

OBTENCIÓN DE CELOBIOSA A PARTIR DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA PARCIAL DE LA CELULOSA DE CÁSCARA DE ARROZ

HUMBERTO AYALA ARMIJOS*

<https://orcid.org/0000-0003-0148-4433>

NICOLE ROMERO CALLE

<https://orcid.org/0009-0004-0767-9738>

BRAULIO MADRID CELI

<https://orcid.org/0000-0002-8494-1304>

RAMIRO QUEZADA SARMIENTO

<https://orcid.org/0000-0002-9552-8486>

EDGAR TINOCO GÁLVEZ

<https://orcid.org/0009-0007-2920-0152>

RICHARD CHÁVEZ ABAD

<https://orcid.org/0009-0005-9214-227X>

Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud, Universidad Técnica de Machala,
Machala, Ecuador

Recibido: 29 de junio del 2024 / Aceptado: 10 de julio del 2024

Publicado: 12 de diciembre del 2024

doi: <https://doi.org/10.26439/ing.ind2024.n47.7211>

RESUMEN. El objetivo de la investigación fue ablandar la cáscara de arroz mediante pretratamientos hidrotérmicos y alcalinos. Se aplicó temperatura a 121 °C por tres lapsos de tiempo (15, 30 y 45 minutos) y con NaOH en tres concentraciones (0,5, 1 y 1,5 %); se agitó a 120 rpm por una hora; para ajustar a pH 4,8 se adicionó HCl al 20 %, y se añadió 30 FPU de la enzima β -glucosidasa; se agitó a 120 rpm a 50 °C durante 144 horas.

Este estudio fue financiado por la Universidad Técnica de Machala.

* Autor corresponsal.

Correos electrónicos en orden de aparición: jayala@utmachala.edu.ec; gromero8@utmachala.edu.ec; bmadrid@utmachala.edu.ec; rquezada@utmachala.edu.ec; etinoco@utmachala.edu.ec; rchavez@utmachala.edu.ec

Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

La aplicación de 121 °C durante 45 minutos logró un $34,62 \pm 0,79$ % de hidrólisis parcial de celulosa a celobiosa y $18,14 \pm 0,09$ % de hidrólisis total de celulosa a glucosa; y en los hidrolizados donde se pretrató con hidróxido de sodio al 1,5 %, se alcanzó $8,39 \pm 0,79$ % de celobiosa y $46,64 \pm 0,30$ % de glucosa. La aplicación de pretratamiento hidrotérmico favorece la hidrólisis parcial de la celulosa a celobiosa.

PALABRAS CLAVE: disacáridos / cáscara de arroz / tratamiento hidrotérmico del arroz / glucosidasas / celulosa / hidrólisis / enzima

PRODUCTION OF CELLOBIOSE FROM THE PARTIAL ENZYMATIC HYDROLYSIS OF RICE HUSK CELLULOSE

ABSTRACT. The aim of the research was to soften rice husk by hydrothermal and alkaline pretreatments. Temperature was applied at 121 °C for three time periods (15, 30 and 45 minutes) and with NaOH in three concentrations (0,5, 1 and 1,5 %), it was stirred at 120 rpm for one hour, to adjust to pH 4,8; 20 % HCl was added, and 30 FPU of the enzyme β -glucosidase was added and stirred at 120 rpm at 50 °C for 144 hours. The application of 121 °C for 45 minutes achieved a $34,62 \pm 0,79$ % partial hydrolysis of cellulose to cellobiose and $18,14 \pm 0,09$ % total hydrolysis of cellulose to glucose and in the hydrolysates where it was pretreated with sodium hydroxide at 1,5 %, $8,39 \pm 0,79$ % cellobiose and $46,64 \pm 0,30$ % glucose were reached. The application of hydrothermal pretreatment favors the partial hydrolysis of cellulose to cellobiose.

KEYWORDS: disaccharides / rice hulls / parboiled rice / glucosidasas / cellulose / hydrolysis / enzymes

INTRODUCCIÓN

El sector arrocero genera diversos subproductos y residuos lignocelulósicos renovables de bajo costo y abundante disponibilidad, compuestos por celulosa, hemicelulosa y lignina. Los dos primeros polímeros representan aproximadamente el 75 % del peso del material en base seca, mientras que los principales monómeros son pentosas y hexosas que forman cadenas lineales de (1-4)- β - D-glucopiranos (Kumar et al., 2015). La cáscara de arroz, residuo abundante con alto contenido en oligosacáridos, subproducto resultante del descascarado de esta gramínea, cuyo peso representa alrededor del 20 % del cereal, está compuesta por celulosa (30-50 %), hemicelulosa (15-30 %), lignina (10-15 %) y cenizas (15-20 %) (Naqvi et al., 2014).

La celulosa es un homopolisacárido formado por monómeros de D-glucosa unidos por enlaces éter, difíciles de romper en glucosa libre debido a su estructura cristalina altamente organizada. Mediante la aplicación de celulasas, se suele hidrolizar primero a celobiosa y luego a glucosa (Parisutham et al., 2017). Las moléculas de glucosa están unidas como β -celobiosa; por lo tanto, la anhidro- β -celobiosa es la unidad repetitiva de la cadena polimérica. El número de unidades repetidas unidas para formar el polímero de celulosa se denomina *grado de polimerización* (Adler et al., 2022).

La hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica a celobiosa está ganando adeptos debido a las múltiples aplicaciones prebióticas emergentes como endulzante funcional bajo en calorías (Chen et al., 2021). Este azúcar funcional, cero calorías y un aditivo potencial para alimentos y piensos saludables, está formado por dos moléculas de glucosa unidas por un enlace glicosídico β - (1,4'); se diferencia de la maltosa por su configuración en el enlace glicosídico que puede ser α o β (Parisutham et al., 2017).

Los celo-oligosacáridos (COS) son polímeros con un grado de polimerización (GP) entre 3 y 10 monosacáridos, y constan de unidades de glicosilo enlazadas por uniones β - (1-4)-glicosídicos. La celobiosa y el COS cuentan con un GP de 3 a 6 monosacáridos hidrosolubles, pero no pueden ser digeridos por la microbiota intestinal de los humanos (Ávila et al., 2021). Los métodos para la obtención enzimática de celobiosa a partir de residuos lignocelulósicos requieren de pretratamientos alcalinos (NaOH) para despolimerizar la lignina, y ablandar e hinchar la molécula de celulosa y hemicelulosa; posteriormente, se ajusta el pH a 4,8 para la adición de las enzimas celulasas; la temperatura se mantiene a 50 °C agitando a 200 rpm y, de esta manera, ocurre la hidrólisis parcial de la celulosa a celobiosa (Siccama et al., 2022). Las exoglucanasas rompen los extremos de la cadena reductora o no reductora de la celulosa para producir celobiosa (Méndez-Líter et al., 2017).

El objetivo de esta investigación fue evaluar la producción de celobiosa a partir de la hidrólisis enzimática de la celulosa presente en la cáscara de arroz, utilizando β -glucosidasa producida por *Trichoderma reesei* ATCC 26921.

METODOLOGÍA

Materiales

Las cáscaras de arroz se recolectaron del sector arrocerero de la parroquia La Cuca, cantón Arenillas, provincia de El Oro, Ecuador. Fueron seleccionadas, lavadas, secadas y trituradas hasta un tamaño de partícula $\leq 250 \mu\text{m}$. Para la hidrólisis enzimática, se utilizó la enzima comercial de marca Celluclast® 1,5 l con una actividad enzimática de 188 unidades de papel filtro (UPF) de Sigma-Aldrich (Alemania), NaOH de Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, Estados Unidos), estándares de glucosa (Sigma-Aldrich Alemania) y celobiosa (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemania).

Métodos

Composición química de la cáscara de arroz

La cuantificación de carbohidratos estructurales (celulosa y hemicelulosa) y lignina de la cáscara de arroz se realizó aplicando la metodología del Laboratorio Nacional de Energías Renovables (NREL, por sus siglas en inglés) (Sluiter et al., 2012); las cenizas, por termogravimetría (Eliche-Quesada et al., 2017); y la composición de las cenizas, utilizando el espectrómetro Bruker-AXS modelo S4 Pioneer.

Cristalinidad de la cáscara de arroz

La cristalinidad relativa de la cáscara cruda y molida ($\leq 250 \mu\text{m}$) se analizó mediante difracción de rayos. El análisis se realizó en un espectrómetro de fluorescencia de rayos X (XRF) Bruker AXS, modelo S4 Pioneer. Se midió la intensidad de difracción de la radiación Cu K α (longitud de onda 0,154 nm, en condiciones de 40 kV y 40 mA), con un rango de escaneo entre 5° y 50° (2 θ) (Li et al., 2012).

La cristalinidad relativa se calcula utilizando la siguiente ecuación (Rabek, 1980):

$$\text{CR (\%)} = \frac{A_c}{A_c - A_a} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde A_c es el área cristalina y A_a es el área amorfa en el área de los difractogramas de rayos X.

Pretratamiento de cáscara de arroz

Para incrementar la superficie de contacto del sustrato con la enzima, reducir la cristalinidad relativa y disminuir la hidrorrepelencia de la cáscara de arroz, se redujo el tamaño de partícula a $\leq 250 \mu\text{m}$ mediante trituración mecánica. Luego, para reducir el contenido

y suavizar la estructura de la lignina, se prepararon tres soluciones de cáscara de arroz molida al 4 % (m/v) y se adicionó NaOH en tres concentraciones (0,5, 1 y 1,5 %); se agitó a 200 rpm durante una hora (Huang et al., 2018).

También se aplicó un pretratamiento hidrotermal con el objetivo de despolimerizar los componentes estructurales de la cáscara de arroz ($\leq 250 \mu\text{m}$). Este consistió en preparar soluciones de residuos al 5 % (m/v) y se calentó a 121 °C en una autoclave marca Taisite modelo YX-24HDD durante tres periodos diferentes de tiempo (15, 30 y 45 minutos).

Espectroscopía IR (FTIR)

Los espectros infrarrojos por transformación de Fourier (FTIR) de las diferentes muestras de cáscara de arroz ($\leq 250 \mu\text{m}$) sometidas a pretratamiento hidrotermal y alcalino se analizaron en un espectrofotómetro 380 FTIR (marca Thermo Scientific, Estados Unidos). Las muestras se prepararon en gránulos de bromuro de potasio (KBr) presionando una mezcla de 2 mg de muestra con 400 mg de KBr en una prensa de laboratorio JT-11. Para eliminar la interferencia de la presencia de humedad, las muestras y el KBr se deshidrataron por separado a 105 °C hasta peso constante antes de comprimirlos. Los espectros se realizaron en un rango de frecuencia de 400 a 4000 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} y 32 barridos. La línea de base se corrigió y normalizó en transmitancia (New et al., 2019).

Cuantificación de azúcar

Para cuantificar la celobiosa y glucosa resultante de la hidrólisis enzimática de cáscaras de arroz previamente pretratadas con NaOH (0,5, 1 y 1,5 %) y 121 °C (15, 30 y 45 minutos), se tomaron muestras en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 minutos en una minicentrífuga marca ELMI-Sky Line; posteriormente, se filtró usando un filtro de jeringa de 0,22 μm y se almacenó en viales de 1,5 ml hasta su análisis por HPLC. Luego, los estándares de calibración y las muestras se analizaron con un HPLC (Agilent 1100, Alemania) equipado con un detector de índice de refracción (G-1362A XR RI). Se utilizó una columna SUPELCOGEL C-610H. La temperatura de la columna se fijó en 50 °C, mientras que para la fase móvil se empleó H_2SO_4 a una concentración de 5 mm a un caudal de 0,6 ml/min y un tiempo de ejecución de 35 minutos (Sluiter et al., 2012).

Hidrólisis enzimática de celulosa

Para realizar los pretratamientos hidrotérmico-alcalino, se preparó una solución al 4 % (p/v) de CA, se ajustó el pH (4,8) agregando HCl al 20 % (v/v); posteriormente, se agregó la enzima Celluclast 1,5 l (β -glucosidasa) a una concentración de 30 FPU/g de carbohidratos; y se colocó en un agitador orbital marca Taisite modelo OS-2000 a 50 °C y 200 rpm durante 144 horas (Kim et al., 2019). Se muestreó cada 24 horas, se centrifugaron durante 5 minutos a 10 000 rpm en la centrífuga antes mencionada y se filtraron a

través de un filtro de jeringa de 0,22 µm (Millipore, Bedford, Massachusetts). La producción de azúcares (celobiosa, glucosa y xilosa) se cuantificó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Para el cálculo del rendimiento porcentual de celobiosa y glucosa, se utilizó la fórmula que a continuación se detalla (Resch et al., 2015):

$$\% \text{ de conversión} = \frac{\left(\frac{\text{mg azúcar}}{\text{ml}}\right) \times 1,4 \text{ ml} \times H}{\left(\frac{\text{mg polisacáridos}}{\text{g biomasa}}\right) \times 0,014 \text{ g biomasa}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

- H = factor de hidrólisis específico para cada combinación de polisacárido/azúcar
- mg/ml de azúcar proviene del análisis HPLC
- g de polisacárido/g de biomasa procede del análisis de composición

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición proximal

Determinar la composición química de la cáscara de arroz es un requisito imprescindible para conocer la cantidad de celulosa disponible que puede ser hidrolizada a celobiosa y glucosa. La Tabla 1 muestra la composición proximal de este residuo.

Tabla 1

Análisis composicional y detallado de la cáscara de arroz

Componentes	%	±
Sólidos totales	92,05	0,12
Celulosa	46,03	0,31
Hemicelulosa	20,4	0,43
Lignina	8,21	0,308
Cenizas	17,41	0,46
Humedad	8,01	0,161

La celulosa (celobiosa y glucosa) de la cáscara de arroz es el principal componente hidrolizable, de la cual se obtuvo un 46,03 ± 0,31% para celobiosa y glucosa. Investigaciones similares sobre la caracterización de la cáscara de arroz reportaron concentraciones de 51 % de celulosa y 21 % de hemicelulosa en base seca (De Oliveira et al., 2017). Soltani

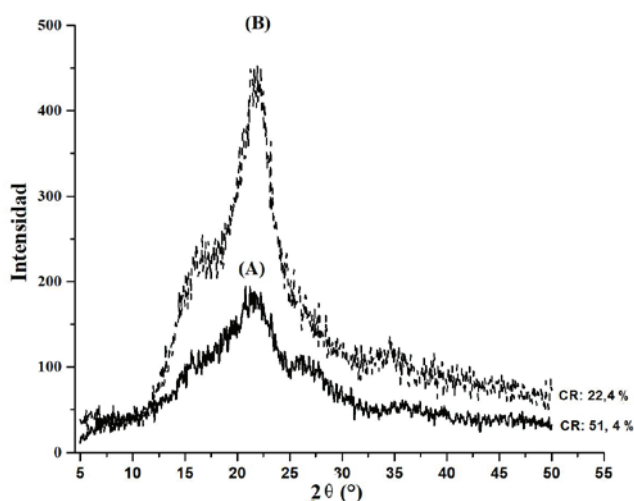
et al. (2015) obtuvieron menores concentraciones de holocelulosa (71 %) en cáscara de arroz cultivada en México.

Cristalinidad relativa de la cáscara de arroz

La fracción cristalina de la celulosa es la mayor resistencia que tiene este compuesto frente a la hidrólisis enzimática. En la Figura 1 se presentan los difractogramas de rayos X de altura máxima realizados en cáscaras de arroz crudas y molidas ($\leq 250 \mu\text{m}$). Las cáscaras de arroz crudas mostraron picos en $2\theta = 21,2^\circ$ y $10,7^\circ$, mientras que las cáscaras molidas tuvieron picos en $2\theta = 21,9^\circ$ y $10,7^\circ$, ángulos de difracción característicos de este tipo de biomasa. La cáscara de arroz cruda alcanzó un 27 % más de cristalinidad relativa que la cáscara molida ($\leq 250 \mu\text{m}$). De acuerdo con la literatura, sabemos que, con tamaños de partículas $\leq 250 \mu\text{m}$, la cristalinidad de la biomasa se reduce alrededor del 50 % y la liberación de glucosa aumenta entre un 24 y un 36 % (Silva et al., 2012).

Figura 1

Porcentaje de cristalinidad relativa: (A) cáscara de arroz cruda y (B) molida ($\leq 250 \mu\text{m}$)



La cristalinidad relativa de la cáscara molida ($\leq 250 \mu\text{m}$) disminuyó con respecto a la cáscara cruda en un 27 % y se eliminó la hidrorrepelencia del residuo que existía en tamaños de partículas $> 250 \mu\text{m}$. Investigaciones realizadas con este residuo indican que, al reducir el tamaño de partícula ($< 400 \mu\text{m}$), disminuye la cristalinidad de la celulosa y aumentan los porcentajes de celobiosa y glucosa obtenidos (Kumar et al., 2009; Silva et al., 2012).

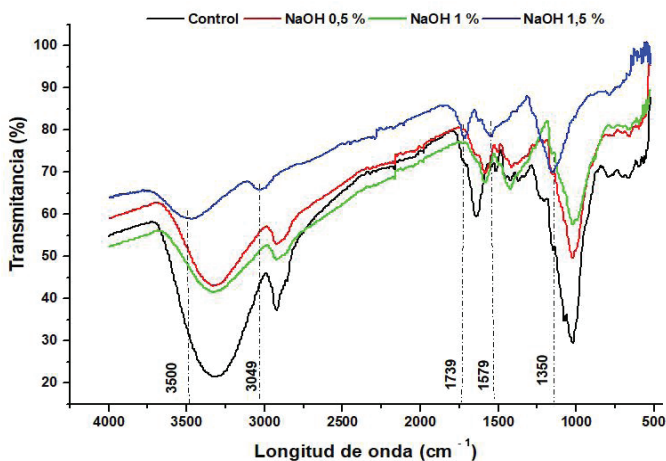
Análisis de la composición estructural

La modificación estructural de la cáscara del arroz mediante pretratamiento hidrotermal-alcalino fue fundamental para cambiar la estructura de la lignina y la holocelulosa, y así tener una mayor superficie y disponibilidad para el ataque enzimático.

En la Figura 2 se muestran algunos cambios estructurales importantes en la cáscara de arroz después del pretratamiento alcalino. Para explicar algunos picos bien definidos, se los etiquetó y asignó a grupos funcionales de la siguiente manera: 1350 cm^{-1} fue C – O, C = C, estiramiento de C – C – O en celulosa, hemicelulosa y lignina; $1739\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$ para el estiramiento de C – H en celulosa y hemicelulosa; $1579\text{--}1739\text{ cm}^{-1}$ fue para OH absorbido y conjugado del estiramiento de C = O y $3049\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ fue para la vibración del enlace OH.

Figura 2

Espectros FTIR de las muestras tratadas con NaOH



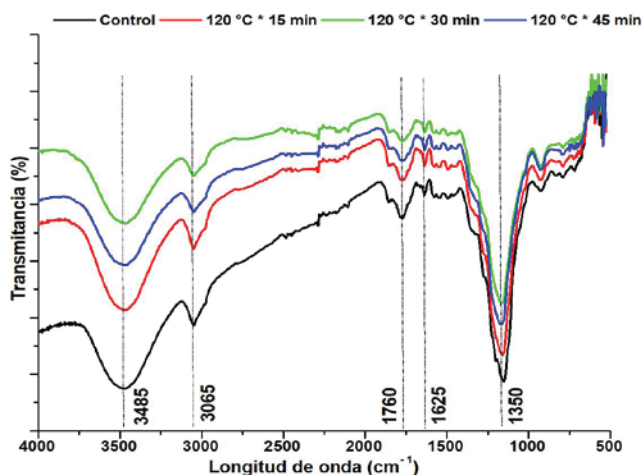
En la Figura 2 se observan los cambios evidentes en el espectro FTIR de la muestra tratada con NaOH al 1,5 %. Se puede ver una señal fuerte que aparece en 1350 cm^{-1} , que se atribuye al estiramiento de los grupos C – O, C = C, C – C – O, de la celulosa, hemicelulosa y lignina. El pico para la banda de 1579 cm^{-1} está directamente relacionado con la degradación de la lignina. Yu et al. (2013) indican que valores de banda cercanos a 1510 cm^{-1} están asociados con el ablandamiento de la lignina. Esta señal es más fuerte en la cáscara no tratada y difiere en 330 cm^{-1} con respecto a la tratada con NaOH al 1,5 %. Investigaciones similares informan que la reducción de la intensidad máxima significa la reducción del contenido de lignina, lo que está directamente relacionado con la reducción del poder calorífico (Iftikhar et al., 2019).

Además, una banda débil y más ancha, que se muestra entre 3049 y 3500 cm^{-1} , está asociada con la vibración del enlace OH. La presencia del grupo OH probablemente se deba a la presencia de enlaces alcohólicos, hidroxilo y fenólicos en el contenido de carbohidratos y lignina de la biomasa (Wu et al., 2019).

Como se muestra en la Figura 3, algunos picos bien definidos se etiquetaron y asignaron a grupos funcionales de la siguiente manera: 1350 cm^{-1} es C – O, C = C, estiramiento de C – C – O en celulosa, hemicelulosa y lignina; 1625-1350 cm^{-1} para la deformación de CH en celulosa y hemicelulosa; 1625-1760 cm^{-1} es para OH absorbido y conjugado del estiramiento de C = O y 3065-3485 cm^{-1} fue para vibración del enlace OH.

Figura 3

Espectros FTIR de las muestras con tratamiento térmico



Los cambios fueron evidentes en el espectro FTIR de la muestra con tratamiento hidrotermal a 121 °C durante 45 minutos. Se puede ver una fuerte señal a 1350 cm^{-1} que se atribuye al estiramiento de los grupos C – O, C = C, C – C – O, de la celulosa, hemicelulosa y lignina. La tensión de la banda observada en la región de 1760 cm^{-1} indica la vibración de estiramiento de C = O; sin embargo, la intensidad máxima se reduce al mínimo en el tratamiento a 120 °C durante 45 minutos. Investigaciones similares informan que la reducción de la intensidad máxima señala la reducción del contenido de lignina, lo que está directamente relacionado con la reducción del poder calorífico (Iftikhar et al., 2019).

Además, una banda débil y más ancha, que se muestra entre 3485 y 3065 cm^{-1} , está asociada con la reducción del número de hidroxilo. Estudios similares explican que la presencia del grupo OH probablemente se deba a la presencia de enlaces alcohólicos,

hidroxilo y fenólicos (Yaddanapudi et al., 2017).

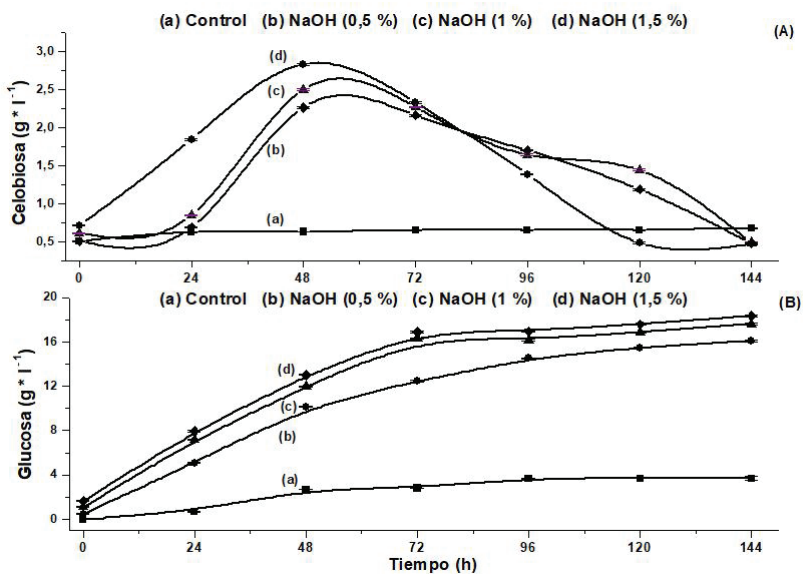
Hidrólisis enzimática de celulosa de cáscaras de arroz

Hidrólisis parcial de celulosa

La hidrólisis completa de la celulosa es uno de los principales obstáculos en la tecnología de la biomasa; cuando este homopolisacárido forma parte de matrices complejas, gran parte del mismo se hidroliza a celodextrinas (celobiosa). La celobiosa es un disacárido que se obtiene de la hidrólisis parcial de la celulosa utilizando β -glucosidasas. A continuación, la Figura 4 muestra las concentraciones de celobiosa y glucosa obtenidas de la hidrólisis de la cascarilla de arroz molida ($\leq 250 \mu\text{m}$).

Figura 4

Formación de celobiosa y glucosa durante la hidrólisis enzimática



La aplicación de NaOH (1,5 %) como pretratamiento suavizante de celulosa produjo una mayor concentración de celobiosa y una menor cantidad de glucosa después de 48 horas de hidrólisis enzimática; y una mayor concentración de NaOH (0,5 %), una menor cantidad de celobiosa y mayor concentración de glucosa, lo que indica que el pretratamiento alcalino favorece la hidrólisis enzimática de la celulosa a glucosa. El 10,14 % de la celulosa fue parcialmente hidrolizada a celobiosa y el 46,63 % a glucosa, obteniéndose el 56,77 % de la hidrólisis total de la celulosa presente en la cáscara de arroz.

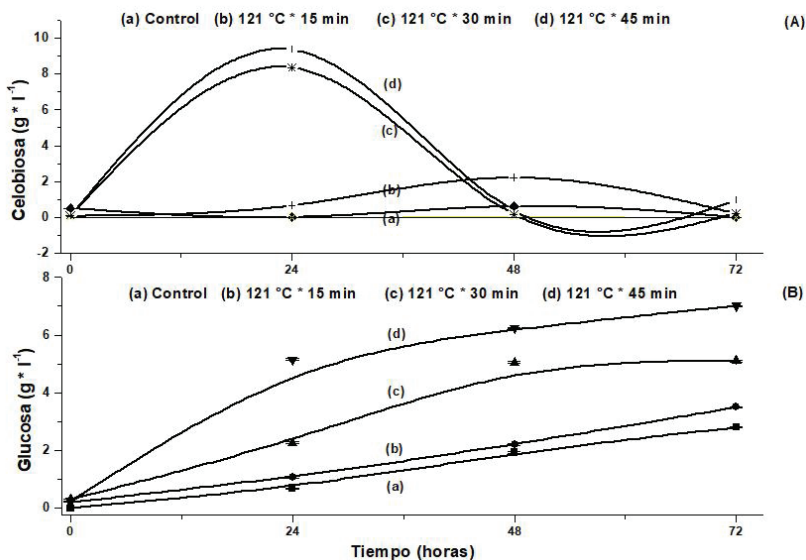
Los estudios de hidrólisis enzimática de celulosa pura (Avicel PH101, 102 y 105)

reportan una conversión del 38,5 % de celulosa en glucosa usando β -glucosidasa producida por *Neurospora crassa* (Lebaz et al., 2016; Wu et al., 2013), y 78,9 % de hidrólisis de celulosa a celobiosa y glucosa utilizando Celluclast 1,5 l producido por *Trichoderma reesei* (Ouyang et al., 2010).

En los experimentos donde se aplicó el pretratamiento hidrotérmico se logró obtener mayores concentraciones de celobiosa, lo que indica que solo fue posible hinchar la celulosa, pero no hidrolizarla. A continuación, la Figura 5 muestra las concentraciones de celobiosa y glucosa obtenidas.

Figura 5

Formación de celobiosa y glucosa durante la hidrólisis enzimática de muestras pretratadas hidrotérmicamente



El pretratamiento hidrotérmico (121 °C × 45 min) como pretratamiento de ablandamiento de celulosa produjo una mayor concentración de celobiosa y una menor cantidad de glucosa después de 24 horas de hidrólisis enzimática; mientras que un tiempo de pretratamiento hidrotérmico más corto (121 °C × 15 min), menor concentración de celobiosa y glucosa, lo que indica que el pretratamiento hidrotérmico incrementa la hidrólisis enzimática parcial de celulosa a celobiosa. El 34,62 % de la celulosa fue parcialmente hidrolizada a celobiosa y el 18,42 % a glucosa, obteniéndose el 51,89 % de la hidrólisis total de la celulosa presente en el arroz. En estudios sobre hidrólisis enzimática de biomasa celulósica utilizando β -glucosidasa, fue posible conseguir porcentajes importantes de hidrólisis parcial (Lebaz et al., 2016; Parisutham

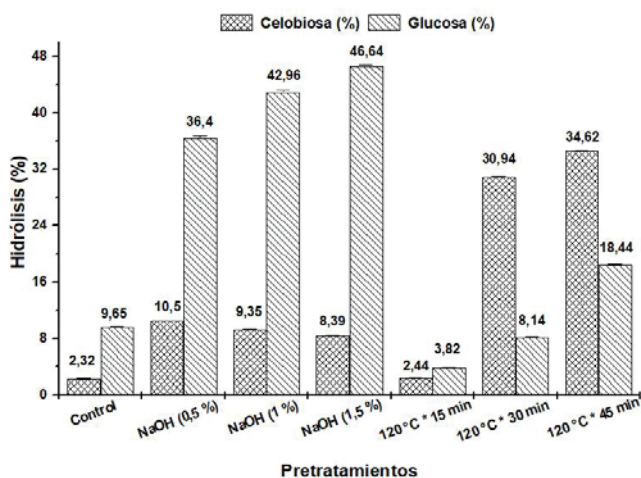
et al., 2017).

Porcentajes de hidrólisis del algodón a celobiosa y glucosa

La hidrólisis total de la celulosa ha sido una característica clave de la despolimerización de la biomasa celulósica, debido a la recalcitrancia y cristalinidad de la celulosa, lo que limita el uso de enzimas hidrolíticas (celodextrinasa, celobiohidrolasa y β-glucosidasa). A continuación, en la Figura 6 se muestran los porcentajes de hidrólisis parcial de celulosa para obtener celobiosa y glucosa a partir de cáscara de arroz molida ($\leq 250 \mu\text{m}$).

Figura 6

Porcentajes de bioconversiones de celulosa a celobiosa y glucosa



La bioconversión de celulosa a celobiosa en los pretratamientos hidrotermales ($121 \text{ }^\circ\text{C} \times 45 \text{ min}$) fue del 34,62 % en 24 horas de hidrólisis enzimática y la conversión de celulosa a glucosa fue del 18,64 %; mientras que en las muestras pretratadas con hidróxido de sodio al 0,5 %, la concentración de celobiosa fue del 10,5 % en 48 horas de hidrólisis enzimática, lo que indica que a mayor concentración de álcali, mayor será la hidrólisis total de la celulosa. Estudios de hidrólisis enzimática de algodón blanco molido aplicando Celluclast y Cellic® CTec2 han logrado convertir el 32 % de la celulosa en celobiosa después de 48 horas de hidrólisis enzimática (Austad, 2018).

CONCLUSIÓN

El análisis FTIR demostró que la aplicación de pretratamientos alcalinos con NaOH para

despolimerizar la lignina presente en la cáscara de arroz molida ($\leq 250 \mu\text{m}$) provocan un mayor ablandamiento y degradación selectiva de la lignina y, por lo tanto, también afectan la cristalinidad de la celulosa; esto se observa por un mayor porcentaje de hidrólisis completa de celulosa a glucosa.

La aplicación del pretratamiento hidrotermal a la cáscara de arroz molida genera la hidrólisis parcial de la celulosa a celobiosa, lo que se evidencia por la mayor producción de celobiosa y menor concentración de glucosa. La producción de celobiosa es 1,89 veces mayor que la de glucosa en el pretratamiento hidrotermal y en el pretratamiento alcalino la producción de glucosa es 13,75 veces mayor que la de celobiosa.

AGRADECIMIENTOS

Los autores pertenecientes al grupo BIOENGIN agradecen a la Universidad Técnica de Machala por su apoyo académico y económico.

DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

DECLARACIÓN DE CONTRIBUCIÓN A LA AUTORÍA

Humberto Ayala Armijos: conceptualización, adquisición de fondos. **Nicole Romero Calle:** *data curation*, recursos. **Braulio Madrid Celi:** investigación, redacción: revisión y edición. **Ramiro Quezada Sarmiento:** visualización, *software*. **Edgar Tinoco Gálvez:** administración de proyecto. **Richard Chávez Abad:** supervisión.

REFERENCIAS

- Adler, A., Kumaniaev, I., Karacic, A., Baddigam, K., Hanes, R., Subbotina, E., Bartling, A., Huertas-Alonso, A., Moreno, A., Håkansson, H., Mathew, A., Beckham, G., & Samec, J. (2022). Lignin-first biorefining of Nordic poplar to produce cellulose fibers could displace cotton production on agricultural lands. *Joule*, 6(8), 1845-1858. <https://doi.org/10.1016/j.joule.2022.06.021>
- Austad, A. (2018). *Enzymatic conversion of cotton textiles* [Tesis de posgrado no publicada]. Norwegian University of Life Sciences. <https://nmbu.brage.unit.no/nmbu-xmlui/bitstream/handle/11250/2567315/Austad2018.pdf>
- Ávila, P., Silva, M., Martins, M., & Goldbeck, R. (2021). Cello-oligosaccharides production from lignocellulosic biomass and their emerging prebiotic applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37, 73 <https://doi.org/10.1007/>

s11274-021-03041-2

- Chen, P., Shrotri, A., & Fukuoka, A. (2021). Synthesis of cello-oligosaccharides by depolymerization of cellulose: A review. *Applied Catalysis A: General*, 621. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2021.118177>
- De Oliveira, J., Bruni, G., Oliveira, K., Mello, S., Silveira, G., Guerra, A., & Da Rosa, E. (2017). Cellulose fibers extracted from rice and oat husks and their application in hydrogel. *Food Chemistry*, 221, 153-160. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.048>
- Eliche-Quesada, D., Felipe-Sesé, M., López-Pérez, J., & Infantes-Molina, A. (2017). Characterization and evaluation of rice husk ash and wood ash in sustainable clay matrix bricks. *Ceramics International*, 43(1), 463-475. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.09.181>
- Huang, G., Peng, W., Yang, S., & Yang, C. (2018). Delignification kinetic modeling of NH₄OH-KOH-AQ pulping for bagasse. *Industrial Crops and Products*, 123, 740-745. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.040>
- Iftikhar, M., Asghar, A., Ramzan, N., Sajjadi, B., & Chen, W. (2019). Biomass densification: Effect of cow dung on the physicochemical properties of wheat straw and rice husk based biomass pellets. *Biomass and Bioenergy*, 122, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.01.005>
- Kim, D., Park, H., Jung, Y., Sukyai, P., & Kim, H. (2019). Pretreatment and enzymatic saccharification of oak at high solids loadings to obtain high titers and high yields of sugars. *Bioresource Technology*, 284, 391-397. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.134>
- Kumar, J., Saini, R., & Tewari, L. (2015). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: Concepts and recent developments. *3 Biotech*, 5, 337-353. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0246-5>
- Kumar, P., Barrett, D., Delwiche, M., & Stroeve, P. (2009). Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48(8), 3713-3729. <https://doi.org/10.1021/ie801542g>
- Lebaz, N., Cockx, A., Spérandio, M., Liné, A., & Morchain, J. (2016). Application of the Direct Quadrature Method of Moments for the modelling of the enzymatic hydrolysis of cellulose: II. Case of insoluble substrate. *Chemical Engineering Science*, 149, 322-333. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2016.04.029>
- Li, J., Li, S., Fan, C., & Yan, Z. (2012). The mechanism of poly (ethylene glycol) 4000 effect

- on enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 89, 203-210. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.019>
- Méndez-Líter, J., Gil-Muñoz, J., Nieto-Domínguez, M., Barriuso, J., De Eugenio, L., & Martínez, M. (2017). A novel, highly efficient β -glucosidase with a cellulose-binding domain: Characterization and properties of native and recombinant proteins. *Biotechnology for Biofuels*, 10, 1-15. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0946-2>
- Naqvi, S., Uemura, Y., & Yusup, S. (2014). Catalytic pyrolysis of paddy husk in a drop type pyrolyzer for bio-oil production: The role of temperature and catalyst. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 106, 57-62. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2013.12.009>
- New, E., Wu, T.Y., Tien, C., Poon, Z., Loow, Y., Wei, L., Procentese, A., Siow, L., Teoh, W., Nik Daud, N., Jahim, J., & Mohammad, A. (2019). Potential use of pure and diluted choline chloride-based deep eutectic solvent in delignification of oil palm fronds. *Process Safety and Environmental Protection*, 123, 190-198. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.11.015>
- Ouyang, J., Dong, Z., Song, X., Lee, X., Chen, M., & Yong, Q. (2010). Improved enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose (Avicel PH101) by polyethylene glycol addition. *Bioresource Technology*, 101(17), 6685-6691. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.085>
- Parisutham, V., Chandran, S., Mukhopadhyay, A., Lee, S., & Keasling, J. (2017). Intracellular cellobiose metabolism and its applications in lignocellulose-based biorefineries. *Bioresource Technology*, 239, 496-506. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.001>
- Rabek, J. (1980). *Experimental methods in polymer chemistry: Physical principles and applications*. John Wiley & Sons Ltd.
- Resch, M., Baker, J., & Decker, S. (2015). *Low solids enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. National Renewable Energy Laboratory. <https://www.nrel.gov/docs/fy15osti/63351.pdf>
- Siccama, J., Oudejans, R., Zhang, L., Kabel, M., & Schutyser, M. (2022). Steering the formation of cellobiose and oligosaccharides during enzymatic hydrolysis of asparagus fibre. *LWT*, 160, artículo 113273 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113273>
- Silva, G., Couturier, M., Berrin, J.-G., Buléon, A., & Rouau, X. (2012). Effects of grinding processes on enzymatic degradation of wheat straw. *Bioresource Technology*, 103(1), 192-200. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.073>
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. (2012).

Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP). National Renewable Energy Laboratory. <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf>

- Soltani, N., Bahrami, A., Pech-Canul, M., & González, L. (2015). Review on the physicochemical treatments of rice husk for production of advanced materials. *Chemical Engineering Journal*, 264, 899-935. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.11.056>
- Wu, J., Wu, Y., Yang, F., Tang, C., Huang, Q., & Zhang, J. (2019). Impact of delignification on morphological, optical and mechanical properties of transparent wood. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 117, 324-331. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2018.12.004>
- Wu, W., Hildebrand, A., Kasuga, T., Xiong, X., & Fan, Z. (2013). Direct cellobiose production from cellulose using sextuple beta-glucosidase gene deletion *Neurospora crassa* mutants. *Enzyme and Microbial Technology*, 52(3), 184-189. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2012.12.010>
- Yaddanapudi, H., Hickerson, N., Saini, S., & Tiwari, A. (2017). Fabrication and characterization of transparent wood for next generation smart building applications. *Vacuum*, 146, 649-654. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2017.01.016>
- Yu, Y., Zeng, Y., Zuo, J., Ma, F., Yang, X., Zhang, X., & Wang, Y. (2013). Improving the conversion of biomass in catalytic fast pyrolysis via white-rot fungal pretreatment. *Bioresource Technology*, 134, 198-203. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.167>