم از ماده خام بیش‌ترین ۳۳ گرم گلوکز و زایلوز در شرایط بهینه به دست می‌آید. شرایط بهینه در دمای ۱۶۷ درجه سلسیوس و غلظت وزنی ۱٫۳٪ سولفوریک اسید تعیین شد.

در مطالعه پیشین [۱۵] هیدرولیز اسید رقیق پوست سبز گردو با هدف بررسی اثرهای پارامترهای فرایند بر میزان شکر قابل تخمیر تولیدی با استفاده از مدل پاسخ سطحی بررسی شد. در این پژوهش بررسی تأثیر سه عامل مهم دما، غلظت اسید و زمان با استفاده از روش پاسخ سطحی برای به‌دست آوردن بالاترین مقدار گلوکز و زایلوز به روش هیدرولیز اسید رقیق دورریز هرس درخت سپیدار مد نظر است.

از دورریزهای چوب درختان و یا سایر گیاهان استفاده نمود گام بزرگی در پیشرفت و توسعه تولید این سوخت پاک برداشته خواهد شد. بدین منظور، پژوهش‌ها در زمینه استفاده از مواد لینگوسلولزی ارزان‌تر به عنوان ماده اولیه مانند کودزو [۲]، ماهولا [۳]، دورریزهای به دست آمده از آسیاب گندم [۴]، کاج [۵]، دورریزهای هرس درخت زیتون [۶] و دورریزهای ساقه گل آفتابگردان [۷] صورت گرفته است و هر کشوری به فراخور نوع پوشش گیاهی منطقه خود انتخاب‌هایی را انجام داده است.

درخت سپیدار<sup>(۱)</sup> بومی نواحی گوناگونی در نیمکره شمالی است. سپیدارها گاهی با نام صنوبر، تبریزی، کبوده، پده و شالک نیز معرفی می‌شوند. در خانواده این گیاه ۲۵ تا ۳۵ گونه گیاهی شناخته شده است که درختانی خزان پذیر با ارتفاعی متنوع از ۱۵ تا ۵۰ متر هستند که قطر تنه برخی از آنان می‌تواند تا حدود ۲٫۵ متر رشد کند.

این درخت در ایران هم در نواحی مرطوب و پر آب شمال ایران مانند گیلان و مازندران و هم در نقاط خشک و کم آب مانند خراسان و آذربایجان به فراوانی یافت می‌شود، در نتیجه می‌توان از دورریزهای هرس چوب این درخت به عنوان منبعی قابل دسترس و فراوان برای تولید قند قابل تخمیر در فرایند بیواتانول استفاده نمود. این دورریزها مانند هر گیاه دیگر دارای سلولز و همی سلولز به‌عنوان پلیمرهای شکر می‌باشد که می‌تواند به‌عنوان یک زیست توده در فرایند قندسازی به قند قابل تخمیر برای تولید بیواتانول مورد استفاده قرار گیرد. قندسازی به عنوان تبدیل پلیمرهای شکر دیواره سلولی به مونومرهای شکر، یک فرایند کلیدی در فرایند بیواتانول می‌باشد [۸].

فرایند بیواتانول شامل چهار مرحله: پیش فراوری<sup>(۲)</sup>، قندسازی<sup>(۳)</sup>، تخمیر<sup>(۴)</sup> و جداسازی می‌باشد. پیش فراوری ساختار زیست توده را تغییر داده و در نتیجه سطح دسترسی آن را افزایش می‌دهد. در مرحله قند سازی، هیدرولیز زیست توده از آن شکر قابل تخمیر می‌سازد که پس از آن به‌وسیله عملیات میکروبی و تخمیر به اتانول تبدیل می‌شود. تخمیر اغلب توسط مخمرها صورت می‌گیرد و الکل تولید شده از قند توسط مخمرها از سایر فرآورده‌های جانبی و مواد اولیه جدا می‌شود. در این میان قندسازی مرحله کلیدی در تبدیل زیست توده به اتانول می‌باشد.

(۱) Populus

(۲) Pretreatment

(۳) Saccharification

(۴) Fermentationm

(۵) Pentose

(۶) Hexoses

(۷) Crystallinity

**بخش تجربی****ماده اولیه**

در شهریور ماه ۱۳۹۴ شاخه هایی با قطر ۸-۱۰ cm از درخت سپیدار در شهرستان قوچان بریده شد. سپس این شاخه ها به ذره هایی با اندازه (۴/۶-۰/۱۰ mm) تبدیل شدند. ذره های چوب آماده شده با آب مقطر شسته شده و به مدت یک هفته در هوا و نور خورشید خشک شده و سپس توسط آسیاب دیسکی ارتعاشی (Retsch RS 100) تا ۵۰ میکرومتر آسیاب و در پلاستیک های در بسته نگهداری شد.

**طراحی آزمایش ها**

به منظور تعیین مدل و یافتن چگونگی تأثیر پارامترهای گوناگون از روش پاسخ سطح<sup>(۱)</sup> استفاده شد. این روش یک روش آماری است که در بهینه سازی فرایندهایی که پاسخ آن ها توسط بیش از دو متغیر تحت تأثیر قرار می گیرد، به کار می رود [۱۶] به طوری که تأثیر متغیرها بر روی پاسخ به صورت یک نمودار رسم می شود که نقطه های بهینه آن مشخص است [۱۷]. این روش حتی توانایی ارزیابی میزان اثر پارامترها و تأثیر آن ها بر روی یکدیگر را دارد [۱۸]. در این روش برای هر متغیر وابسته مدلی تعریف می شود که آثار اصلی و متقابل متغیرهای تأثیر گذار روی آن (دما، غلظت اسید و زمان) را به صورت جداگانه بیان نماید. مدل تعریف شده بیش تر به صورت معادله (۱) می باشد.

$$Y_n = B_0 + \sum B_i x_i + \sum \sum B_{ij} x_i x_j + \sum B_{ii} x_i^2 + \varepsilon \quad (1)$$

که در آن  $Y_n$  یکی از پاسخ ها،  $B_0$  ضریب ثابت،  $B_i$  اثرهای خطی،  $B_{ii}$  اثرهای مربعی و  $B_{ij}$  اثرهای متقابل می باشد.

بر اساس مدل ارایه شده در معادله (۱)، برای بررسی اثر غلظت اسید، دما و زمان واکنش بر روی میزان شکر تولیدی، معادله دو مجذوری<sup>(۲)</sup> به شکل معادله (۲) در نظر گرفته شده است که در آن متغیرهای  $t$ ،  $T$ ،  $C$  به ترتیب غلظت اسید، دما و زمان می باشند.

$$Y = A_0 + A_1.C + A_2.T + A_3.t + A_4.C^2 + A_5.T^2 + A_6.t^2 + A_7.C.T + A_8.C.t + A_9.T.t \quad (2)$$

این معادله ۱۰ ضریب ثابت دارد. برای محاسبه این ضریب ها با استفاده از روش کمترین مربعها<sup>(۳)</sup> (نیاز به حداقل ۱۰ آزمایش در شرایط گوناگون وجود دارد. طراحی مرکب مرکزی<sup>(۴)</sup> یکی از

روش ها برای طراحی آزمایش ها و به دست آوردن ضریب ها معادله (۲) می باشد [۱۹]. سه سطح با کدهای ۱ و ۰ و -۱ برای سه عامل در نظر گرفته شده اند و ضریب  $\alpha$  نیز ۰/۶ انتخاب شده است. سطوح بر اساس نتیجه های پیشین [۲۰] از آزمایش های هیدرولیز اسید رقیق انتخاب شده اند به طوری که غلظت ۰/۵٪، ۱٪ و ۱/۵٪ وزنی برای اسید سولفوریک، زمان واکنش ۵، ۱۰، ۱۵ دقیقه و دمای واکنش ۱۴۰، ۱۶۰ و ۱۸۰ درجه سلسیوس در نظر گرفته شده است (جدول ۱). برای اطمینان از صحت پاسخ های هر آزمایش دو بار انجام شده و در صورت نزدیک بودن نتیجه ها از آن ها متوسط گیری شده است. در صورت وجود اختلاف در پاسخ ها آزمایش برای بار سوم تکرار و با نزدیک ترین نتیجه متوسط گیری شده است.

**پیش فراوری اسید رقیق**

پنج گرم از زیست توده خرد شده به همراه ۹۵ گرم مخلوط آب و اسید سولفوریک در شیشه های آزمایشگاهی درب دار (شیشه های پیرکس) در دما و زمان مورد آزمایش (جدول ۱) در اتوکلاو قرار گرفت. سپس محلول به دست آمده توسط کاغذ صافی و قیف بوخنر با استفاده از پمپ خلاء صاف شده و جامد مانده بر روی صافی با آب مقطر شستشو داده شد تا زمانی که حجم محلول زیر صافی به ۱۰۰۰ میلی لیتر رسید. ۲۰۰ سی سی از محلول برای آنالیز استفاده شده است. ترکیب محلول صاف شده با استفاده از روش های کیفی مولیش [۲۱]، بارفورد [۲۲]، ریزورسینال [۲۳]، و ارسینال [۲۴] مورد ارزیابی قرار گرفته و مشخص شد فراورده ی اصلی قندسازی، گلوکز می باشد. میزان این گلوکز به روش لین اینون اندازه گیری شده است [۲۵ و ۲۶].

**نتیجه ها و بحث**

جدول ۱ نتیجه های به دست آمده از آنالیز مایع صاف شده را نشان می دهد. گلوکز فراورده ی اصلی هیدرولیز زیست توده است.

**مدل ریاضی (ضریب ها و پاسخ ها)**

مطابق آنچه که پیش تر گفته شد معادله (۲) بر اساس مطالعه های پیشین صورت گرفته در این زمینه [۲۷، ۱۷] به عنوان مدل ریاضی تحلیل اثرهای عامل های مؤثر بر نتیجه ها در نظر گرفته شده است. میزان گلوکز موجود در مایع صاف شده به عنوان پاسخ ها (G)

(۱) Response Surface Methodology (RSM)

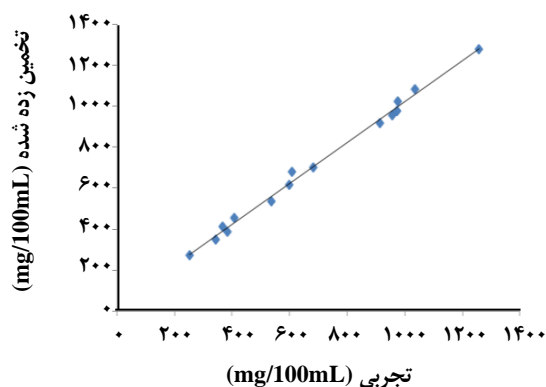
(۲) Quadratic Form

(۳) Least Square

(۴) Central Composite Design (CCD)

جدول ۱- میزان گلوکز به دست آمده از آزمایش‌های هیدرولیز.

شماره آزمایش	زمان هیدرولیز t (min)	دمای هیدرولیز T (°C)	غلظت اسید C(w/v)	غلظت گلوکز استحصال شده G (mg/100ml)
۱	۵ (-۱)	۱۴۰ (-۱)	۰٫۵ (-۱)	۳۴۸
۲	۵ (-۱)	۱۸۰ (+۱)	۰٫۵ (-۱)	۹۱۸
۳	۵ (-۱)	۱۴۰ (-۱)	۱٫۵ (+۱)	۳۸۹
۴	۵ (-۱)	۱۸۰ (+۱)	۱٫۵ (+۱)	۹۷۸
۵	۱۵ (+۱)	۱۴۰ (-۱)	۰٫۵ (-۱)	۴۱۵
۶	۱۵ (+۱)	۱۸۰ (+۱)	۰٫۵ (-۱)	۱۰۲۳
۷	۱۵ (+۱)	۱۴۰ (-۱)	۱٫۵ (+۱)	۴۵۶
۸	۱۵ (+۱)	۱۸۰ (+۱)	۱٫۵ (+۱)	۱۰۸۲
۹	۱۰ (۰)	۱۲۶ (-۱٫۶۸)	۱ (۰)	۲۷۳
۱۰	۱۰ (۰)	۱۹۳ (+۱٫۶۸)	۱ (۰)	۱۲۷۹
۱۱	۱۰ (۰)	۱۶۰ (۰)	۰٫۱۶ (-۱٫۶۸)	۵۹۷
۱۲	۱۰ (۰)	۱۶۰ (۰)	۱٫۸۴ (+۱٫۶۸)	۷۰۲
۱۳	۱/۵۹ (-۱٫۶۸)	۱۶۰ (۰)	۱ (۰)	۵۳۷
۱۴	۱۸/۴۱ (+۱٫۶۸)	۱۶۰ (۰)	۱ (۰)	۶۸۱
۱۵	۱۰ (۰)	۱۶۰ (۰)	۱ (۰)	۵۸۸



شکل ۱- مقایسه غلظت گلوکز به دست آمده توسط معادله (۳) با داده‌های آزمایشی به دست آمده از هیدرولیز سپیدار.

مقدار  $R^2 = 0.95$  [۶] و برای ضایعات گیاه گل آفتابگردان مقدار  $R^2 = 0.99$  را گزارش کرده اند [۷].

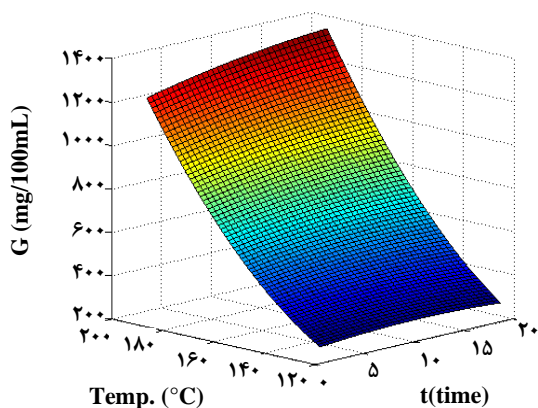
شکل‌های ۲ و ۳ نتیجه‌های به دست آمده از جدول ۱ را تأیید می‌نمایند. در محدوده دمایی و غلظت اسید مطالعه شده،

و غلظت اسید (%C، دما T(°C) و زمان واکنش t(min) به عنوان فاکتورها در نظر گرفته شده است. تأثیر متقابل فاکتورها بر پاسخ‌ها به صورت ضریب‌ها  $A_i$  تعیین شده‌اند. بر اساس ضریب‌های به دست آمده معادله تأثیر دما، زمان و غلظت اسید بر روی غلظت گلوکز را می‌توان به صورت معادله‌ها (۳) نوشت.

$$G = 975.3551 - 18.9517T - 23.9567C - \quad (3)$$

$$6.35878 t + 0.101489T^2 - 1.16363 C^2 - 0.2284 t^2 + 0.47753 TC + 0.095001 Tt - 0.00669 Ct$$

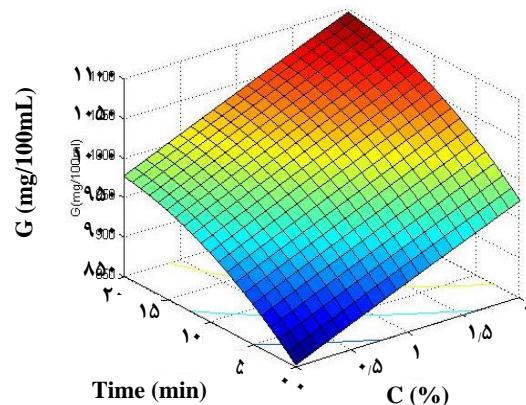
شکل ۱ مقادیرهای پیش بینی شده غلظت گلوکز با استفاده از معادله ۳ را در مقایسه با مقادیرهای آزمایشگاهی نشان می‌دهد. ضریب زاویه این نمودارها ( $R^2$ ) بیانگر مقدار درستی تخمین صورت گرفته می‌باشد. ضریب  $R^2$  در حدود ۰٫۸۸ است که دلالت بر این دارد که ارتباط مناسبی بین متغیرهای وابسته بر اساس ضریب‌ها و نتیجه‌ها وجود دارد. پژوهشگران دیگر برای غلظت گلوکز ناشی از هیدرولیز دورریزهای هرس چوب درخت زیتون



شکل ۳- پاسخ سطحی برای غلظت گلوکز در مایع صاف شده به صورت تابعی از زمان و دما برطبق مدل (غلظت اسید %).

دمای  $180^{\circ}\text{C}$  و زمان ۱۰ دقیقه می باشد که مقدار گلوکز آن  $1272\text{mg/L}$  می باشد. دوسان و همکاران [۲۰] با استفاده از هیدرولیز رقیق باگاس با سولفوریک اسید ۲٪ در  $155^{\circ}\text{C}$  درجه سلسیوس و طی ۱۰ دقیقه بالاترین نتیجه یعنی حدود  $22.7\text{ g/L}$  گلوکز را به دست آوردند. همچنین کاسترو و همکاران [۲۷] با استفاده از هیدرولیز اسید رقیق کاه کلزا با ۲٪ اسید و  $144^{\circ}\text{C}$  و در ۶ دقیقه مقدار گلوکز را  $36\text{ g/L}$  به دست آوردند. کمپو و همکاران [۲۸] در هیدرولیز اسید رقیق گیاه فلفل قرمز در  $110^{\circ}\text{C}$  با ۰٫۵ درصد سولفوریک اسید در ۵ دقیقه مقدار گلوکز را  $21.44\text{ g/L}$  به دست آوردند. همچنین لنینهان و همکاران [۲۹] بهترین شرایط هیدرولیز پوست سیب زمینی را ۱۵ دقیقه در  $150^{\circ}\text{C}$  و اسید ۲٪ به دست آوردند که مقدار گلوکز به دست آمده  $27.95\text{ g/L}$  می باشد. این نتیجه ها نشان می دهد که گرچه چوب درخت سپیدار می تواند یک منبع مناسب برای تولید شکر قابل تخمیر در فرایند بیواتانول باشد ولی با توجه میزان قند تولید شده منبع ضعیف تری نسبت به سایر دورریزهای کشاورزی می باشد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۲۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۷/۱۶



شکل ۲- پاسخ سطحی برای غلظت گلوکز در مایع صاف شده به صورت تابعی از زمان و غلظت اسید برطبق مدل ( $160^{\circ}\text{C}$  دما).

تأثیر اسید متفاوت تر از دما در تولید گلوکز می باشد. در حالی که دما به صورت یک شیب به نسبت ملایم افزایشی غلظت گلوکز را افزایش می دهد، اما غلظت سولفوریک اسید باعث افزایش به نسبت شدیدتری غلظت گلوکز می شود. در اثر افزایش زمان به مرور غلظت گلوکز افزایش می یابد اما کم کم تجزیه گلوکز آغاز می شود و غلظت آن کاهش می یابد. بنابراین بیشترین غلظت گلوکز، در بالاترین غلظت اسید و دما و زمان متوسط به دست می آید.

### نتیجه گیری

نتیجه ها نشان می دهد که از دورریزهای هرس درخت سپیدار با استفاده از فرآوری اسید رقیق می توان قند قابل تخمیر برای تولید اتانول استفاده نمود. فرآورده ی عمده هیدرولیز یعنی گلوکز تحت تأثیر سه عامل غلظت اسید، زمان و دما بود. این تأثیر را می توان به صورت یک معادله درجه دوم نوشت و ضریبها آنرا محاسبه نمود. محاسبه ضریبها و رسم شکل نشان داد که گلوکز تحت تأثیر توان دوم غلظت اسید و دما است. بنابراین غلظت اسید و دمای بالا و زمان متوسط می تواند بیشترین میزان فرآورده (گلوکز) را تولید نماید. در این پژوهش بهترین شرایط در غلظت ۱٫۵٪ و

### مراجع

- [1] Balat M., Balat H., Cahide O.Z., *Progress in Bioethanol Processing, Progress in Energy and Combustion Science*, **33**: 551-573 (2008).

- [2] Rowan F., Heather A., Danielle A., Brett G., Stephen A., Allen Torbert H., Sicher R., Ziska L., [Kudzu: A New Source of Carbohydrate for Bioethanol Production](#), *Biomass and Bioenergy*, **33(1)**: 57–61 (2009).
- [3] Kumar M.S., Behera S., Ranjan M., Ramesh C.S., [Bioethanol Production from Mahula Flowers by Solid-State Fermentation](#), *Applied Energy*, **86(5)**: 640–644 (2009).
- [4] Marcos M., García-Cubero M. T., González-Benito G., Coca M., Bolado S., Lucas C., [Improvement of Enzymatic Hydrolysis of Steam-Exploded Wheat Straw by Simultaneous Glucose and Xylose Liberation](#), *Biochem. Eng.*, **27(4)**: 499–5090 (2013).
- [5] Frederick W.J., [Production of Ethanol from Carbohydrates from Loblolly Pine](#), *Bioresource Technology*, **99**: 5051-5057 (2008).
- [6] Juan F., Martín G., Sánchez S., Cuevas M., [Evaluation of the Effect of the Dilute Acid Hydrolysis on Sugars Release from Olive Pruning](#), *Renewable Energy* **51**: 382–387 (2013).
- [7] Ruiz E., Romero I., Moya M., Cara C., Vidal J., D., Castro E., [Dilute Sulfuric Acid Pretreatment of Sunflower Stalks for Sugar Production](#), *Bioresource Technology*, **140**: 292-298 (2013).
- [8] Galbe M., Zacchi G., [A Review of the Production of Ethanol from Softwood](#), *Applied Microbiology and Biotechnology*, **59(6)**: 618-628 (2002).
- [9] Demirbas A., [Bioethanol from Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel from Biomass, Energy Sources](#), **27(4)**: 327-337 (2005).
- [10] Arasteh A., Ardgmmand M., Fanaei M., Safekordi A., [Kinetic Modeling of Concentrated Acid Hydrolysis of Walnut Green Skin](#), *African Journal of Biotechnology*, **11(4)**: 878-887 (2012).
- [11] Iranmahboob J., Nadim F., Monemi S., [Optimizing Acid-Hydrolysis: a Critical Step for Production of Ethanol from Mixed Wood Chips](#), *Biomass and Bioenergy*, **22(5)**: 401-404 (2002).
- [12] Chandel A.K., Chan ES., Rudravaram R., Lakshmi Narasu M., Venkateswar L., Ravindra P., [Bioconversion of Pentose Sugars Into Ethanol: A Review and Future Directions](#), *Biotechnology and Molecular Biology Review*, **2(1)**: 14-32 (2007).
- [13] Zhang X., Yu H., Huang H., Liu Y., [Evaluation of Biological Pretreatment with White Rot Fungi for the Enzymatic Hydrolysis of Bamboo Culms](#), *International Biodeterioration & Biodegradation*, **60(3)**: 159-164 (2007).
- [14] Rajeev K.S., Reeta R., Mathew G., Pandey A., [Cellulose Production Using Biomass Feed Stock and its Application In Lignocelluloses Saccharification for Bio-Ethanol Production](#), *Renewable Energy*, **34(2)**: 421-424 (2009).
- [15] Arasteh A., Hemmati H., [Using Response Surface Method for Optimizing Dilute Acid Hydrolysis of Walnut Green Skin](#), *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, **4(11)**: 209-2012 (2015).
- [16] Talebpour Z., Ghassempour A., Abbaci M., Aboul-Enein H.Y., [Optimization of Microwave-Assisted Extraction for the Determination of Glycyrrhizin in Menthazin Herbal Drug by Experimental Design Methodology](#), *Chromatographia*, **70**: 191–197 (2009).

- [17] Bezerra M., Santelli R., Oliveira E., Leonardo S., [Response Surface Methodology \(RSM\) as a Tool for Optimization in Analytical Chemistry](#), *Talanta*, **76**: 965-977 (2008).
- [18] Switzar L., Giera M., Lingeman H., Irth H., Niessen W.M.A., [Protein digestion Optimization for Characterization of Drug-Protein Adducts Using Response Surface Modeling](#), *J. Chromatogr.*, **1218**: 1715-1723 (2011).
- [19] Khajeh M., Sanchooli E., [Optimization of Microwave-Assisted Extraction Procedure for Zinc and Iron Determination in Celery by Box-Behnken Design](#), *Food Anal. Methods.*, **3**: 75-79 (2010).
- [20] Dussán K. J., Silva D. V., Moares J. C., Arruda P.V., Felipe G. A., [Dilute-acid Hydrolysis of Cellulose to Glucose from Sugarcane Bagasse](#), *Chemical Engineering Transaction*, **38**: 433-440 (2014).
- [21] Foulger J.H., [The Use of the Molisch \(A-Naphthol\) Reaction in the Study of Sugar in Biological Fluids](#), *J. Biol. Chem.*, **92**: 345-353 (1931).
- [22] Barfoed C., [Über die Nachweisung des Traubenzuckers Neben Dextrin und Verwandten Körpern Fresenius.](#), *Zeitschrift Für Analytische Chemie.*, **12(1)**: 27-33 (1873).
- [23] Abramoff P. Robert T., ["An Experimental Approach to Biology, An Experimental Approach to Biology"](#), WH Freeman & Company, San Francisco., (1966).
- [24] Baldwin E., Bell D.J., ["Cole's Practical Physiological Chemistry"](#), Heffer and Sons, Cambridge, (1955).
- [25] Albrecht S. Klüfers P., [The Structural Chemistry of Text-Book Species: the Tartrato-Cuprates in Fehling's Solution](#), *Z Anorg Allg Chem*, **639**: 280-284 (2013).
- [26] Fehling H., [The Simultaneous Determination of Pentose and Hexose in Mixtures of Sugars](#), *Annalen der Chemie und Pharmacie*, **72(1)**, 106-113 (1849).
- [27] Castro E., Díaz M., Cara C., Ruiz E., Romero I., Moya M., [Dilute Acid Pretreatment of Rapeseed Straw for Fermentable Sugar Generation](#), *Bioresource Technology*, **102**: 1270-1276 (2011).
- [28] Campo D., Alegria I., Zazpe M., Echeverria M., Echeverria I., [Diluted Acid Hydrolysis Pretreatment of Agri-Food Wastes for Bioethanol Production](#), *Industrial Crops and Products*, **24**: 214-221 (2006).
- [29] Lenihan P., Orozco A., O'Neill E., Ahmad M., Rooney D.W., Walker G.M., [Dilute Acid Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass](#), *Chemical Engineering Journal*, **156(2)**: 395-403 (2010).