

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



**PRODUCCIÓN DE XILOOLIGOSACÁRIDOS (XOS) A PARTIR DE
CÁSCARA DE ARROZ**

Tesis presentada por el bachiller:

Corrales Centeno Astrid

Para optar el Título Profesional de

Ingeniera Biotecnóloga

Asesor:

PhD. Terán Hilares, Ruly

Arequipa – Perú

2023

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 24 de Agosto del 2023

Dictamen: 006618-C-EPIB-2023

Visto el borrador del expediente 006618, presentado por:

2012802352 - CORRALES CENTENO ASTRID

Titulado:

PRODUCCION DE XILOOLIGOSACARIDOS(XOS) A PARTIR DE CASCARA DE ARROZ

Nuestro dictamen es:

APROBADO

**29440909 - MOLINA RODRIGUEZ FREDY NICOLAS
DICTAMINADOR**



**41404327 - BARREDA DEL CARPIO JAIME ERNESTO
DICTAMINADOR**



**47604629 - TEJADA MEZA KEVIN
DICTAMINADOR**



PRODUCCIÓN DE XILOOLIGOSACÁRIDOS (XOS) A PARTIR DE CÁSCARA DE ARROZ

INFORME DE ORIGINALIDAD

8%

INDICE DE SIMILITUD

8%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	2%
2	repositorio.utp.edu.pe Fuente de Internet	2%
3	www.frontiersin.org Fuente de Internet	1%
4	Astrid Corrales Centeno, Salvador Sanchez Muñoz, Igor Severo Gonçalves, Fabio Patricio Sanchez Vera et al. "Valorization of rice husk by hydrothermal processing to obtain valuable bioproducts: xylooligosaccharides and Monascus biopigment", Carbohydrate Polymer Technologies and Applications, 2023 Publicación	1%
5	www.mdpi.com Fuente de Internet	1%
6	es.scribd.com Fuente de Internet	1%



Excluir citas

Apagado

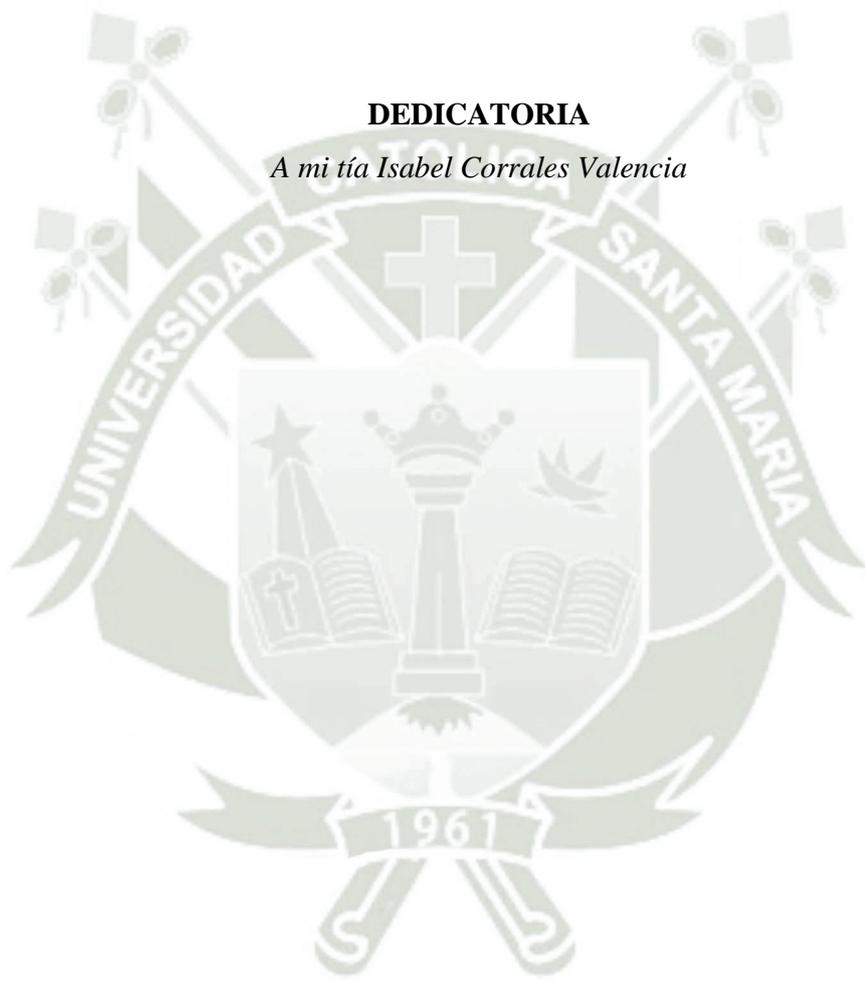
Excluir coincidencias < 1%

Excluir bibliografía

Apagado

DEDICATORIA

A mi tía Isabel Corrales Valencia



AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Católica de Santa María y al proyecto interno N° 7797-CU-2021 “*Identificación de potenciales residuos agroindustriales para la producción de prebióticos (XOS- xilooligosacáridos), alternativas de procesamiento y purificación con tecnología de membranas*” por darme la oportunidad de ser tesista. Además, agradezco al Dr. Ruly Terán Hilares por su paciencia, dedicación y apoyo en el desarrollo de mi tesis. Igualmente, mi total agradecimiento a Ximena Rosado, quien me informó y animó a postular como tesista de este proyecto.



INDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
HIPÓTESIS	4
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
TABLA DE VARIABLES E INDICADORES	5
CAPÍTULO I	6
1. MARCO TEÓRICO	6
1.1. EL ARROZ Y SU PRODUCCIÓN	6
1.2. GENERACIÓN DE RESIDUOS	8
1.2.1. Aplicación de la cascarilla de arroz como materia prima.	9
1.3. BIOMASA LIGNOCELULÓSICA	10
1.3.1. Lignina	11
1.3.2. Celulosa	11
1.3.3. Hemicelulosa	12
1.4. XOS Y SUS PROPIEDADES	12
1.4.1. Producción de XOS	13
1.5. MÉTODOS DE PRETRATAMIENTOS DE LA BIOMASA LIGNOCELULOSICA	14
1.5.1. Pretratamiento hidrotérmico	15
1.5.2. Pretratamiento ácido y alcalino	16
1.5.3. Hidrólisis Enzimática	18
1.5.4. Purificación de XOS	18
1.5.4.1. Separación cromatográfica	19
1.5.4.2. Separación por adsorción	19
1.5.4.3. Filtración por membrana	19

1.5.4.4. Diafiltración	20
CAPÍTULO II	21
2. MATERIALES Y MÉTODOS	21
2.1. LUGAR DE EJECUCIÓN	21
2.2. MATERIALES	21
2.2.1. Material biológico	21
2.2.2. Insumos y reactivos	21
2.2.3. Materiales de laboratorio	21
2.2.4. Aparatos y equipos	22
2.2.5. Software	22
2.3. MÉTODOS	23
2.3.1. Obtención de la muestra de cascarilla de arroz.	23
2.3.2. Caracterización química de la cascarilla de arroz	23
2.3.3. Pretratamiento alcalino	23
2.3.4. Pretratamiento alcalino asistido por ultrasonido	24
2.3.5. Hidrólisis enzimática de los residuos sólidos	25
2.3.6. Extracción alcalina de la hemicelulosa	25
2.3.7. Hidrolisis hidrotérmica	26
2.3.7.1. Producción de XOS en reactores Parr no agitados	26
2.3.7.2. Producción de XOS en reactores Parr agitados	27
2.3.8. Hidrólisis enzimática de los residuos sólidos después del proceso hidrotérmico	27
2.3.9. Purificación con membranas de los extractos de XOS	28
2.3.10. Estabilidad térmica de los extractos de XOS	29
2.3.11. Análisis de XOS por HPLC	29
2.3.12. Determinación de azúcares reductores totales (DNS) y compuestos fenólicos totales	29
CAPÍTULO III	31
3. RESULTADOS Y DISCUSIONES	31

3.1. Caracterización de cascarilla de arroz	31
3.1.1. Tratamiento alcalino y alcalino asistido con ultrasonido como pretratamiento de la cascarilla de arroz.	32
3.1.2. Tratamiento alcalino de la cascarilla de arroz	32
3.1.3. Tratamiento alcalino asistido con US de la cascarilla de arroz	33
3.2. Extracción alcalina de hemicelulosa de la cascarilla de arroz.	36
3.3. Proceso hidrotérmico de la cascarilla de arroz para producción de XOS.	40
3.3.1. Producción de XOS con reactor Parr no agitado	40
3.4. Purificación de los extractos de XOS (X2-X4) con membranas poliméricas	42
3.4.1. Producción de XOS en reactor Parr agitado.	43
3.5. Purificación de los extractos de XOS (X2-X6) con membranas poliméricas	45
3.6. Estabilidad térmica de los XOS (X2-X4) presente en los extractos	46
CONCLUSIONES	49
RECOMENDACIONES	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXOS	58

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cuadro de Variables e Indicadores.	5
Tabla 2. Cantidad de celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas reportados en la literatura científica para la cascarilla de arroz.	10
Tabla 3. Métodos de pretratamiento para la extracción de material lignocelulósico.	15
Tabla 4. Tratamiento hidrotérmico aplicado en material lignocelulósica.	16
Tabla 5. Pretratamiento alcalino y su acoplamiento a ultrasonido y cavitación hidrodinámica para obtención de XOS.	17
Tabla 6. Métodos de purificación de XOS.	20
Tabla 7. Resumen de condiciones de hidrólisis hidrotérmico en reactores Parr no agitados.	26
Tabla 8. Composición de la cascarilla de arroz.	31
Tabla 9. Porcentaje de remoción de Lignina, ceniza y carbohidratos variando el tiempo (h) y la concentración de NaOH (M).	32
Tabla 10. Concentración de azúcares totales (glucosa + xilosa) en el hidrolizado enzimático del material pretratado en medio alcalino asistido con ultrasonido, conforme el diseño Box-Behnken.	34
Tabla 11. Análisis ANOVA del diseño experimental de obtención XOS con tratamiento alcalino asistida con US.	34
Tabla 12. Diseño experimental de extracción de hemicelulosa a partir de la cascarilla de arroz.	37
Tabla 13. Resultados ANOVA del diseño experimental de extracción de hemicelulosa de la cascarilla de arroz.	38
Tabla 14. Sugerencia de modelo matemático de acuerdo con los resultados ingresados al Software DX.	62
Tabla 15. Análisis ANOVA del diseño experimental de la hidrolisis alcalina asistida con US.	62
Tabla 16. Sugerencia de modelo matemático de acuerdo con resultados obtenido del Software DX.	64
Tabla 17. Resultados del análisis ANOVA de la extracción alcalina de hemicelulosa obtenida del Software DX.	64
Tabla 18. Concentración de compuestos fenólicos retenidos de la purificación de XOS por filtración.	66
Tabla 19. Estabilización térmica en la producción de XOS.	67

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de producción de arroz blanco.....	7
Figura 2. Producción promedio en porcentaje por departamento del año 2020.	7
Figura 3. Cantidad de producción de arroz en los departamentos de Perú entre los años 2015-2020.....	8
Figura 4. Estructura esquemática de xilosa y xilo-oligosacáridos.....	13
Figura 5. Pretratamientos de los Residuos Lignocelulósicos para producción de XOS.....	14
Figura 6. Esquematzación del pretratamiento alcalino asistido por ultrasonido de la cascarilla de arroz.....	24
Figura 7. Esquematzación del proceso de la extracción alcalina de hemicelulosa a partir de la cascarilla de arroz.	26
Figura 8. Esquematzación del proceso de producción de XOS en reactor Parr no agitado. .	27
Figura 9. Esquematzación del proceso de producción de XOS en reactor Parr agitado.	27
Figura 10. Ultra y nanofiltración del material hidrolizado para la purificación de XOS.	28
Figura 11. Superficie de respuesta para la variable “contenido de azúcar” en función de la interacción de 2 variables. A) tiempo vs concentración de NaOH, B) Potencia de ultrasonido vs Concentración de NaOH y C) Tiempo vs potencia de ultrasonido.	35
Figura 12. Grafica de valores predichos por el Software DX vs los valores reales.....	36
Figura 13. Superficie de respuesta para la variable “extracción de hemicelulosa” en función de la interacción de 2 variables. A) temperatura vs concentración de NaOH, B) tiempo vs Concentración de NaOH y C) Tiempo vs temperatura.....	39
Figura 14. Grafica de los puntos experimentales y la predicción del software DX de la extracción de hemicelulosa de la cascarilla de arroz.	39
Figura 15. Concentración de XOS a diferentes temperaturas y tiempos de proceso en reactor Parr no agitado.....	40
Figura 16. Cambio de características visuales de la cascarilla de arroz sometida a hidrólisis térmica en el reactor Parr sin agitación.....	41
Figura 17. Concentración de XOS recuperado de la hidrolisis térmica en reactor Parr de las etapas de ultra y nano filtración con membranas.....	42
Figura 18. Xilooligosacáridos (XOS) producidos a partir de cascarilla de arroz en desarrollo de proceso hidrotermal en reactor agitado.	43
Figura 19. Arabinosa e inhibidores producidos en hidrólisis hidrotermal – reactor agitado..	45
Figura 20. Concentración de XOS recuperado de la hidrólisis térmica en reactor con agitación de las etapas de ultra y nanofiltración con membranas poliméricas.	46

Figura 21. Estabilización térmica por pasteurización de los XOS obtenidos.	47
Figura 22. Estabilidad térmica de XOS en temperaturas de: A) pasteurización rápida (73°C x 15 min) y B) esterilización (121°C x 15 min.).	47
Figura 23. Retención de compuestos Fenólicos mediante un Cartucho.	48
Figura 24. Muestra de cascarilla de arroz seca.	59
Figura 25. Cascarilla de arroz con pretratamiento, molido y seco.	59
Figura 26. Pretratamiento ácido de la cascarilla de arroz.	59
Figura 27. Experimentos de extracción alcalina para extracción de hemicelulosa.	60
Figura 28. Muestra de cascarilla de arroz para hidrolisis térmica en reactor Parr.....	60
Figura 29. Hidrolisis térmica en reactor Parr no agitado.	60
Figura 30. Hidrolisis térmica en reactor Parr de 2L con agitación.	61
Figura 31. Purificación de XOS por ultra y nano filtración por membranas.....	61
Figura 32. Graficas de interacción de variables (A) Concentración de NaOH, (B) Tiempo y (C) Potencia de US tomados del Software DX con la caracterización de la Xilosa	63
Figura 33. Representación 2D de la superficie de respuesta entre variables. (A) Tiempo vs Concentración. (B) Potencia vs Concentración. (C) Potencia vs Tiempo.	63
Figura 34. Representación gráfica en 2D de la superficie de respuesta de la extracción alcalina de hemicelulosa (A) Temperatura vs Concentración NaOH. (B) Tiempo vs Concentración de NaOH. (C) Tiempo vs Temperatura.	65
Figura 35. Interacción de variables. (A) Temperatura vs Concentración NaOH. (B) Tiempo vs Concentración NaOH. (C) Tiempo vs Temperatura.	65

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Galería fotográfica de los experimentos realizados para la obtención de XOS.....	58
Anexo 2. Resultados del ANOVA de la hidrolisis alcalina asistida con US obtenida del Software Design Expert.....	62
Anexo 3. Resultados del análisis ANOVA de la extracción alcalina de hemicelulosa de la cascarilla de arroz tomado del Software DX.	64
Anexo 4. Retención de Compuestos fenólicos y Estabilización térmica de la purificación de XOS.....	66



RESUMEN

El arroz es uno de los cereales más consumidos a nivel mundial y nacional, por su valor nutricional. Sin embargo, su producción genera una gran cantidad de residuos, como tallos y cáscaras que no cuentan con una disposición final adecuada. Por lo tanto, con el fin de valorizar este importante residuo agroindustrial, este trabajo propone valorizar la fracción de hemicelulosa en xilooligosacaridos (XOS) que corresponden a prebióticos, los cuales pueden utilizarse en la industria de alimentos. Inicialmente, fue necesario coleccionar muestra de cascarilla de arroz, la cual fue caracterizada y los resultados muestran que la cascarilla de arroz contiene aproximadamente 35% de glucano, 14% de xilano, 2% de arabinosil y 23% de lignina, que corresponde a más del 50% de carbohidratos. Posterior a la caracterización, se realizó el pretratamiento alcalino, observándose que a tiempos prolongados y concentraciones elevadas de NaOH se puede lograr la remoción de lignina, permitiendo un incremento en la cantidad de azúcar liberado de la fracción carbohidrato por acción enzimática. El proceso alcalino, también fue sometido a ultrasonido buscando incrementar la eficiencia del pretratamiento, obteniéndose 10.79 g de azúcar (glucosa + xilosa) /100 g de material pretratado por hidrólisis enzimática utilizando el material sometido a las condiciones de pretratamiento de 0.5 M de NaOH, 60 min y 75W. La cascarilla de arroz también fue sometido a procesos alcalinos severos a fin de solubilizar la hemicelulosa, obteniéndose 301.3 mg de hemicelulosa /g biomasa a una concentración de NaOH de 1 M, 120°C de temperatura y un tiempo de 90 min. Finalmente, la cascarilla de arroz se sometido a hidrólisis hidrotérmica a fin de XOS, donde temperaturas de 180 y 190 °C promovieron su producción, consiguiendo la mayor producción bajo condiciones de 180°C por 68 min y 190°C por 34 min, las que permitieron una producción de XOS (X2-X4) mayores a 3g/L. Resultados similares de producción de XOS fueron obtenidos en reactores Parr agitados. Los extractos fueron purificados con membranas aplicando ultra y nano filtración en una etapa posterior, obteniéndose 6.47 g/L de XOS, con bajo contenido de fenólicos (0.08 g/L). Por lo tanto, esta tesis exploró diversas opciones tecnológicas para la valorización de la cascarilla de arroz, material poco valorizado, de las que se recomienda evaluar su potencialidad.

Palabras clave: Xilooligosacaridos, cascarilla de arroz, termo hidrolisis, purificación, membranas.

ABSTRACT

Rice is one of the most consumed cereals worldwide and nationally, due to its nutritional value. However, its production generates a large amount of waste, such as stems and shells that do not have an adequate final disposal. Therefore, in order to value this important agro-industrial residue, this work proposes to value the fraction of hemicellulose into xylooligosaccharides (XOS) that correspond to prebiotics, which can be used in the food industry. Initially, it was necessary to collect a sample of rice husk, which was characterized, and the results show that rice husk contains approximately 35% glucan, 14% xylan, 2% arabinosyl and 23% lignin, which corresponds to more 50% carbohydrates. After the characterization, the alkaline pretreatment was carried out, observing that at long times and high NaOH concentrations, lignin removal can be achieved, allowing an increase in the amount of sugar released from the carbohydrate fraction by enzymatic action. The alkaline process was also subjected to ultrasound seeking to increase the efficiency of the pretreatment, obtaining 10.79 g of sugar (glucose + xylose) / 100 g of pretreated material by enzymatic hydrolysis using the material subjected to the pretreatment conditions of 0.5 M NaOH, 60 min and 75W. The rice husk was also subjected to severe alkaline processes in order to solubilize the hemicellulose, obtaining 301.3 mg of hemicellulose/g biomass at a NaOH concentration of 1 M, a temperature of 120°C and a time of 90 min. Finally, the rice husk was subjected to hydrothermal hydrolysis in order to XOS, where temperatures of 180 and 190 °C promoted its production, achieving the highest production under conditions of 180 °C for 68 min and 190 °C for 34 min, the that allowed a production of XOS (X2-X4) higher than 3g/L. Similar XOS production results were obtained in stirred Parr reactors. The extracts were purified with membranes applying ultra and nanofiltration in a later stage, obtaining 6.47 g/L of XOS, with low phenolic content (0.08 g/L). Therefore, this thesis explored various technological options for the recovery of rice husks, a material with little value, of which it is recommended to evaluate their potential.

Keywords: Xylooligosaccharides, rice husk, thermohydrolysis, purification, membranes

INTRODUCCIÓN

El arroz es uno de los cereales más consumidos a nivel mundial, alcanzando una producción de 496 millones de toneladas en el 2020, y con previsión de un aumento a 555 millones de toneladas para el 2035 (1). Los países asiáticos son los que conforman la lista de mayores productores de arroz, encabezado por China con una producción de 210.1 millones de toneladas métricas, seguido por India, Indonesia, Bangladesh, entre otros. Entre los 10 productores más grandes encontramos a Brasil en el 9° puesto, siendo el único de Latinoamérica con una producción anual de 11.9 millones de toneladas métricas (2). Sin embargo, en nuestro país también se produce gran cantidad de arroz en sus diferentes regiones como Piura, Lambayeque y La Libertad, alcanzando hasta 399 500 hectáreas cultivadas y una producción anual de 3.15 millones de toneladas métricas (3). Además, también es producido en la región Arequipa, representando el 9% de la producción nacional con un rendimiento aproximado de 13 toneladas por hectárea.

Como consecuencia de la producción de millones de toneladas de arroz, se generan grandes cantidades de biomasa residual, como la cascarilla de arroz y la paja, llegando a producirse anualmente 134 millones y 693308 toneladas métricas a nivel mundial y nacional respectivamente. En Perú, actualmente, el 85% de la cascarilla es quemada al aire libre o es desechada a cuerpos de agua como los ríos, dañando ecosistemas y perjudicando la salud humana y del medio ambiente. La cascarilla de arroz representa un rango de 20 a 33% del peso del arroz sin apilar (3,4). Por lo tanto, la cascarilla de arroz es un material de desecho abundantemente disponible y su composición es la siguiente: celulosa (45-50 %), lignina (25 –30 %), sílice (15 –20 %) y humedad (10 –15 %).

En los últimos años, se viene investigando la valorización de las fracciones de celulosa, hemicelulosa y lignina de los residuos agroindustriales en biomoléculas de interés como etanol celulósico, ácidos orgánicos, xilooligosacaridos (XOS), entre otros. Estos se obtienen a partir del Xilano, presente en la fracción de hemicelulosa, el cual tiene un valor en el mercado debido a su efecto prebiótico en humanos y animales, además de presentar diversos beneficios para la salud. (5). La obtención de XOS a partir de este tipo de biomasa lignocelulósica requiere de un proceso en el que se destacan las etapas de pretratamiento e hidrólisis de la fracción de hemicelulosa, de las cuales, los tratamientos químicos e hidrotermales son los más citados para la producción de XOS. El tratamiento hidrotermal, es uno de los más utilizado frente a otros métodos, ya que es considerado eco-amigable por la utilización de agua como solvente de extracción obteniendo cantidades más significativas de XOS con un bajo grado de

polimerización sin necesidad de realizar algún pretratamiento, volviéndolo apto para aplicaciones probióticas (6).

El objetivo de esta investigación fue evaluar la producción de XOS a partir de la cascarilla de arroz mediante procesos de auto hidrólisis y purificación utilizando membranas poliméricas de ultra y nanofiltración.

HIPÓTESIS

La cascarilla de arroz presenta un elevado contenido de carbohidratos que pueden ser valorizados en productos relevantes, entre ellos la fracción de hemicelulosa en xilooligosacáridos (XOS) probióticos emergentes; por lo tanto, diversas estrategias de procesamiento son necesarios, siendo que el proceso hidrotérmico controlado puede permitir una elevada hidrólisis de la hemicelulosa en oligómeros de bajo peso molecular (X2-X4), este proceso combinado con membranas permite obtener productos con alto grado de pureza mayores a 80% idóneos para su aplicación en alimentos.

OBJETIVO GENERAL

Identificar los aspectos técnicos idóneos en la etapa de pretratamiento, hidrólisis de la fracción de hemicelulosa y purificación por membranas de xilooligosacáridos (XOS) obtenidos de la cascarilla de arroz.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el contenido de lignina, cenizas y carbohidratos en los residuos de arroz, obtenidos en la ciudad de Camaná- Arequipa.
- Evaluar las condiciones de tratamiento alcalino y alcalino asistido con ultrasonido como pretratamiento de la cascarilla de arroz.
- Evaluar la extracción alcalina de hemicelulosa a partir de cascarilla de arroz.
- Evaluar el proceso hidrotérmico de la cascarilla de arroz para la producción de XOS.
- Purificar los extractos obtenidos en el proceso hidrotérmico a través de membranas poliméricas y evaluar la estabilidad térmica de los extractos.

TABLA DE VARIABLES E INDICADORES

A continuación, se muestra el cuadro con las variables dependientes e independientes, considerando solo las etapas donde se evaluó la influencia de variables.

Tabla 1. Cuadro de Variables e Indicadores.

ETAPAS	INDEPENDIENTES		DEPENDIENTES	
	Variable	Indicador	Variable	Indicador
Tratamiento alcalino	- Concentración de NaOH. - Tiempo	- M - min	- Contenido de carbohidratos. - Contenido de lignina	%
Pretratamiento alcalino asistido con ultrasonido	- Concentración de NaOH. - Tiempo - Potencia	- M - min - W	- Remoción de Lignina. - Digestibilidad enzimática de la fracción de carbohidratos.	%
Extracción alcalina de hemicelulosa	- Concentración de NaOH. - Temperatura - Tiempo	- M - °C - min	Cantidad de hemicelulosa	%
Hidrólisis hidrotérmica de hemicelulosa en XOS	- Concentración de enzima. - Tiempo de hidrólisis. - Temperatura	- mg/g de biomasa - H - °C	Concentración total de XOS	mg/g de sólido
Estabilidad térmica de XOS	- Tiempo - Temperatura	- min - °C	Concentración de XOS	%

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. EL ARROZ Y SU PRODUCCIÓN

El arroz es la semilla de la planta *Oryza sativa* o de *Oryza glaberrima*, considerada como el segundo cereal más consumido y producido a nivel mundial, después del maíz (7). El arroz es uno de los pocos comestibles que puede ser sembrado en condiciones de inundación y tipos de suelo como salinos, alcalinos y ácido-azufrados. Bajo estas condiciones, el arroz es producido en más de cien países, llegando a obtener 715 millones de toneladas de arroz por año (8). De las especies cultivadas, *O. sativa* es la de mayor importancia económica, ya que es cultivada ampliamente en todo el mundo, incluyendo Asia, África, América del Norte y Sur, Unión Europea, Oceanía y Centro-este de África. Por otro lado, la especie *O. glaberrima*, solo es cultivada en el oeste de los países africanos. Además de las diferencias filogenéticas entre las especies cultivadas del género *Oryza*, existen diferencias morfológicas entre ellas, como la presentación de la lígula corta, 0,40 cm y 2,09 cm, respectivamente. Además de tener aspecto rudimentario y fuerte, *O. glaberrima* también presenta menor número de ramificaciones secundarias en la panícula y las plantas mueren después de la maduración (senescencia precoz) (7,9). Solo China e India representan aproximadamente el 50% de la producción de arroz cultivado y consumido. Su producción incrementó de 439 millones en el 2010 a 496 millones de toneladas al 2020, esperando que para el 2035, su producción aumente a 555 millones de toneladas. En el Caribe y América latina, el consumo de este alimento se ha elevado en un 40% durante las dos últimas décadas.

Del proceso de producción de arroz se obtiene el arroz blanco para consumo y la cascarilla de arroz como residuo, como se muestra en la Figura 1. El arroz blanco es comercializado para el consumo humano como alimento, mientras la cascarilla de arroz puede ser utilizada para producción de biocombustible, papel, fertilizante y alimento para animales, representando este uso menos del 20%, siendo el 80% restante quemado in situ y agregado al suelo, la que es una práctica mal vista socialmente debido a la contaminación que provocaría. También se coloca como mantillo para los siguientes cultivos, sin embargo, los residuos que son incorporados al suelo se degradan muy lentamente, además, puede albergar enfermedades propias del arroz (10).

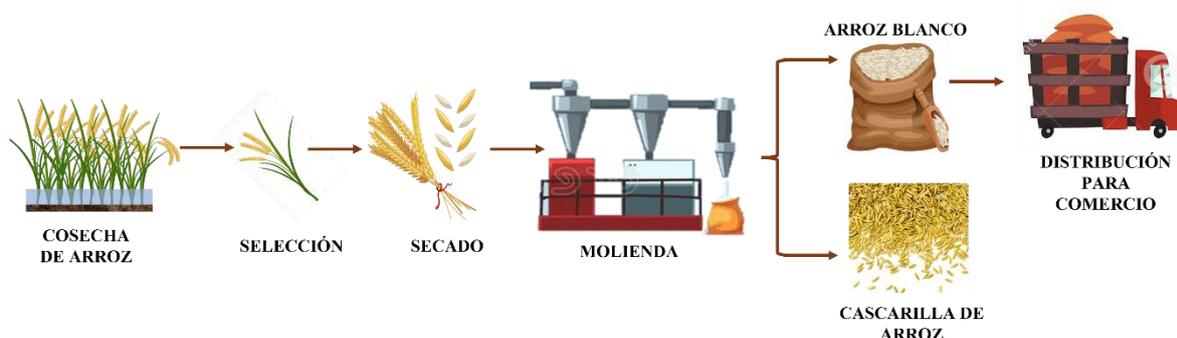


Figura 1. Proceso de producción de arroz blanco.

A nivel nacional, la producción de arroz por un periodo de 5 meses fue liderada por los departamentos de San Martín (26%), Piura (13%) y Lambayeque (12%), encontrándose el departamento de Arequipa como octavo productor, representando al 5% de la producción nacional de acuerdo con lo reportado en el Boletín N°01 del 2023 por el Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI), como se observa en la Figura 2.

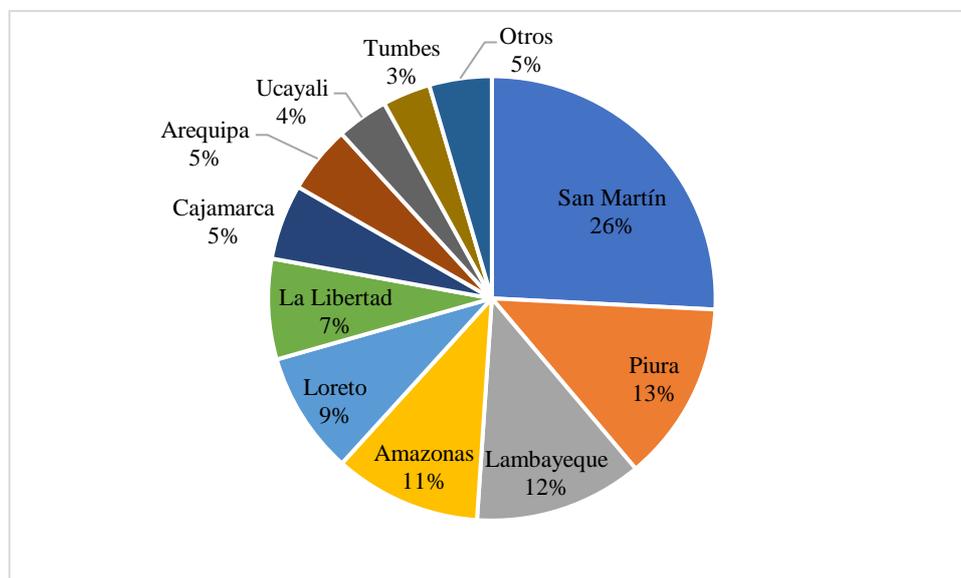


Figura 2. Producción promedio en porcentaje por departamento de cinco meses (2022-2023).

Nota: Boletín N° 01-2023 – MIDAGRI

La Figura 3, muestra los datos de producción anual por departamento de acuerdo a la información publicada en la plataforma virtual del SEIA del Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego, reportando un total de 2 978 712.92 toneladas de arroz en cascara para el año 2022, ocupando el departamento de Arequipa el quinto lugar, con una producción de 280 697.25 tn.

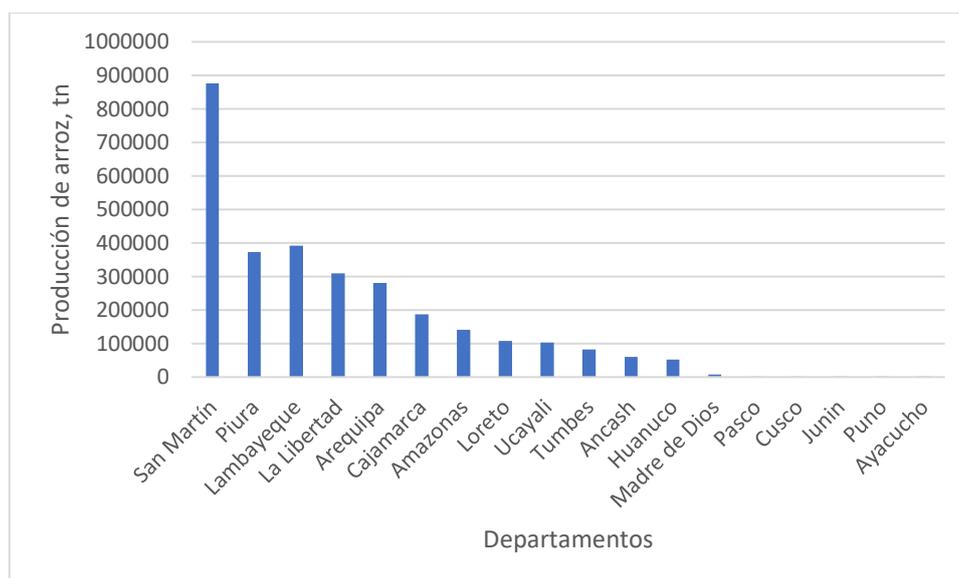


Figura 3. Cantidad de producción de arroz en los departamentos de Perú de 2022

Nota: Plataforma virtual de SEIA - MIDAGRI

1.2. GENERACIÓN DE RESIDUOS

De la producción de arroz, se generan cantidades enormes de paja y cascarilla de arroz, solo en Asia y África se tiene una producción de paja de casi de 800 mil toneladas y de cascarilla, un aproximado de 150 mil toneladas (10). Los residuos que genera la industria molinera de arroz del país van en incremento, debido a que el gobierno mediante el Ministerio de Agricultura tiene proyectos para expansión de terrenos agrícolas cada año, lo que conlleva que a largo plazo exista la posibilidad de un incremento la producción de arroz, incrementándose los residuos generados por el mismo, los cuales son calcinados, arrojados al mar, ríos, provocando una contaminación realmente considerable.

Por otro lado, nos muestra cuáles son los principales productores de arroz del Perú, siendo el más destacado el departamento de San Martín con una producción anual de arroz con cáscara de 876 835.67 toneladas métricas y el productor más bajo, el departamento de Ayacucho con una producción anual de arroz con cáscara de 12 toneladas métricas, asimismo, sitúa a nuestro departamento en el quinto lugar durante el año 2012 con una producción anual de arroz con cáscara de 241 328 toneladas métricas (11). Esta gran cantidad de producción de arroz, genera a su vez un gran volumen de residuos, los cuales pueden estar conformados por residuos de tallos, hojas y raíces que son producto del trabajo que realiza las máquinas segadoras, las que extraen el grano de arroz con cáscara; y en el proceso de pilado, el cual se realiza en los molinos arroceros generándose residuos como: la cáscara de arroz, polvillo, nielen y el arrocillo o comúnmente conocido como granillo. La cascarilla de arroz representa un promedio de 20% a

22% del peso real del arroz con cáscara, para el polvillo de 5% a 7%, para el nielen un promedio de 0,7% a 1% para el arrocillo un promedio de 1% a 2% y finalmente para el grano de arroz un promedio de 68% a 73% (12). Finalmente, el 20% de cáscara que resulta del proceso de pilado, no es utilizado y es desechado o quemado. La cáscara de arroz, rica en contenido de hemicelulosa (26%) y lignina (12%) (13), tienen funciones importantes en la salud y el bienestar ya que a partir de estos se puede obtener xilooligosacaridos o XOS (prebióticos).

1.2.1. Aplicación de la cascarilla de arroz como materia prima.

La cascarilla de arroz puede ser utilizada para diferentes aplicaciones, considerando sus propiedades físicas y químicas, como el contenido de cenizas, sílice, entre otros. Se puede utilizar como:

- Combustible industrial, generando energía térmica que se produce por combustión y gasificación, considerado como combustible de baja capacidad. Produciendo 1 MWh con 1 tonelada de cascarilla de arroz (14).
- Carbón activado, ya que contiene una gran cantidad de celulosa y lignina, por lo que puede ser utilizado como material adsorbente por la estructura microporosa que adoptaría (15).
- Fertilizante y sustrato, gracias a su alto contenido de lignina, pudiendo ser compostable de forma lenta, siendo posible su aceleración con el uso de lombrices (vermicompostaje), necesitando un promedio de cuatro meses (16).
- Fibra de alimentos para mascotas, ya que la cascarilla de arroz es un subproducto de un alimento para humanos, teniendo propiedades saludables como fibra, utilizado como relleno económico de alimento de mascotas (17).
- Sustrato para sílice y compuestos de silicio, debido a que este residuo contiene un 20% de sílice, por lo que es una buena materia prima para la fabricación de compuestos como el nitrato de silicio, zeolita, sílice y silicio puro (16).
- Ladrillos, en el que se puede utilizar un mayor porcentaje de la cascarilla haciendo al ladrillo más poroso y con mejor aislamiento térmico (18).
- Otros usos, pudiendo ser utilizado para la producción de xilitol, furfural, etanol, ácido acético, entre otros. También puede ser utilizado como limpiador, y agente pulidor en industrias metalúrgicas y mecánicas (19).

Además de los usos antes mencionados, puede ser utilizado también en la industria siderúrgica, por sus propiedades aislantes, con baja conductividad térmica, alto punto de fusión, bajo volumen, alta porosidad, siendo aplicable también en la industria de la construcción, cenizas y en el campo de la investigación (19).

La cascarilla de arroz también puede ser utilizada para la extracción de XOS, por ser una biomasa lignocelulósica compuesta por hemicelulosa, con un gran potencial comercial como ingrediente para la industria nutracéutica, dependiendo de la calidad de la materia prima y la estrategia para su producción, su purificación teniendo que evaluar sus efectos prebióticos, con gran expansión en el mercado, alcanzando valores de \$ 7.37 mil millones para el 2023. En la actualidad el mercado asiático se posiciona como el más extenso, siendo Japón el de mayor producción y consumo de XOS a escala mundial (20).

1.3. BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

La mayoría de los desechos agroindustriales están compuestos de materiales lignocelulósicos o polímeros básicos como: lignina, una estructura fenólica; celulosa, una cadena de polímero lineal formada por unidades repetitivas de celobiosa (disacárido); y hemicelulosa, un heteropolisacárido; el porcentaje de cada compuesto varía según el tipo de biomasa, aun así los rangos suelen oscilar entre el 30% y el 50% (p/p) de celulosa, el 15% y el 25% (p/p) de lignina y entre el 20% y el 40% (p/p) de hemicelulosa (21). En la Tabla 2 se puede observar las cantidades de celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas que conforman la cascarilla de arroz de acuerdo con los diversos estudios reportados en la literatura científica.

Tabla 2. Cantidad de celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas reportados en la literatura científica para la cascarilla de arroz.

Celulosa, % (p/p)	Hemicelulosa, % (p/p)	Lignina, % (p/p)	Ceniza, % (p/p)	Referencia
35	33	23	25	(22)
32	13	25		(23)
39	29	25	16	(24)
32	18	26	18	(25)
45	30	24.3	-	(26)
52	4.63	19	-	(27)

Esta biomasa es considerada como el residuo agrícola más abundante disponible en el mundo, por lo que es una materia prima prometedora para biorrefinería, teniendo un alto valor como fuente abundante de vectores energéticos útiles, compuestos químicos e ingredientes (28); pudiéndose obtener productos de valor agregado como: monosacáridos (glucosa, xilosa, manosa, fructosa, arabinosa y más), oligosacáridos (fructo- o FOS, xilo- o XOS, galacto- o GOS, galacturónico- o GALOS, lactosacarosa, etc.), biocombustibles (etanol, butanol,

dimetiléter (DME), biodiesel, hidrógeno), compuestos bioactivos (flavonoides, ácidos fenólicos, terpenos, terpenoides, carotenoides), nanocelulosa (bacteriana, relacionada con la madera), lignina y sus derivados (fuente de aromáticos a partir de biomasa y posible sustituto de la fracción aromática o BTEX producida en refinerías de petróleo) (28). Es por lo que, los oligómeros de celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina y otros polímeros relacionados con la biomasa, como la quitina, componen una clase de compuestos de valor agregado con un enorme potencial.

La cascarilla de arroz es considerada una biomasa lignocelulósica, que contiene entre un 75 a 90% de materia orgánica como la celulosa y hemicelulosa, lignina, entre otros y restos de compuestos minerales como sílice, álcalis y oligoelementos. Además, posee alto contenido de cenizas comparado con otras biomásas combustibles (19). Tanto la celulosa como la hemicelulosa son polisacáridos, siendo la primera un polímero de cadena larga que contiene monómeros exclusivos de β -glucosa y la segunda, un polímero reticulado más corto que contiene azúcares como la xilosa, galactosa, manosa, ramnosa y arabinosa. Por otro lado, la lignina tiene una estructura aromática polímero que sufre de un acoplamiento oxidativo de 4-hidroxifenilpropanoide, principalmente de alcoholes p-cumárico, coniferílico y sonapílico (10).

1.3.1. Lignina

Reconocidos por su rica variabilidad y número de grupos funcionales, los oligómeros de lignina se han aplicado múltiples veces en productos básicos, materiales avanzados y revestimientos (29). Sin embargo, su despolimerización resulta compleja de controlar hoy en día, mientras que la propia lignina es relativamente inerte como ingrediente material, lo que dificulta su inclusión en materiales novedosos. La lisis efectiva de polioles, importantes en la formulación de poliuretano, parece una aplicación prometedora de lignina, la cual representa el 15 al 40% del peso seco de la biomasa lignocelulósica. Para hacerla más reactiva, la lignina puede convertirse en fracciones de menor peso molecular mediante una variedad de rutas catalítica (ácidas, básicas, con óxidos metálicos, líquidos iónicos y enzimas) y en condiciones subcríticas y supercríticas utilizando varios disolventes. Sin embargo, estos procesos necesitan potenciarse tanto en el punto de vista técnico como económico, ya que las duras condiciones de presión y temperatura requeridos hacen inviables estas operaciones (5).

1.3.2. Celulosa

La celulosa es un biopolímero homopolisacárido de muy alto peso molecular de naturaleza refractaria (puede presentar de 90%-95% de cristalinidad), organizado en nanofibrillas de celulosa ensambladas, las cuales componen microfibrillas, que a su vez conforman ensambles

de orden superior como las microfibrillas (5). Generalmente, estas microfibrillas de celulosa están recubiertas, dentro de las regiones cristalinas, con diferentes porcentajes de matriz amorfa de lignina, hemicelulosa, proteínas, compuestos orgánicos e impurezas. Esta región amorfa es relativamente fácil de romper, lo que no se repite con la región cristalina debido a los enlaces de hidrógeno de los grupos hidroxilo presentes en ella. El dominio amorfo puede eliminarse mediante procesos mecánicos, químicos o una combinación de ambos, para la producción de materiales de valor agregado como nanofibrillas o nanocristales de celulosa, las cuales presentan un potencial en aplicaciones alimentarias; sin embargo, existen algunas limitaciones para su completa comercialización debido a su elevado coste de producción y consumo de energía, además de ciertas preocupaciones sobre los riesgos potenciales de las nanopartículas para la salud humana y medio ambiente (30). Por otro lado, la celulosa también puede utilizarse para la producción de celooligosacáridos (COS), lo cual implica su despolimerización, ya sea por hidrólisis o por vía oxidativa. Estos COS han demostrado creciente utilidad en la formulación de complementos alimenticios, pero, son menos estudiados que otros oligosacáridos debido a la naturaleza refractaria de la celulosa (5).

1.3.3. *Hemicelulosa*

La fracción de hemicelulosa en la biomasa lignocelulósica es una rica fuente de xilooligosacáridos y manooligosacáridos. Las hemicelulosas son heteropolisacáridos ramificados linealmente, con un peso molecular relativamente bajo (alrededor de 15 kDa), muy ricos en xilosa, galactosa, fructosa, glucosa y manosa. Una de las principales fracciones poliméricas de las hemicelulosas es el xilano, un polímero de xilosa unido por enlaces β -1,4-xilosídicos que se puede despolimerizar mediante operaciones ácidas, enzimáticas, mecánicas y térmicas (y algunas de sus combinaciones) a xilooligosacáridos (xilobiosa, xilotriosa, hasta xilodecaosa) o XOS. Por su lado, los manooligosacáridos pueden derivarse de mananos (tanto α - y β -mananos, de levaduras y plantas, respectivamente), glucomananos, galactomananos y glucogalactomananos, que pueden degradarse mediante una variedad de enzimas que actúan sobre los enlaces β -1,4 entre los restos glicosídicos: β -mananasas, β -manosidasas, β -glucosidasas y algunas enzimas auxiliares (α -galactosidasas y acetilmanano esterasas) (5,10).

1.4. XOS Y SUS PROPIEDADES

Los XOS son oligómeros inusuales cuyo componente principal es la xilosa unida por enlaces β 1-4. Este es producido a partir de la hidrólisis de la xilosa, la cual forma parte de los materiales lignocelulósicos, por lo que su obtención no es sencilla los cuales dependerán del tratamiento para extracción del xilano y la reacción enzimática por la xilanasas o la hidrólisis ácida del xilano. Existen algunos factores críticos para la producción de oligosacáridos como el

rendimiento, la productividad y el tipo de oligosacárido a producir. Estos a su vez dependen del tipo de enzima utilizado, su fuente de microorganismos y la estabilidad y actividad de la xilanasa a diferentes pH y temperaturas. Los XOS son oligosacáridos que son comercializados como un polvo blanco, el que contiene de 2 a 10 moléculas de xilosa como se muestra en la Figura 4.

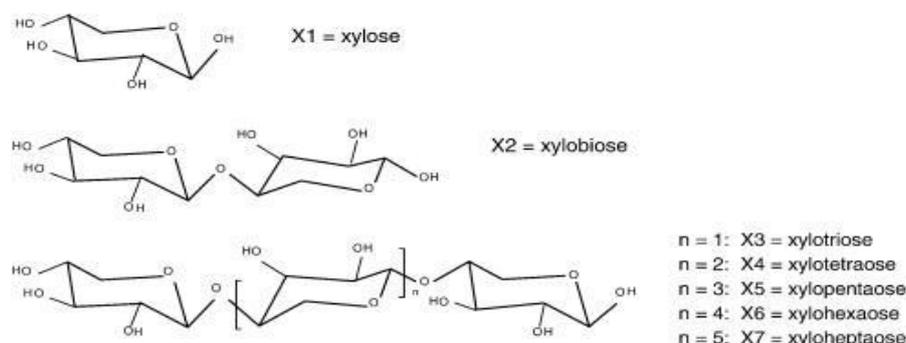


Figura 4. Estructura química de xilosa y xilo-oligosacáridos.

Nota: Tomado de Carvalho et al. (31)

La estabilidad de los XOS puede diferenciarse de acuerdo con los tipos de oligosacáridos y residuos de azúcar, enlaces, formas de anillos y la configuración anomérica. Gran parte de los oligosacáridos pueden ser hidrolizados, pero implicando una pérdida de propiedades nutricionales y fisicoquímicas a un pH < 4, cuando se trata a elevadas temperaturas o se somete a almacenamiento a las condiciones ambientales. Sin embargo, los XOS pueden ser estables a un pH de 2.5 a 8 y a temperaturas de hasta 100 °C (31).

La fuente principal de los oligosacáridos se encuentra en los reinos vegetal, animal y microbiano, siendo clasificados en dos grupos: los oligosacáridos primarios que son sintetizados *in vivo* por la glicosiltransferasa y los oligosacáridos secundarios, que se obtiene *in vitro* por hidrólisis de polisacáridos. Los primarios están disponibles a partir de la extracción directa de vegetales y animales, mientras que los secundarios se obtienen de productos hidrolizados que se extraen de la naturaleza o por fermentación (32).

1.4.1. Producción de XOS

Los factores que afectan el costo total de producción industrial de XOS incluyen la disponibilidad de diferentes materiales lignocelulósicos y su pretratamiento, las enzimas xilanólíticas y su reciclabilidad, el tipo de hidrólisis xilanólítica, el diseño del biorreactor y la purificación del producto. Estos factores deben investigarse y seleccionarse adecuadamente para garantizar la producción sostenible y limpia de XOS (19). También se debe tener en cuenta que de entre los XOS existentes, los que presentan mayor potencial prebiótico y, por tanto, un mayor atractivo comercial, son aquellos con grados de polimerización de 2 a 6 (33). Es por lo

que se realizan varios estudios evaluando diferentes estrategias de producción y purificación, con el fin de encontrar un proceso de producción que permitan obtener el mayor rendimiento de XOS con grados de polimerización del rango deseado. Generalmente, la producción de XOS a partir de biomasa lignocelulósica se ha realizado a través de dos estrategias principales: procesos de un solo paso, generalmente empleando auto-hidrólisis; y procesos que combinan dos etapas: pretratamiento, donde se pueden emplear procesos térmicos, físicos, químicos o la combinación de ellos; y tratamiento, donde generalmente se aplica hidrólisis enzimática, como se muestra en la Figura 5. Actualmente, este último enfoque de los dos pasos es la estrategia más empleada para la producción de XOS, debido a que la autohidrólisis, en el enfoque de una sola etapa, presenta desventajas como altos requerimientos energéticos y una alta producción de subproductos no deseados, los cuales elevan los costos de producción al generar dificultades en la purificación del producto final (20), sin embargo, desarrollando las estrategias más adecuadas, es posible reducir los costos.

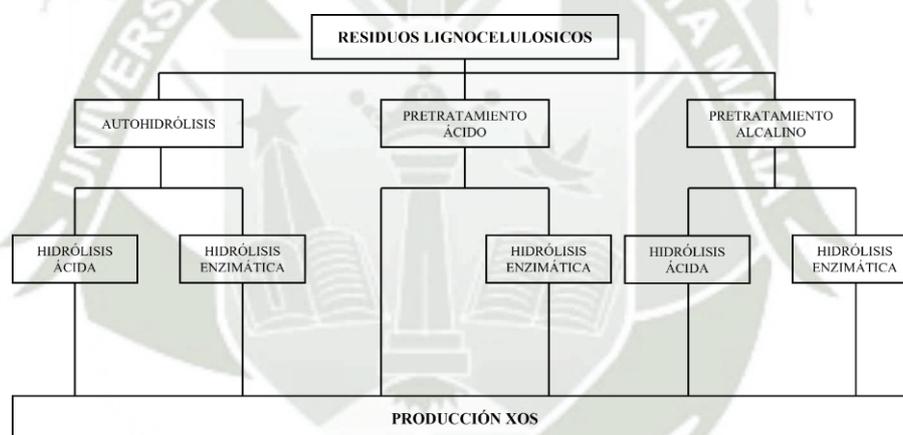


Figura 5. Pretratamientos de los Residuos Lignocelulósicos para producción de XOS.

Nota: Adaptado de Carvalho, et al. (31)

1.5. MÉTODOS DE PRETRATAMIENTOS DE LA BIOMASA LIGNOCELULOSICA

Existen diversos pretratamientos para la extracción completa de hemicelulosa, pero en general incluyen métodos térmicos y químicos. Sin embargo, la materia prima debe ser preparada mediante lavados con etanol o acetato de etilo para eliminar completamente cualquier impureza y otros compuestos como ceras y pectina; y facilitar los pasos posteriores de producción de XOS (34). Además, los alcoholes y las cetonas pueden cumplir la función de recuperación de xilano soluble o para concentrar el XOS liberado.

Los métodos actuales más utilizados para el pretratamiento son la autohidrólisis, la pre-hidrólisis ácida o alcalina, la hidrólisis enzimática y pre-hidrólisis biológica (35). En la Tabla

3 se describen los métodos de pretratamiento para la extracción del material lignocelulósico de acuerdo con estudios realizados anteriormente.

Tabla 3. Métodos de pretratamiento para la extracción de material lignocelulósico.

Métodos	Efecto	Ref.
Auto hidrólisis	Desacetilación de xilano por hidrólisis térmica de hemicelulosa para producir ácido acético. Después de la pre-hidrólisis el material lignocelulósico se puede separar en una fase soluble y líquida, la que es rica en hemicelulosa, obteniéndose productos como oligosacáridos solubles, azúcares y aldehídos. La otra fase es la sólida, la cual tiene alto contenido de celulosa y lignina que pueden ser separados para su procesamiento, pudiendo ser utilizada para producción de pulpa de celulosa y azúcares fermentables o combustibles.	(31,36, 37)
Alcalinos y ácidos	Las extracciones con ácido o alcalinos deben ser suaves para limitar la cantidad de xilosa liberada por el tratamiento ácido y evitar o reducir la corrosión y contaminación resultante que pueden causar irritaciones de vías respiratorias, congestión pulmonar, etc. El pretratamiento ácido es uno de los más usados debido al tiempo de producción reducido y rentable.	(27,31, 36)
Ultrasonido	Este es empleado para la extracción de lignina y hemicelulosa. Las partículas son sometidas a erosión superficial por colapso por cavitación o reducción de tamaño. Con el ultrasonido, se produce la cavitación en líquidos para ayudar a la creación de burbujas y también para la generación de puntos calientes. Algunos estudios sugieren que es recomendable para la intensificación de la bioconversión en condiciones de producción.	(38,39)
Biológico	Es un método poco realizado, pero es seguro y ecoamigable, estos son utilizados para la eliminación de lignina. Para esto se utilizan hongos de pudrición blanca, ya que solo degradan lignina (selectivos). Sin embargo, tiene una baja eficiencia relativa, existe una pérdida considerable de carbohidratos y es necesario un largo tiempo de resistencia	(38)

1.5.1. Pretratamiento hidrotérmico

La eficiencia de la producción de XOS depende del pretratamiento de los sustratos lignocelulósicos para hacer que las moléculas de xilano estén disponibles para las enzimas xilanolíticas, por lo tanto, la eficiencia del pretratamiento determina el rendimiento final de XOS (21). Entre los diferentes métodos de pretratamiento conocidos, tenemos el pretratamiento hidrotermal, el cual se lleva a cabo durante la autohidrólisis. Esta técnica es altamente eficiente desde el punto de vista ambiental, energético y económico, el cual utiliza altas temperaturas

que van generalmente entre 160 a 210°C en la región subcrítica del agua, este requiere una cantidad muy baja de productos químicos, pero tiene un alto consumo de energía, debido a las condiciones de temperaturas y presiones altas con las que se trabaja (40). Esta técnica se apoya en el hecho de que la hemicelulosa es vulnerable a la exposición al agua a altas temperaturas y presiones, la que penetra en las estructuras de las células vegetales, hidratando la celulosa y despolimerizando la hemicelulosa (19). Debido a que se da en el medio acuoso, ya no es necesario el lavado con etanol, además de que la materia prima presente actúa como disolvente, catalizador, precursor de catalizador o reactivo.

Este pretratamiento ha sido aplicado en diferentes especies con contenido lignocelulósico como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 4. Tratamiento hidrotérmico aplicado en material lignocelulósico.

Materia prima	Condiciones de operación	Producto Obtenido	Referencia
Biomasa de abeto (<i>P. Abiels L</i>)	200° C, 15 min, 0 – 1% de ácido sulfúrico	Azúcares de hemicelulosa	(41)
Madera dura (<i>B péndulo</i>)	210° C, 5 min	Azúcares monoméricos	(42)
Maíz	200° C, 50 min	Azúcares de hemicelulosa	(43)
Residuos de pimienta verde italiano	180° C, 40 min	Glucosa y xilosa	(44)
Tallo de Tabaco	160° C. 60 min	Azúcares de hemicelulosa	(45)
Bagazo de caña de azúcar	175° C, 30 min	XOS	(46)
Cascara de almendra	195° C, 10 min, 1% de ácido sulfúrico	Azúcares de hemicelulosa	(47)
Salvado de trigo	400° C, 0.19 s, 25 MPa	Azúcares de hemicelulosa	(48)
Poda de olivos	195° C, 10 min, 1% de ácido sulfúrico	Azúcares de hemicelulosa	(47)
Madera de haya	190° C, 10 min	Xilano	(49)

Nota: Adaptado de Scapini et al. (50)

1.5.2. Pretratamiento ácido y alcalino

- Pretratamiento ácido

Respecto al pretratamiento ácido, en este se utilizan diferentes tipos de reactivos como ácidos inorgánicos (ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido clorhídrico y ácido fosfórico) y ácidos orgánicos (ácido acético, ácido fórmico y ácido propiónico) a altas temperaturas y presiones, los cuales causan la ruptura de los enlaces glicosídicos en la cadena de hemicelulosa, y la

posterior liberación de oligosacáridos y de productos no tan deseados como monosacáridos y compuestos tóxicos (51).

- **Pretratamiento alcalino**

Este se realiza utilizando una solución alcalina suave en condiciones de temperatura y presión leves, a diferencia de la autohidrólisis y del pretratamiento ácido, los cuales emplean altas temperaturas y presiones (40). Este tipo de pretratamiento genera que el enlace de hidrógeno existente entre la celulosa y hemicelulosa se interrumpa por los iones hidroxilo de la solución alcalina (52). Para el pretratamiento oxidativo, se utilizan agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno y el ácido acético, estos oxidan las moléculas de lignina y facilitan la liberación de hemicelulosa y celulosa. También pueden ser asistidos por otros pretratamientos, como el ultrasonido, que acelera el tratamiento alcalino, ya que este necesita de mucho tiempo y una gran cantidad de álcali, volviéndolo económicamente inviables, ya que aceleramos el proceso debido a la ruptura de partículas y también al desgaste superficial del material lignocelulósico (53). Además, puede acoplarse a un sistema de cavitación hidrodinámica donde se puede hacer recircular el peróxido de hidrógeno, añadiendo al sistema placas que incrementen la presión dentro del sistema, generando la ruptura del material lignocelulósico (54). En la Tabla 5 se muestran algunas aplicaciones del tratamiento alcalino por sí solo, asistido con ultrasonido y acoplado a un sistema de filtración. Esta combinación de tratamientos se da con el fin de acelerar el proceso de ruptura del material, haciéndolo más eficiente y viable.

Tabla 5. Pretratamiento alcalino y su acoplamiento a ultrasonido y cavitación hidrodinámica para obtención de XOS.

Pretratamiento	Condición	Material	Ref.
Alcalino	Pretratamiento con álcali de <i>Aspergillus oryzae</i> , 24 h	Mazorca de maíz	(55)
	Pretratamiento con álcali y presión de vapor, 8 h	Bagazo de caña	(56)
	Pretratamiento con álcali, 60 min	Mazorca de maíz	(57)
Alcalino asistido por ultrasonido	Potencia de 400 W y frecuencias de 24 kHz, solución álcali de NaOH 0.5% (p/v)	Amapola rosa y caña	(53)
	Iones hidróxido menor a 10% (p/v) y ultrasonido	Bagazo de caña, mazorca de maíz y paja de trigo	(58)
Cavitación hidrodinámica	10 min, 0.3 mol/L de NaOH, 0.78% (v/v) de H ₂ O ₂ , 2 m ³ /h de caudal	Bagazo de caña	(54)
	, 0.78% (v/v) de H ₂ O ₂ , uso de placas de 16 orificios y 1 mm de diámetro	Bagazo de caña	(59)

1.5.3. Hidrólisis Enzimática

Después de la solubilización o extracción de la hemicelulosa a partir de biomasa lignocelulósica, los XOS pueden producirse mediante métodos químicos, hidrotermales (autohidrólisis) o enzimáticos; sin embargo, la hidrólisis enzimática es el método preferido en la producción de XOS para la industria alimentaria, ya que es amigable con el medio ambiente y no genera subproductos no deseados, lo que permite la aplicación de procedimientos más simples para la purificación final de XOS. La hidrólisis enzimática de la cadena central es producida principalmente por endo-1,4- β -xilanasas, las cuales catalizan la hidrólisis de los enlaces 1,4- β -xilosa en la cadena principal. La acción de la xilanasas se resume en eliminar los enlaces glicosídicos internos en la estructura principal del xilano, produciendo XOS en los primeros pasos y luego moléculas más pequeñas como xilotriosa, xilobiosa y xilosa. Sin embargo, cabe mencionar que este tipo de tratamiento requiere de tiempos de reacción más largos a diferencia de la hidrólisis ácida y autohidrólisis, además de ser un proceso que requiere un poco más de inversión económica debido a los altos precios de enzimas comerciales (20). Las enzimas xilanolíticas incluyen exoxilanasas, β -xilosidasas, β -endoxilanasas, y enzimas desramificantes; siendo de gran interés las endoxilanasas para la producción de XOS, ya que evitan la producción no deseada de xilosa. Las enzimas xilanolíticas pueden ser producidas por diferentes grupos microbianos como bacterias, hongos, levaduras y actinomicetos, dentro de los cuales se han estudiado más las xilanasas provenientes de bacterias y hongos. Las xilanasas comerciales se obtienen principalmente de fuentes fúngicas y, como se mencionó anteriormente, estas suelen tener un elevado costo. Como alternativa para ello, algunos investigadores optan por producir sus propias xilanasas a partir de diferentes microorganismos (silvestres y modificados genéticamente), con un gran potencial de producción (21). Otra alternativa viable y atractiva que además aumenta la eficiencia del catalizador es el uso de enzimas inmovilizadas; esta estrategia permite obtener biocatalizadores más estables que se pueden recuperar y reutilizar varias veces; asimismo, al utilizar este tipo de catalizadores inmovilizados, se obtienen productos libres de enzimas, facilitando los pasos de purificación y reduciendo los costos operativos (20).

1.5.4. Purificación de XOS

La aplicabilidad de XOS en las industrias alimentaria y farmacéutica depende de la pureza de los mismos, siendo deseable que el producto final contenga xilobiosa (X2), xilotriosa (X3), xilotetrosa (X4), xilopentosa (X5) y xilohexosa (X6). Por ello es necesario separar del producto final los oligosacáridos superiores y los azúcares monoméricos como la xilosa y glucosa, ya que estos últimos modifican el valor calórico del producto. La concentración de XOS deseada

para aplicaciones alimentarias en forma de prebióticos para consumo humano, es de 75 a 95% de pureza. Por ello se requiere de procesos de purificación eficaces para su aplicación posterior a la producción de XOS. Entre los diferentes métodos de purificación se tienen la extracción con solventes, la cual tiene una tasa de recuperación baja y no es un método ecológico; las técnicas cromatográficas, que no son económicas para la purificación a gran escala de XOS ya que poseen un alto costo; y la tecnología por filtración por membrana, la cual resulta ser más favorable desde el punto de vista industrial a comparación de los otros métodos. Esta última tecnología tiene varias ventajas dentro de las cuales se pueden resaltar su menor requerimiento energético y su escalado, el cual resulta relativamente fácil y la hace económicamente más favorable. En base a esto, la tecnología de filtración por membrana es recomendada para la producción a gran escala de XOS (60).

1.5.4.1. Separación cromatográfica

Otra alternativa es la cromatografía de filtración por gel y la adsorción en cromatografía con columnas de carbón activado. Al aplicar este tipo de tratamiento, se demostró una alta eficacia en la eliminación de moléculas muy pequeñas como monosacáridos, ácido acético y compuestos de degradación, logrando un grado de pureza de 70%, sin embargo, se obtuvo un alto grado de polimerización (5 – 40), siendo lo recomendado para el consumo un grado de 2 – 6 de pureza. Por otro lado, la adsorción por columnas de carbón activado resultó con una pureza de 71.4%, logrando una recuperación del 95% de XOS compuesta principalmente por Xilobiosa, Xilotriosa y Xilotetrosa (20).

1.5.4.2. Separación por adsorción

Se han empleado diversos materiales tensioactivos como el carbón activado, arcilla ácida, bentonita, hidróxido u óxido de aluminio, entre otros. Siendo el primero el más estudiado, demostrando que puede remover derivados de extracción, derivados de lignina y degradación de carbohidratos presentes en mezclas de XOS, con el que se puede conseguir un grado de pureza de 47.9%, con un grado de polimerización de 2 – 5. Sin embargo, los XOS obtenidos no ayudaron con el crecimiento microbiano de algunas bacterias intestinales (20).

1.5.4.3. Filtración por membrana

La filtración por membranas puede verse como un método fácil y económico para la obtención de extractos. Se pueden clasificar como micro, ultra y nano filtración. son tecnologías que son impulsadas por presión, siendo beneficiosas por su baja entrada de energía, alta eficiencia de separación, operación simple, sin uso de reactivos y es escalable. La desventaja que se presenta con este método es que no se puede separar compuestos específicos, ya que estas retiene compuestos por encima de cierto tamaño (60). La filtración por membrana para la separación

de XOS se da primero por ultrafiltración eliminando los polisacáridos y proteínas del peso molecular quedando los monosacáridos y compuestos muy pequeños para lo que se aplicó la nanofiltración, considerado como el método de purificación más utilizado (20).

Este método es de gran importancia, ya que la producción de XOS con fines de aplicación alimenticia, necesita un grado de pureza de 75 a 95%, ya que su efecto probiótico depende de esta y la presencia de impurezas incrementa el valor calórico y también modifica la dulzura (61).

Diversos investigadores han experimentado con estrategias que purifican licores crudos con el fin de obtener la mayor cantidad de XOS, estos métodos y los grados de pureza reportados se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Métodos de purificación de XOS.

Método de purificación	XOS (DP)	Pureza (%)	Referencia
Membrana de ultrafiltración 1kDa y nanofiltración 250 kDa	X2 y X3	57	(62)
Membrana de nanofiltración (600 - 800 Da)	X2	90.1	(63)
Membrana de nanofiltración 1kDa y resina de intercambio aniónico	X5 - X29	89	(64)
Cromatografía con carbón activado	X2 y X3	80	(65)
Cromatografía de filtración en gel	X3, X5 y X6	79.5, 85.6 y 81.4	(66)
Cromatografía de partición centrifuga (butanol: metanol: agua)	X2, X3, X4 y X5	95, 90, 89 y 68	(67)
Resina de intercambio iónico	X2 - X6	89.1	(68)

Nota: Tomado de Marim, et al., (69)

1.5.4.4. Diafiltración

La Diafiltración consta de la adición de un solvente (generalmente agua) a un tanque de alimentación con el fin de concentrar un producto en el lado retenido o la recuperación en el permeado. Aplicando este método, se puede lograr mejorar el rendimiento de la concentración o recuperación de XOS (70). Con esta operación se lavan o quitan los compuestos de bajo peso molecular de productos de alto valor con mayor peso molecular con la adición de un solvente (71).

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Bioprocesos (405) del Pabellón F del campus principal de la Universidad Católica de Santa María (UCSM) Arequipa – Perú.

2.2. MATERIALES

2.2.1. *Material biológico*

El material biológico utilizado fue la cascarilla de arroz, que se obtuvo de la molinera “Villa Hermosa” ubicada en la ciudad de Camaná, Arequipa – Perú.

2.2.2. *Insumos y reactivos*

Los insumos y reactivos utilizados para la realización de la parte experimental de este proyecto fueron obtenidos de MERCK S.A. enlistados a continuación:

- Ácido sulfúrico.
- Carbonato de sodio.
- Estándares de alta pureza: D-celobiosa, D(+) glucosa, D(+) xilosa, D(+) galactosa.
- Enzimas xilanolíticas (hemicelulasas).
- Enzima celulasa SAE0020.
- Hidróxido de Sodio.
- Xilobiosa.
- Tampón Citrato de sodio,
- Ácido cítrico.
- Etano 96%.
- DNS ácido 3,5 – dinitrobenzoico.
- Ácido acético (glacial).
- Estándares de XOS (xilobiosa, xilotriosa, xilotetraosa, xilopentaosa y xilohexaosa)

2.2.3. *Materiales de laboratorio*

Los materiales utilizados en los experimentos fueron:

- Matraces de 25, 50, 250 y 500 mL.
- Picetas.
- Beakers de 25, 50, 150, 250 y 600 mL.
- Tubos de ensayo.
- Crisoles.
- Baguetas.

- Gradillas.
- Probetas de 100, 250, 500 y 1000 mL.
- Fiolas de 250, 500 y 1000 mL.
- Tips de micropipetas.
- Micropipetas de 20 y 200 uL.
- Micropipetas de 1 y 5 mL.
- Cucharas y espátulas medidoras.
- Filtros.
- Pipetas de 10 y 20 mL.
- Propipetas.
- Molino manual.

2.2.4. *Aparatos y equipos*

Los equipos utilizados en la ejecución de la investigación fueron:

- Estufa Bonder BD.
- Balanza analítica Radwag AS 220 R2
- Mufla Thermo Lyne.
- Baño María WITEG.
- Autoclave WITEG.
- Sistema HPLC Thermo Scientific™ UltiMate™ 3000.
- Espectrofotómetro UV – Visible Thermo Scientific.
- Ultrasonido Daihan.
- Incubadora con agitación LBX S50L.
- Columna Cromatográfica (azúcares y XOS)
- Balanza de humedad Metler Toledo
- pHmetro OAUS.
- Cocinilla eléctrica.
- Bomba de vacío MILIPORE
- Cámara extractora de gases, fabricación nacional.

2.2.5. *Software*

Se utilizó el Software Design Expert versión 12 para la creación de diseño experimental aplicando el modelo Box Benhken, con el fin de la optimización de variables.

2.3. MÉTODOS

2.3.1. Obtención de la muestra de cascarilla de arroz.

Los residuos de arroz fueron recolectados del molino 'Villa Hermoza' ubicado en Camaná-Arequipa, para luego ser transportados al Laboratorio de Bioprocesos (405) en el pabellón F de la UCSM. Antes de su almacenamiento, se determinó la humedad del residuo usando un analizador de humedad, después fueron guardados en una bolsa de polietileno para su posterior caracterización química (celulosa, hemicelulosa y lignina).

2.3.2. Caracterización química de la cascarilla de arroz

La caracterización química de la cascarilla de arroz se realizó de acuerdo con el procedimiento establecido por la *National Renewable Energy Laboratory* (NREL), reportado por Sluiter (72). Inicialmente, el material lignocelulósico fue sometido a extracción de extractos solubles en etanol. El procedimiento se realizó utilizando el equipo de extracción Soxhlet, se pesó 1 g de material en sobres de papel filtro, añadiéndose 250 ml de etanol al 96%. El procedimiento se realizó por un periodo de 6h. Posterior a este proceso, el material libre de extractivos fue secado y utilizado en la segunda parte de la caracterización.

El material fue sometido a hidrólisis en dos etapas: en la primera se pesó 300 mg de cascarilla de arroz previamente molido y se adicionó 3 mL de ácido sulfúrico al 72 % (p/p), llevándose después a baño María por 1 h a 30°C, el mismo que se agito constantemente cada 5-10 min. La segunda etapa se dio pasado el tiempo de reacción y el contenido del tubo fue transferido a un matraz Erlenmeyer en 84 ml de agua destilada, posteriormente fue autoclavado por 1 hora a 121°C, donde ocurre la segunda hidrólisis de los carbohidratos. Todo el procedimiento se hizo por triplicado. Posterior a la hidrólisis, fue filtrado utilizando un crisol Gooch N° 3, siendo la fracción líquida recuperada para el respectivo análisis de azúcares por HPLC y lignina soluble por espectrofotometría a 240 nm, la fracción sólida fue secada y pesada, correspondiendo a la lignina insoluble. En la tercera etapa, el sólido recuperado en los crisoles Gooch N°3, fueron calcinados en una mufla por 6 horas a 500°C para la determinación de cenizas. Todos los ensayos se hicieron por triplicado. Los valores obtenidos de ceniza fueron utilizados para corregir el contenido de lignina en el material.

2.3.3. Pretratamiento alcalino

La biomasa fue sometida a un pretratamiento alcalino como pruebas preliminares utilizando diferentes concentraciones de hidróxido de sodio (0.1, 0.2 y 0.3 M), y tiempos que variaron de 1 hasta 4 h. Para esta etapa, primero se pesó 10 g de cascarilla de arroz y fue mezclada con 100 mL de hidróxido, haciendo una relación sólido/líquido de 10%. La mezcla, se llevó a agitación constante a 250 rpm, temperatura de 50°C por un periodo de 1 a 4 h. Posteriormente, se

procedió a lavar la biomasa con agua destilada, hasta retirar cualquier resto de hidróxido que pudo haber quedado, para finalmente secar la cascarilla en la estufa a 50°C por 24 h y fue pesado una vez más para conocer el porcentaje de sólido recuperado. Los residuos fueron caracterizados en sus componentes (celulosa, hemicelulosa y lignina) conforme descrito en el ítem 2.3.2. Además, se sometió a procesos de hidrólisis enzimática para evaluar la susceptibilidad de los carbohidratos del material tratado a la acción de la enzima celulasa. Los azúcares presentes en la fracción líquida fueron analizados siguiendo el método DNS reportado por Efrinalia, et al. (73).

2.3.4. Pretratamiento alcalino asistido por ultrasonido

Posteriormente para mejorar el pretratamiento alcalino se procedió a realizar un proceso asistido por ultrasonido, para ello se empleó un diseño experimental tipo Box \otimes Benhken con un total de 15 experimentos. La cascarilla de arroz fue triturada, después fue tamizada con un tamiz de acero simple, obteniendo la cascarilla molida de tamaño aproximado ($425\ \mu\text{m}$). Una vez tamizada la cascarilla, se tomaron 10 g de sólido (1:20), a la cual se le adiciono 100 ml de NaOH a diferentes molaridades (0.1, 0.3 y 0.5 M) y se sometió a diferentes potencias de sonicación (60, 75 y 90%) siendo el 100% correspondiente a 650W por diferentes periodos de tiempo (10, 35 y 60 min) de ultrasonido. El pretratamiento se esquematiza en la Figura 6. La variable respuesta en el diseño fue la concentración de azúcar liberado de los polímeros de celulosa y hemicelulosa por acción de la enzima celulasa, como se encuentra descrito en la sección 2.3.5.

Los sólidos residuales después del pretratamiento fueron lavados y secados, se determinó el porcentaje de humedad y se sometió a caracterización para ver la cantidad de celulosa, hemicelulosa y lignina.

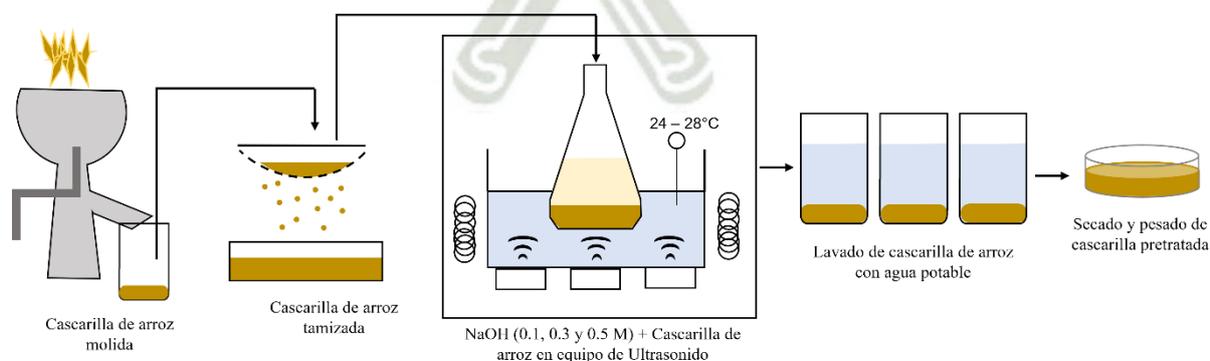


Figura 6. Esquematización del pretratamiento alcalino asistido por ultrasonido de la cascarilla de arroz.

2.3.5. Hidrólisis enzimática de los residuos sólidos

El sólido obtenido del pretratamiento alcalino y alcalino-asistido con ultrasonido fue sometido a un proceso de hidrólisis enzimática empleando cóctel enzimático celulasa. Para lo cual, 1g de material fue pesado y añadido con 20 mL de buffer citrato de sodio (pH 4.8), a la misma que fue adicionada 194 μ L de enzima (equivalente a 20 FPU/g de material). Posteriormente, se llevó a agitación constante a 250 rpm por 24 h a 50°C, pasado este tiempo, se recuperó el líquido sobrenadante centrifugando a 10 000 rpm por 10 min (36). Al líquido obtenido se le realizó un análisis de DNS para azúcares reductores totales y se preparó viales de 1.5 mL con dilución de 5x de la muestra y filtrado con membranas de nylon de 0.45 μ m para la medición de azúcares (glucosa, xilosa, arabinosa y celobiosa) en el equipo de HPLC. Los datos obtenidos de la hidrólisis enzimática para la obtención de azúcares presentes en la muestra de cascarilla de arroz fueron ingresados al software DX (*Design-Expert - Stat-Ease*) para el análisis estadístico y ploteo de la superficie de respuesta 3D, con el fin de obtener los puntos óptimos de las variables de la hidrólisis.

2.3.6. Extracción alcalina de la hemicelulosa

Se optimizó la extracción de la fracción de hemicelulosa usando un diseño experimental tipo Box-Behnken con tres variables: concentración de NaOH, tiempo y temperatura, con un máximo de 1.5 M, 90 min y 120 °C y un mínimo de 0.5 M, 30 min y 70°C respectivamente. Para el proceso alcalino se usó 10 g de cascarilla de arroz en 100 mL de NaOH, llevándose a la autoclave (1h a 121°C). Una vez terminado el proceso, se filtró el sólido utilizando una gasa. El sólido recuperado fue lavado con abundante agua y secado a 50°C por 24 h y se reservó para posteriores procedimientos. La fracción líquida resultante fue acidificada añadiendo ácido acético glacial hasta un pH 5. Posteriormente se añadieron 3 volúmenes de alcohol frío (10 °C) y fue dejado en reposo por 24 h a la misma temperatura. La fracción sólida generada fue decantada, reteniendo el sólido, el cual fue lavado con 3 volúmenes de etanol frío, realizándose tres veces para cada ensayo.

Finalmente, el sólido recuperado y lavado fue puesto a secar en una estufa a 50 °C por 24 h. El sólido fue pesado y molido en un mortero hasta obtener un polvo fino color blanquecino. Todo el proceso de la extracción alcalina de la hemicelulosa a partir de la cascarilla de arroz se encuentra esquematizado en la Figura 7. En el sólido obtenido se evaluó la pureza de la misma a través de análisis de azúcares totales (después de una hidrólisis completa en medio ácido) y contenido de ceniza.

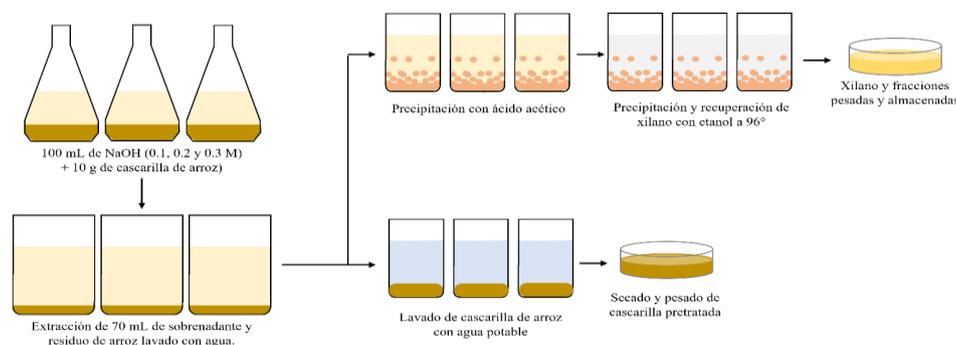


Figura 7. Esquematación del proceso de la extracción alcalina de hemicelulosa a partir de la cascarilla de arroz.

2.3.7. Hidrolisis hidrotérmica

2.3.7.1. Producción de XOS en reactores Parr no agitados

La cascarilla de arroz previamente molida y tamizada fue utilizada para la producción de XOS por proceso hidrotérmico en reactor Parr no agitado. En cada experimento, se pesó 3g de material y fue añadido a 20 mL de agua destilada, haciendo una relación de sólido/líquido de 15%. En todos los casos, la velocidad de calentamiento fue de 2.5°C/min y 5 min para enfriar (baño de agua fría). La mezcla fue colocada en el reactor Parr a temperaturas de entre 160 a 190°C por periodos de tiempo establecidos en la Tabla 7. Luego, se recuperó el líquido y se llevó a centrifugación (74), para finalmente en la fracción líquida hacer el análisis de contenido de azúcares (xilosa y XOS) en el equipo de HPLC. Los datos obtenidos de la hidrólisis hidrotérmica para la obtención de XOS fueron analizados para determinar las mejores condiciones con el fin de maximizar su obtención en una etapa posterior.

Tabla 7. Resumen de condiciones de hidrólisis hidrotérmico en reactores Parr no agitados.

Experimento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	160 °C	16
2		46
3		76
4	170 °C	12
5		42
6		72
7	180 °C	8
8		38
9		68
10	190 °C	4
11		34
12		64

El proceso de la hidrólisis hidrotérmica se encuentra esquematizado en la Figura 8.

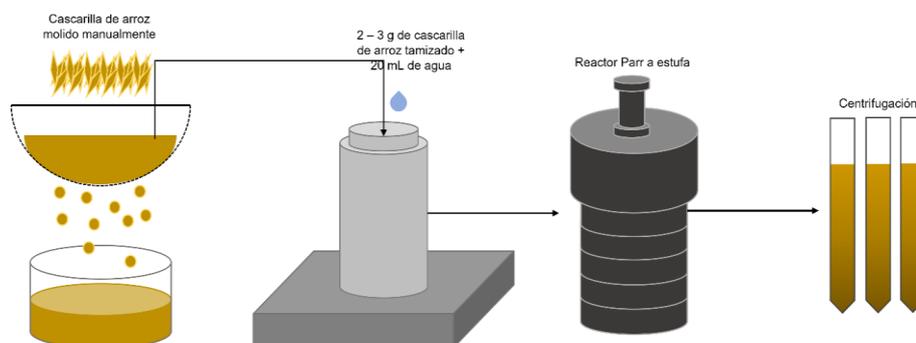


Figura 8. Esquematación del proceso de producción de XOS en reactor Parr no agitado.

2.3.7.2. Producción de XOS en reactores Parr agitados

La cascarilla de arroz se sometió a hidrólisis hidrotérmica en un reactor Parr agitado de 2L de volumen (Modelo 4536, PARR Instrument Company, Moline, Illinois, EE. UU). Se evaluó el tiempo de proceso (0, 15, 30, 45, 60, 75, 120 min) a 180 °C con el objetivo de obtener xilooligosacáridos (XOS). En cada experimento se utilizó 50 g (en base seca) de cascarilla de arroz a una relación sólido-líquido de 6,6% y se agitó a 120 rpm. En todos los casos, la velocidad de calentamiento fue de 2.5°C/min, y 5 min para enfriar el reactor hasta reducir la presión interna a 1 atm. Después del proceso, la fracción sólida se separó mediante filtración al vacío y la fracción líquida se recuperó para el análisis XOS. El hidrolizado seleccionado con alto contenido de XOS y posteriormente se realizó su purificación por membrana, como se muestra en la Figura 9.



Figura 9. Esquematación del proceso de producción de XOS en reactor Parr agitado.

2.3.8. Hidrólisis enzimática de los residuos sólidos después del proceso hidrotérmico

El residuo sólido obtenido del proceso hidrotérmico fue sometido a proceso de hidrólisis enzimática, empleando 5% de carga de sólidos del residuo en 20 mL de solución de citrato de sodio 50 mM a 4,8 de pH. Se utilizó una mezcla comercial de enzimas Cellic® CTec2 con una carga de 20 FPU/g de biomasa seca. El proceso se realizó a 50 °C y 150 rpm durante 24 h. El

rendimiento de hidrólisis enzimática de la celulosa se calculó considerando la glucosa liberada en el proceso enzimático con respecto a la glucosa total liberada después de la hidrólisis química completa según la metodología reportada por Sluiter et al. (72).

2.3.9. Purificación con membranas de los extractos de XOS

Los extractos de XOS, inicialmente fueron sometidos a purificación utilizando membranas poliméricas de ultrafiltración (150 kDa) de la marca STERLITECH MICRODYN NADIR bajo condiciones de 20 bar de presión. El pH del extracto crudo fue modificado en base a pruebas preliminares a un pH de 6.5, ingresando primero 200 mL de materia hidrolizada, de esta filtración resultó 80 mL de retentado y 120 mL de permeado, el cual fue almacenado. El retentado resultante fue filtrado nuevamente utilizando la misma membrana de UF y se le agregó 20 mL de agua destilada, el permeado (80 mL) que se obtuvo de esta filtración fue almacenado junto al permeado inicial y al retentado (20 mL) se le realizó una filtración más con 20 mL de agua ultrapura del que se obtuvo un volumen final de retentado de 20 mL. El permeado resultado de la última filtración y los retenidos almacenados anteriormente se juntaron y fueron sometidos a un proceso de nanofiltración utilizando una membrana NADIR NP030P de 500 kDa, 30 bar de presión y pH 4. El retentado obtenido de ambas filtraciones fue puesta a cartuchos Sep-Pak C18 Classic Cartridge (Water, USA), para la retención de fenólicos. Todo el proceso de ultra y nanofiltración para la purificación de XOS de la cascarilla de arroz se muestra resumida en la Figura 10.

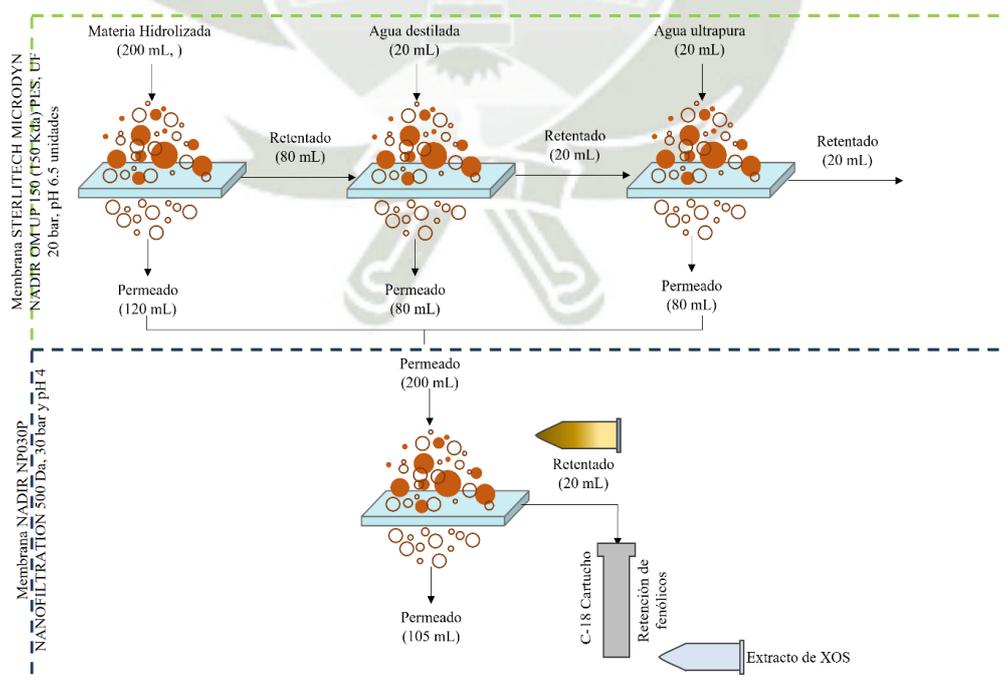


Figura 10. Ultra y nanofiltración del material hidrolizado para la purificación de XOS.

2.3.10. Estabilidad térmica de los extractos de XOS

El extracto final obtenido como retentado del proceso de nanofiltración, el mismo que contenía una mayor concentración de XOS fue sometido a tratamientos térmicos a temperaturas de pasteurización lenta (63°C) por 30 min. Luego se aplicó una pasteurización rápida (72 °C) por 15 seg manteniendo la temperatura constante con un equipo de Baño María marca Witeg Labortechnik Germany. Se tomaron muestras cada 10 min por triplicado. Finalmente, se realizó el tratamiento a temperatura de esterilización (120 °C) en un digestor marca Spectroquan TR420 a una temperatura de 120°C por 15 min (75).

2.3.11. Análisis de XOS por HPLC

Los azúcares (glucosa, xilosa, arabinosa, celobiosa) y XOS (X2-X4) se cuantificaron en el equipo de cromatografía líquida (UHPLC) UltiMate 3000 marca Thermo Scientific, la cual está equipada con una columna y precolumna, HyperREZ XP Carbohydrate H+ y un detector de índice de refracción. La temperatura del horno fue de 75°C, y el volumen de inyección fue de 20 µL. Se utilizó una fase móvil de agua ultrapura, filtrada con un filtro de Nylon de 0.22 mm, los cuales fueron comparados con estándares de entre X1 y X4 (76).

Los XOS (X2-X6), fueron cuantificados por cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) en un sistema Dionex DX-500 (Sunnyvale, CA, EE. UU.) con una columna CarboPac PA100 (4×250 mm) y una precolumna CarboPac PA100 (4×50 mm). El tampón A (NaOH 100 mM) y B (NaOAc (Acetato de sodio) 300 mM; NaOH 100 mM) se usaron como eluyentes con un caudal de 1,0 ml/min. El programa de gradiente fue: 95% de A y 5% de B de 0 a 10min; 0% de A y 100% de B de 10 a 20min; 95% de A y 5% de B de 20 a 25 min.

2.3.12. Determinación de azúcares reductores totales (DNS) y compuestos fenólicos totales

Para el DNS se diluyó la muestra a diferentes concentraciones, llevándolas a un volumen total de 1 mL, al que se le añadió 0.5 mL de DNS (Acido 3,5 dinitrosalicílico) para poder oxidar los azúcares presentes. Como siguiente paso, se llevó al baño a 100 °C por 10 min. provocando el viraje de color de amarillo brillante a un naranja o café oscuro. A este se le agregó 3.5 mL de agua destilada, teniendo un volumen final de 5 mL. Este fue leído por el espectrofotómetro UV-visible marca ThermoScientific Genesys 150 a una longitud de onda de 540 nm, utilizando de blanco agua destilada y de muestra los resultantes de las hidrolisis y pretratamiento de la cascarilla de arroz.

Para la determinación de los compuestos fenólicos en los diferentes extractos, se tomó 0.5 mL de muestra hidrolizada y se le añadió 0.25 mL de reactivo de Folin a 0.1 N (1 de reactivo de

Folin: 1 de agua destilada). Posteriormente se adicionó 1.25 mL de Carbonato de sodio con concentración de 75 g/L, procediendo a agitarlo con el uso de un Vortex. Luego fue dejado en completa oscuridad por un periodo de 30 min. Finalmente, se midió en un Espectro UV visible marca ThermoScientific modelo Genesis 150, a una longitud de onda de 755 nm (75).



CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Caracterización de cascarilla de arroz

La cascarilla de arroz se caracterizó en su composición y los resultados se muestran en la Tabla 8. Como se observa, el glucano es la principal fracción de carbohidrato que corresponde al 35%, seguido del xilano que representan alrededor del 15%, convirtiéndose en un material adecuado para su valorización ya que contiene más del 50% en peso de carbohidratos, los mismos que pueden ser valorizados en productos de interés a través de procesos biotecnológicos. Sin embargo, considerando la complejidad y recalcitrancia del material, es necesario un pretratamiento, en este sentido, la valorización de xilosa por proceso hidrotermal podría ser una opción adecuada también para la producción de xilooligosacáridos y aumentar la susceptibilidad a la hidrólisis de la celulosa y su conversión en azúcar. Con respecto a la composición, los resultados obtenidos concuerdan con trabajos previos (77,78). La cascarilla de arroz se caracteriza por el alto contenido de cenizas (alrededor del 18 % del peso) conforme obtenido en este estudio, de las cuales alrededor del 85-90 % corresponden a sílice amorfa (79), por lo que en los últimos años se ha incrementado la aplicación de ceniza de cascarilla de arroz, por ejemplo, como relleno en la industria de neumáticos (80) o aditivo en baterías de plomo-ácido (81).

Tabla 8. Composición de la cascarilla de arroz.

Componentes	Este estudio	Zhang et al. (2010) (78)	Klangpetch et al. (2022) (77)
Glucano (%)	35.65 ± 2.06	35.86	29.91 ± 0.87
Xilano (%)	14.55 ± 0.73	18.20	10.93 ± 0.35
Arabinosa (%)	1.90 ± 0.07	-	1.71 ± 0.05
Grupo acetil (%)	1.05 ± 0.39	-	-
Lignina (%)	23.34 ± 0.22	24.52	-
Extractivos (%)	3.95 ± 0.24	-	-
Ceniza (%)	19.11 ± 1.53	18.85	15.56

Además, el residuo natural fue sometido a un análisis elemental, resultando en una composición de 36,6% de Carbono, 5,3% de Hidrógeno, 0,4% de Nitrógeno y, por diferencia, 57,7% de Oxígeno. Aunque no hay resultados previos reportados, los obtenidos fueron similares al reportado para el bagazo de caña de azúcar, 45,5% de C, 5,6% de H, 45,2% de O y 0,3% de N (82).

3.1.1. Tratamiento alcalino y alcalino asistido con ultrasonido como pretratamiento de la cascarilla de arroz.

3.1.2. Tratamiento alcalino de la cascarilla de arroz

Para conocer las condiciones más idóneas del tratamiento alcalino, se realizaron experimentos preliminares, teniendo como variables el tiempo de contacto con el hidróxido de sodio (1 – 4 h), y tres concentraciones diferentes de NaOH (0.1, 0.2 y 0.3 M). Los resultados obtenidos se pueden observar en la Tabla 9, donde se muestra que el contenido de lignina fue removido en más de 70% en tratamientos con altas concentraciones de NaOH (0.2 y 0.3 M) y tiempos prolongados (3 y 4h). En el tratamiento más severo se alcanzó una remoción del 81% de la lignina. La disminución en el contenido de lignina conlleva a un incremento en el contenido de ceniza y contenido de azúcares reductores totales (glucosa y xilosa) que están relacionados con el contenido de celulosa y hemicelulosa, respectivamente. gg

Tabla 9. Porcentaje de remoción de Lignina, ceniza y carbohidratos variando el tiempo (h) y la concentración de NaOH (M).

Concentración de NaOH (M)	Tiempo (h)	Remoción de lignina (%)	Azúcares reductores totales (mg ART/g material)
0.1	1	24.25	68.11 ± 1.45
	2	39.42	68.44 ± 2.7
	3	47.62	69.98 ± 1.28
	4	54.36	70.25 ± 0.8
0.2	1	40.53	69.60 ± 5.3
	2	63.85	70.80 ± 2.13
	3	76.39	71.36 ± 0.49
	4	81.19	71.62 ± 1.03
0.3	1	54.77	70.82 ± 0.89
	2	71.35	71.27 ± 4.3
	3	71.06	71.04 ± 3.16
	4	79.03	71.55 ± 2.07
Control (sin tratamiento)	-	0	64.84 ± 3.05

Los resultados obtenidos corresponden a procesos de pretratamiento a temperatura de 50 °C, el mismo que puede ser comparado con los reportados por Bazargan et al. (84), donde también utilizaron NaOH y H₂O₂ para el pretratamiento de cascarilla de arroz, realizando sus experimentos con concentraciones de 2, 5 y 8% y 1, 3 y 5 % (p/v) respectivamente, con un tiempo fijo de 24 h y variando temperaturas (20, 50 y 80° C), logrando entre 47.93 y 87.93% de remoción de lignina. Sin embargo, valores elevados de remoción de lignina fueron obtenidos por Dagnino, et al. (85), logrando una remoción máxima de lignina de 91.7% a una temperatura

de 160°C por 100 min. Por otro lado, Shahabazuddin, et al. (25), hizo un pretratamiento alcalino con NaOH con una concentración constante de 2% por 40 min, variando el tamaño de partícula de la cascarilla de arroz de entre 0.25 a 1 mm, obteniendo un máximo de 12.25% de lignina y 23.47% de ceniza, obteniendo valores muy similares a los nuestros. Por lo tanto, diversas variables influyen en la remoción de la lignina del material, y este debe de ser evaluado con más detalle en futuros estudios.

Finalmente, el material sometido a tratamiento alcalino es susceptible a la acción de la enzima celulasa quien se encarga de hidrolizar la fracción de celulosa, liberando azúcares como glucosa y xilosa, los cuales fueron medidos como azúcar reductor total (ART), los mismos que aumentan en su concentración conforme mostrado en la Tabla anterior.

3.1.3. Tratamiento alcalino asistido con US de la cascarilla de arroz

Se realizó el tratamiento alcalino asistido con ultrasonido de la cascarilla de arroz y los resultados se muestran en la Tabla 10. Como se observa, los mejores resultados de azúcares reductores totales (glucosa + xilosa) obtenidos en el proceso de hidrólisis enzimática fue con el material sometido a las condiciones de 0.5 M de NaOH, 60 min y 75W (experimento N° 6), obteniéndose 108 ± 1.02 mg de azúcar/g de material pretratado. Se infiere que los resultados obtenidos se debieron a la modificación estructural de la materia por las altas concentraciones de NaOH y el tiempo prolongado. Los resultados obtenidos son concordantes con lo reportado por Kim y Ham (2012), donde la máxima cantidad de glucosa (250 mg /g de material), fue obtenido con el material pretratado en condiciones de 2.96% de NaOH, 81 °C y 56.66 min (86). Respecto al uso del proceso alcalino asistido por ultrasonido puede intensificar el pretratamiento de los materiales lignocelulósicos, removiendo selectivamente la lignina y la hemicelulosa sin degradar la celulosa y aumenta la porosidad y el área superficial de los materiales. La porosidad, el área superficial y el contenido de celulosa del material puede aumentar con el aumento de la concentración de NaOH utilizada. Por ejemplo, Wu et al. (87) reportaron que la cantidad de azúcar reductor liberada en un proceso de hidrólisis enzimática de 48h, fue aproximadamente 3,5 veces mayor que la de la muestra sin tratamiento.

Tabla 10. Concentración de azúcares totales (glucosa + xilosa) en el hidrolizado enzimático del material pretratado en medio alcalino asistido con ultrasonido, conforme el diseño Box @Behnken.

Experimento	Concentración de NaOH, M	Tiempo, min	Potencia de US, %W	ART (mg de azúcar/ g de material)
1	0.5	35	90	79 ± 2.01
2	0.3	60	60	98 ± 0.2
3	0.1	10	75	45 ± 1.4
4	0.1	35	60	58 ± 2.3
5	0.3	35	75	77 ± 0.8
6	0.5	60	75	108 ± 1.02
7	0.3	10	90	49 ± 0.6
8	0.3	35	75	62 ± 0.6
9	0.1	60	75	72 ± 1.54
10	0.3	10	60	38 ± 0.51
11	0.3	35	75	68 ± 0.75
12	0.1	35	90	51 ± 1.75
13	0.5	35	60	68 ± 1.26
14	0.5	10	75	38 ± 0.84
15	0.3	60	90	74 ± 0.49

Se compuso un modelo empírico de interacción de 2 factores (2FI) (Ecuación 1) y se realizó una prueba ANOVA, con los resultados presentados en la Tabla 10. La alta significación del modelo fue verificada por el valor de p que fue inferior a 0.001 y se observó una falta de ajuste no significativa al nivel de confianza del 95%.

Tabla 11. Análisis ANOVA del diseño experimental de obtención XOS con tratamiento alcalino asistida con US.

	F- Valor	p- valor	
Modelo	34.03	< 0.0001	Significativo
A- Concentración de NaOH	20.02	0.0021	
B- Tiempo	152.66	< 0.0001	
C- %W	0.3701	0.5598	
AB	16.89	0.0034	
AC	3.3	0.1069	
BC	10.94	0.0107	
Falta de ajuste	0.3752	0.8515	No significativo

Ecuación 1:

$$\text{ART (mg ART/g material)} = 6.58 + 0.8275 A + 2.28 B - 0.1125 C + 1.08 AB + 0.4750 AC - 0.8650 BC$$

Donde:

A: Concentración de NaOH, M

B: Tiempo, min

C: Potencia US, %

AB: Interacción concentración de NaOH vs Tiempo

AC: Interacción Concentración de NaOH vs Potencia US

BC: Interacción Tiempo vs Potencia US

Una vez realizados los experimentos del diseño, se obtuvo la superficie de respuesta, presentado en la Figura 11. En la Figura 11A se observa que a mayor concentración de NaOH y mayor tiempo se puede obtener una mejor eficiencia de pretratamiento de la cascarilla de arroz, de esta forma obteniéndose de glucosa + xilosa. En la Figura 11B, se logra la máxima obtención de ART aplicando un mayor % de potencia de US interactuando con la concentración de NaOH y en la Figura 11C la relación de la potencia del US con el tiempo, donde se puede observar una mayor extracción de azúcares maximizando estas variables. De acuerdo con los resultados obtenidos, se realizó la optimización de la extracción de azúcares totales, manteniendo las variables en el rango y maximizando el contenido de azúcares fermentables en una etapa posterior al pretratamiento.

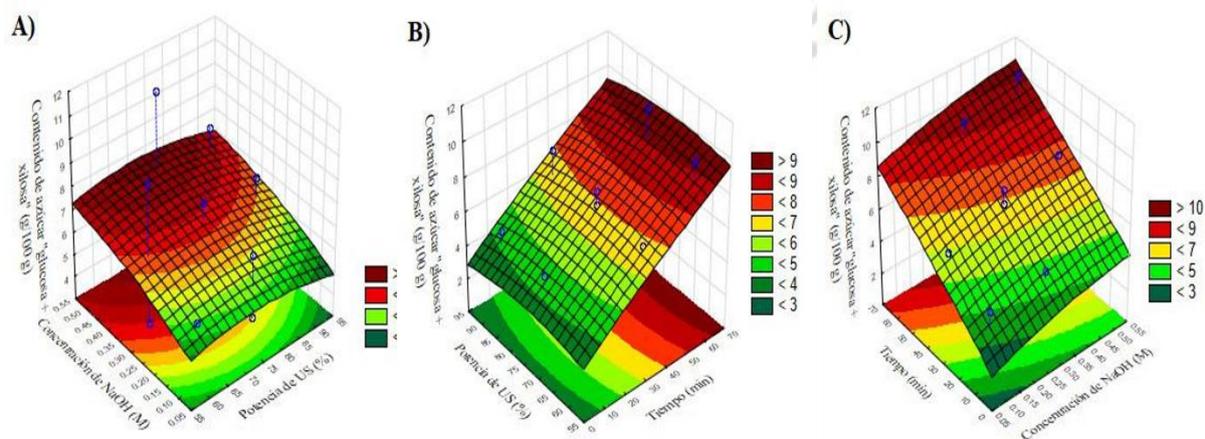


Figura 11. Superficie de respuesta para la variable ART en función de la interacción de 2 variables. A) tiempo vs concentración de NaOH, B) Potencia de ultrasonido vs Concentración de NaOH y C) Tiempo vs potencia de ultrasonido.

La Figura 12, presenta el ajuste del modelo, donde se puede observar la línea de tendencia; y los puntos junto a este, representando los valores obtenidos de los experimentos, los cuales no se encuentran muy separados de lo predicho por el modelo del Software DX, haciendo al modelo significativo.

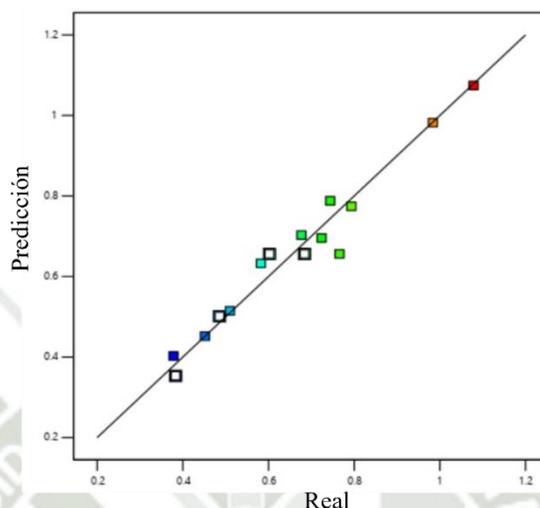


Figura 12. Gráfica de valores predichos por el Software DX vs los valores reales.

Las variables fueron optimizadas con el objetivo de maximizar la producción de azúcar en la etapa de hidrólisis enzimática una vez que está relacionada directamente a la eficiencia del pretratamiento al cual fue sometido el material lignocelulósico. Se realizó un experimento de validación en las condiciones optimizadas, que fueron a una concentración de 0.5 M de NaOH, 75% de potencia de US y 60 min de tiempo de proceso. En este caso, el modelo cuadrático predijo una concentración de azúcar en la etapa de hidrólisis de 10.77 ± 0.523 g/100 g de material (promedio \pm 95 % del intervalo de nivel de confianza), que se confirmó experimentalmente, con un valor de 10.79 ± 0.021 g/100g de material (promedio \pm desviación estándar).

3.2. Extracción alcalina de hemicelulosa de la cascarilla de arroz.

Se realizó la extracción de hemicelulosa por procesos alcalinos (NaOH), donde las variables concentración de NaOH (0.5 – 1.5 M), el tiempo de proceso (30 – 90 min) y la temperatura (70 – 120 °C) fueron optimizados en función de la cantidad de hemicelulosa obtenido y porcentaje de ceniza, los resultados se observan en la Tabla 12. El máximo valor de extracción de hemicelulosa fue de 301.3 mg por gramo de polvo, bajo condiciones de 1.5 M de NaOH, a 120°C y 60 min; y el mayor valor de cenizas fue de 71.9%, aplicando una concentración de NaOH de 0.5 M, 95°C y 90 min.

Tabla 12. Diseño experimental de extracción de hemicelulosa a partir de la cascarilla de arroz.

Ítem	Concentración de NaOH, M	Temperatura, °C	Tiempo, min	Hemicelulosa, (mg/g de polvo)	Ceniza, %
1	1	95	60	188.0	48.36
2	1	95	60	77.5	61.54
3	1	95	60	86.9	60.47
4	0.5	70	60	60.4	55.32
5	1	70	90	147.1	50.04
6	1	120	30	169.4	55.35
7	1	120	90	238.4	52.85
8	1.5	120	60	301.3	52.65
9	0.5	95	90	36.5	71.90
10	0.5	120	60	55.2	67.40
11	0.5	95	30	46.1	67.20
12	1	70	30	124.5	50.70
13	1.5	70	60	146.0	53.01
14	1.5	95	30	191.2	55.57
15	1.5	95	90	209.3	53.79

Se obtuvo el análisis de varianza ANOVA del Design Expert del modelo matemático cuadrático recomendado por el Software (Anexo 3, Tabla 16) (Ecuación 2), el cual se muestra en la Tabla 13, donde podemos observar que el modelo es considerado significativo, y la falta de ajuste fue no significativo, haciendo valido el diseño, logrando un coeficiente R^2 de 0.98, F- valor de 25.24 y p- valor de 0.0012 en el modelo, siendo lo óptimo que el p- valor sea < 0.05 , lo que indica que el p- valor del diseño es significativo al 95% de nivel de confianza. A diferencia del p- valor de la falta de ajuste, que fue de 0.64 el cual es mayor a 0.05, lo que nos da a entender que el error no fue significativo en el diseño.

Tabla 13. Resultados ANOVA del diseño experimental de extracción de hemicelulosa de la cascarilla de arroz.

	F- Valor	p- valor	
Modelo	25.24	0.0012	Significativo
A- Concentración de NaOH	145.71	< 0.0001	
B- Temperatura	28.33	0.003	
C- Tiempo	3.46	0.121	
AB	17.80	0.008	
AC	0.53	0.499	
BC	1.49	0.277	
A²	0.016	0.906	
B²	23.35	0.005	
C²	7.93	0.037	
Residual			
Falta de ajuste	0.676	0.643	No significativo

Ecuación 2:

$$\text{Extracción de Hemicelulosa (mg/g de biomasa)} = 94.13 + 81.19 A + 35.8 B + 12.52 C + 40.13 AB + 6.94 AC + 11.59 BC - 1.23 A^2 + 47.84 B^2 + 27.89 C^2$$

Donde:

A: Concentración de NaOH, M

B: Temperatura, °C

C: Tiempo, min

AB: Interacción concentración de NaOH vs temperatura

AC: Interacción Concentración de NaOH vs tiempo

BC: Interacción Temperatura vs tiempo

A²: Factor cuadrático de la concentración de NaOH

B²: Factor cuadrático de la temperatura

C²: Factor cuadrático del tiempo

De los datos resultantes del diseño experimental se obtuvo el ploteo en 3D de la superficie de respuesta que se observa en la Figura 13, que se encuentra en relación de las variables y la extracción de hemicelulosa, este ploteo nos permitirá optimizar las condiciones experimentales, ya que nos muestra en qué condiciones se puede obtener el valor máximo de hemicelulosa, obteniendo como máximo valor 301.3 mg/ g biomasa a una concentración de NaOH de 1 M, 120°C de temperatura y un tiempo de 90 min.

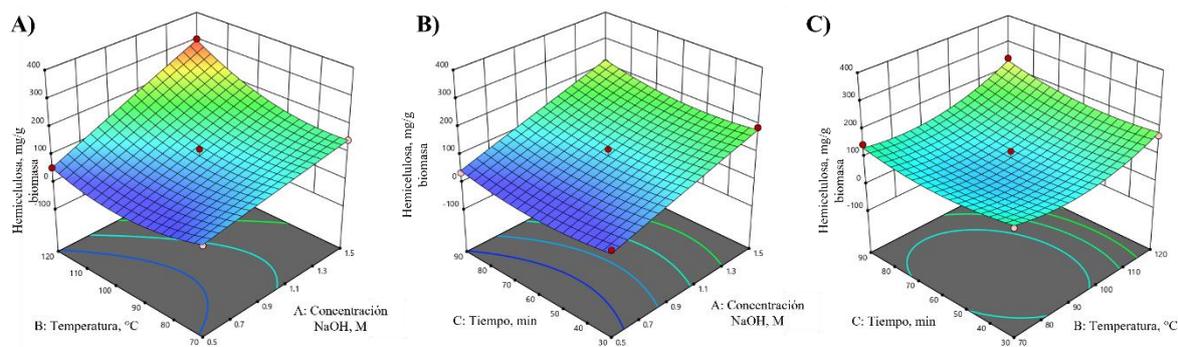


Figura 13. Superficie de respuesta para la variable “extracción de hemicelulosa” en función de la interacción de 2 variables. A) temperatura vs concentración de NaOH, B) tiempo vs Concentración de NaOH y C) Tiempo vs temperatura.

Los gráficos pueden interpretarse que, a mayor concentración de NaOH y mayor temperatura, se puede lograr una mayor cantidad de extracción alcalina de hemicelulosa a partir de la cascarilla de arroz. Procesados estos datos, se realizó la optimización de las variables manteniéndolas en el rango (Temperatura: 70-120 °C, Tiempo: 30-90 min y Concentración de NaOH: 0.5-1.5 M) y maximizando la extracción de la hemicelulosa expresada en mg/g biomasa.

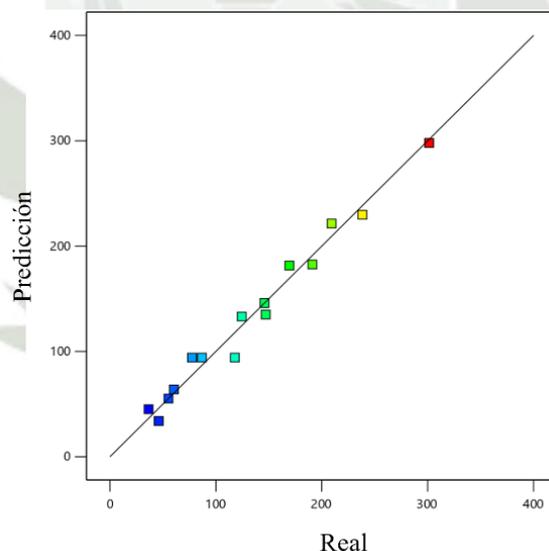


Figura 14. Grafica de los puntos experimentales y la predicción del software DX de la extracción de hemicelulosa de la cascarilla de arroz.

En la Figura 14 podemos observar la línea de tendencia de la predicción hecha por el software DX con los datos máximos y mínimos de las variables y los valores obtenidos de los experimentos en la realizada, los cuales se encuentran cercanos a la línea de predicción, por lo que el modelo es significativo.

Para la optimización las variables se mantuvieron en el rango y la extracción de hemicelulosa como factor se maximizó, dándonos las siguientes condiciones: concentración de NaOH de 1.5 M, temperatura de 118.62°C y 76.73 min de tiempo, los que se realizaron por triplicado, resultando un promedio de 281.54 mg de hemicelulosa por gramos de biomasa, en este caso la cascarilla de arroz. Shahabazuddin, et al., (25), obtuvieron del pretratamiento alcalino de la cascarilla de arroz un rendimiento total de 371 mg/g de biomasa, bajo condiciones óptimas de carga de biomasa (10% p/p), tamaño de partícula (0.25-0.625 mm), carga de NaOH (2% p/p) y tiempo de reacción (40 min). Esta diferencia de resultados se puede deber a las características iniciales de la cascarilla de arroz, además de las variables consideradas, ya que ellos experimentaron con diferentes tamaños de residuo, y con un periodo fijo, considerando que la concentración de NaOH es mucho mayor con la que se experimentó.

3.3. Proceso hidrotérmico de la cascarilla de arroz para producción de XOS.

3.3.1. Producción de XOS con reactor Parr no agitado

La producción de XOS a partir de cascarilla de arroz en reactores Parr no agitados fueron evaluados en diferentes condiciones de temperatura y tiempo, y los resultados se muestran en la **Figura 15**. Como se puede observar en la figura, temperaturas de 160 y 170 no promueven la producción de XOS (X2-X4), únicamente se observó la producción de xilosa y en concentraciones menores a 1g/L. Temperaturas de 180 y 190 °C promovieron la producción de XOS, siendo más alta la concentración de XOS a 180°C por 68 min y 190°C por 34 min, condiciones que permitieron una producción de XOS (X2-X4) mayores a 3g/L.

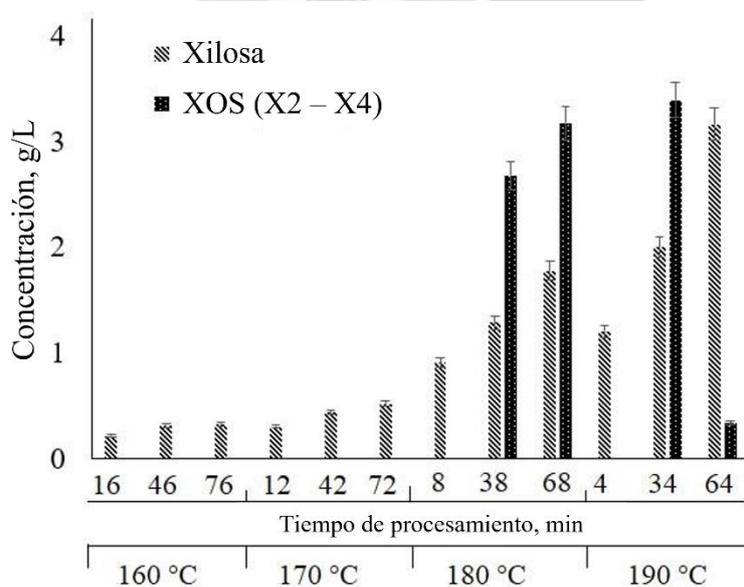


Figura 15. Concentración de XOS a diferentes temperaturas y tiempos de proceso en reactor Parr no agitado.

Los resultados obtenidos son superiores a los reportados en otros procesos hidrotérmicos. Por ejemplo, Monteiro, et al., (6) aplicaron procesos hidrotermales a la semilla de mango para la producción de XOS, con tratamiento de 30 min a 180°C y también se evaluó como factor la presión (2.5 y 10 MPa), de la que obtuvieron 394.44 mg XOS/g de xilano, con factor de polimerización entre X2 – X6 de 82.24 mg/g, produciendo ellos un total de 81 g de 1 kg. Condiciones parecidas fueron utilizadas por Moniz, et al., (88), los que utilizan paja de maíz sometido a temperaturas de entre 150 y 240 °C, logrando obtener hasta un 53% de XOS. Además, recientemente se reportó la producción de XOS de residuos de quinua por proceso hidrotérmico (89), alcanzando aproximadamente 66 mg de XOS (X2-X6) por g de material. Sin embargo, factores como el tipo de material, estructura y composición del material, tipo de hemicelulosa, temperatura, sistema utilizado, granulometría, etc. son factores que directamente contribuyen en el rendimiento del proceso (89). Tal es así que en otro estudio se reportaron concentraciones superiores de XOS, por ejemplo, 12.86 g/L de XOS fue producido a partir de tallos de arroz en un proceso hidrotérmico a 210 °C con factor de severidad de $\log R_0 = 3.59$ (88).

En la **Figura 16** se muestra los cambios en el color de la cascarilla de arroz con la hidrólisis a temperaturas de entre 160 – 190°C con periodos de tiempo de 60 a 120 min, obteniéndose una coloración más oscura a temperaturas elevadas y tiempos prolongados, esto se debe al color característico de la lignina, una vez que la remoción de los carbohidratos incrementa el porcentaje de lignina en el material.

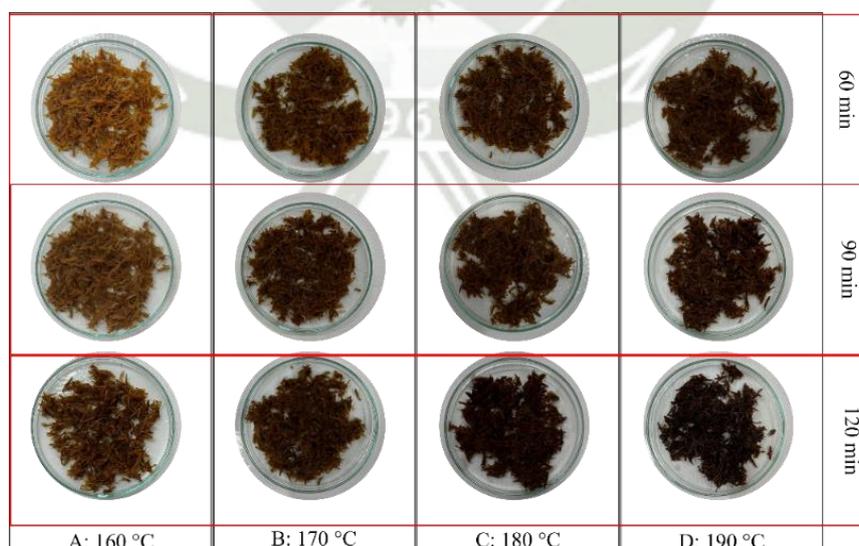


Figura 16. Cambio de características visuales de la cascarilla de arroz sometida a hidrólisis térmica en el reactor Parr sin agitación.

3.4. Purificación de los extractos de XOS (X2-X4) con membranas poliméricas

La purificación de XOS se realizó progresivamente en etapas de ultra y nanofiltración utilizando membranas poliméricas y diagrama simplificado se muestra en la **Figura 17**. Como puede ser observado en la figura, el extracto utilizado (200 mL) para el proceso de filtración contenía 2.71 g/L de XOS (X2-X4), siendo en el proceso de UF una retención del 54% de los XOS presentes, obteniéndose en el permeado 120 mL de extracto con 2.06 g/L de XOS (X2-X4) y en el retentado un volumen de 80 mL con 6.62 g/L de XOS (X2-X4). En una etapa posterior, el 50 mL de retentado fue sometido a una primera diafiltración con adición de agua destilada resultando en un volumen de 100 mL, el mismo que fue filtrado por la misma membrana, obteniéndose un 80 mL de permeado con 2.07 g/L de XOS (X2-X4) y 20 mL de retentado con 7.96 g/L de XOS (X2-X4), recuperándose hasta un 66% de los XOS (X2-X4) residuales presentes en el retentado resultante de la primera UF.

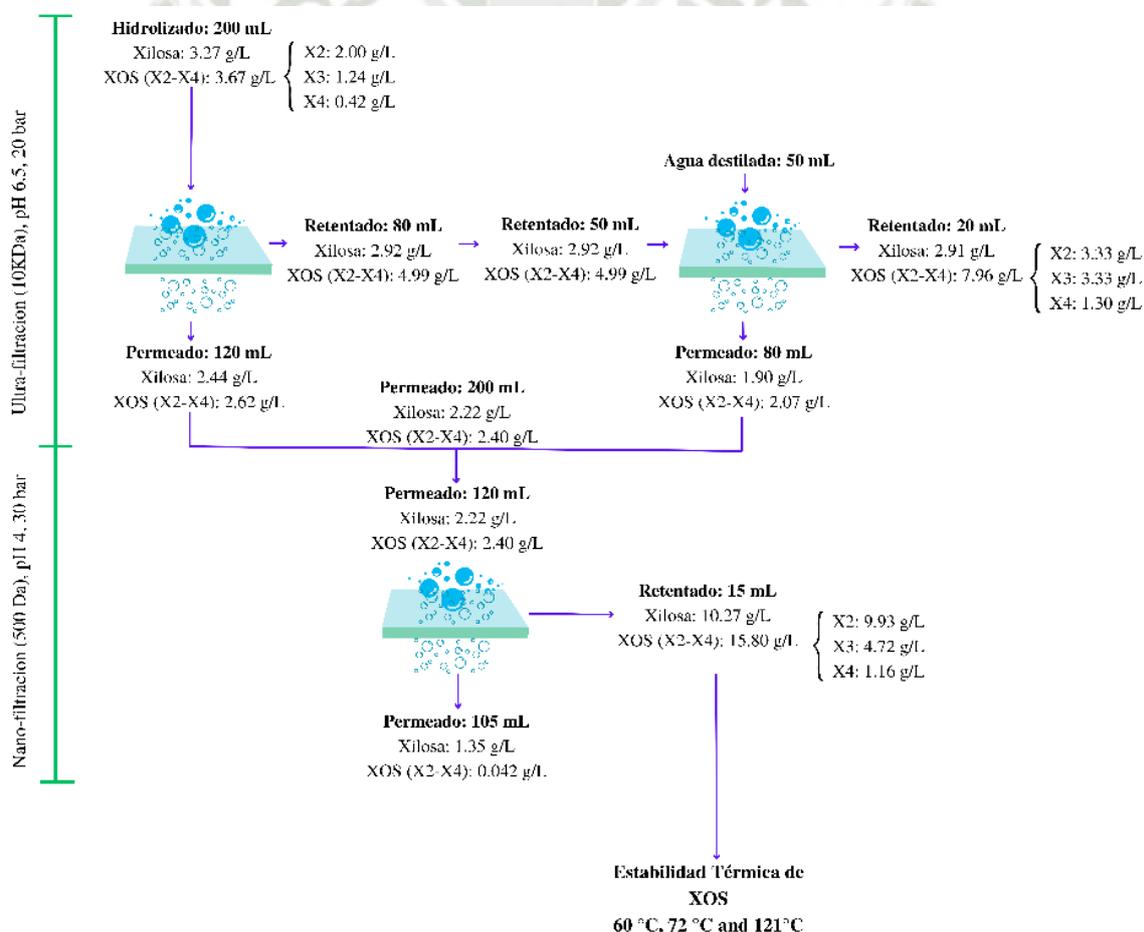


Figura 17. Concentración de XOS recuperado de la hidrólisis térmica en reactor Parr de las etapas de ultra y nano filtración con membranas.

En la etapa de nanofiltración (NF) el pH del extracto permeado en la membrana de UF fue modificado a pH 4 a fin de retener los XOS conforme previamente reportado por Vega et al.

(89), donde pH's bajos permitieron mayor retención de fenólicos, azúcares y XOS, debido principalmente a la rápida adhesión de los pigmentos y fenólicos con carga negativa sobre la membrana (90). Como consecuencia, en el proceso de NF el flujo a través de la membrana fue menor comparado al proceso de UF a pH 6.5. En la NF 82% de los XOS fueron recuperado en el retentado, obteniéndose 15 mL de extracto con 15.80 g/L de XOS total (X2-X4), 9.93 g/L de X2 (xilobiosa), 4.72 g/L de X3 (xilotriosa) y 1.16 g/L de X4 (xilotetraosa). Finalmente, la concentración de XOS (X2 a X4) alcanzada después de NF, fue superior al 1,26 g/L de XOS (X2-X6), informada por de Oliveira et al. (70) para condiciones optimizadas combinadas con proceso de diafiltración de extractos obtenidos a partir de las hojas de caña de azúcar. Además, en el retentado obtenido en la etapa de NF fue analizado en su contenido de fenólicos totales, resultando en 2.74 g EAG/L, el mismo que debería ser removido en una etapa posterior a fin de incrementar la pureza del producto.

3.4.1. Producción de XOS en reactor Parr agitado.

En base a las temperaturas previamente evaluadas en reactores Parr no agitados, se procedió a realizar la hidrólisis hidrotérmica en reactores Parr de 2L con sistema de agitación. Se realizaron tratamientos a diferentes tiempos desde 0 hasta 120 min, a temperatura constante de 180°C con rampa de calentamiento de 2.5°C/min. Los resultados de XOS (X2-X6) obtenidos en cada tiempo de proceso se muestran en la Figura 18. Como se muestra en la figura, fue posible cuantificar los XOS desde X2 hasta X4, utilizando un equipo de HPLC DIONEX. Al incrementar el tiempo de proceso se observó un aumento en la concentración de xilosa.

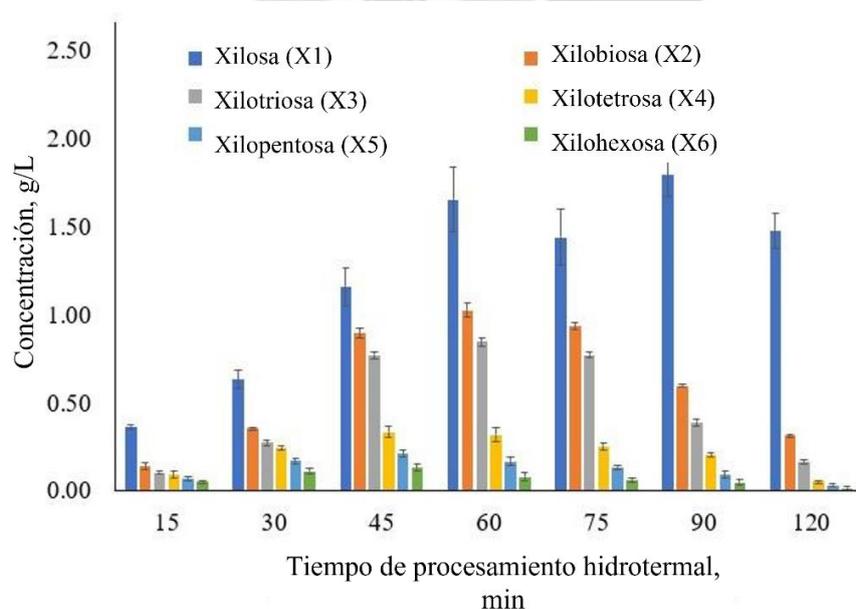


Figura 18. Xilooligosacáridos (XOS) producidos a partir de cascarilla de arroz en desarrollo de proceso hidrotérmico en reactor agitado.

También se observa la concentración de XOS (X2-X6), obteniéndose los mejores resultados a 60 min de proceso, donde se obtuvo una concentración de 2.4 g/L de XOS total, 1.03 g/L de X2, 0.84 g/L de X3, 0.31 g/L de X4, 0.16 g/L de X5 y 0.07 g/L de X6. Con el transcurso del tiempo, por ejemplo, a 90 y 120 min de proceso, los XOS fueron disminuyendo esto debido a una mayor hidrólisis de los XOS en monosacárido (xilosa) y productos de degradación como Furfural, el mismo que se forma como producto de la deshidratación de pentosas como la xilosa. En la Figura 3B se muestra los productos de degradación (furfural e hidroximetil furfural - HMF) y ácido acético liberado durante el proceso hidrotérmico, como esperado en este tipo de procesos, la concentración de furfural fue elevado en 120 min, respecto al HMF fue mucho menor debido a que este proceso promueve la hidrólisis de hemicelulosa y no de celulosa.

La hidrólisis de hemicelulosa en xilosa y XOS durante el proceso hidrotermal es promovida por los iones de hidronio (H_3O^+) producidos por la autoionización del agua y el ácido acético y otros ácidos orgánicos como el ácido acético que son producidos por la escisión del O-acetilo de la hemicelulosa (del Rio et al., 2022). Sin embargo, la severidad del proceso (S_0) es un parámetro útil que relaciona la temperatura y el tiempo y mide la intensidad o dureza de los tratamientos hidrotermales, por ejemplo, la exposición prolongada a altas temperaturas y por mucho tiempo podría promover la producción de subproductos indeseables como furfural y derivados. En este trabajo, el mayor factor de severidad alcanzado en 120 min fue de 4,43 y para 60 min fue de 4,13, presentados en la Figura 19.

Tratamientos hidrotérmicos fueron reportados en la literatura científica, por ejemplo, Marcondes, et al. (91), realizaron tratamientos hidrotérmicos de bagazo de caña de azúcar para la obtención de XOS, logrando recuperar un total de 41.68 g por 100 g de caña de bagazo, bajo condiciones similares a las de este estudio (120 rpm, 180°C, 0 – 50min). Por otro lado, Swart, et al., (92), buscaron obtener XOS de granos gastados de una industria cervecera aplicando termo-hidrólisis con agitación a 40 rpm, 180°C de temperatura y por 15 min, recuperando hasta el 78% de XOS (X2 – X4). Ambos estudios aplicaron este tratamiento con agitación bajo condiciones parecidas a las de esta tesis, obteniendo valores mayores, esto se debe a las características del material utilizado.

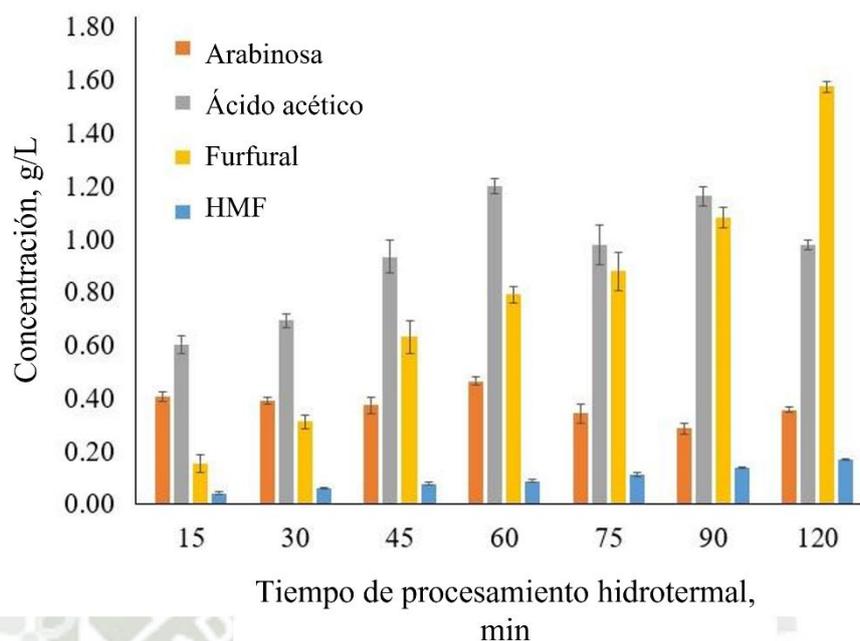


Figura 19. Arabinosa e inhibidores producidos en hidrólisis hidrotérmica – reactor agitado.

3.5. Purificación de los extractos de XOS (X2-X6) con membranas poliméricas

El extracto obtenido a 60 min de proceso hidrotérmico cuyo pH inicial fue de 3.6, fue ajustado a pH de 6.5 para luego ser sometido a un proceso de ultrafiltración con una membrana de 10 kDa conforme mostrado en la **Figura 20**. En base a los análisis de balance de materia, un 65% de los XOS total (X2-X6) se recuperaron en el permeado, y un 35% de XOS (X2-X6) fue retenido en el retentado, el mismo que fue sometido a dos procesos secuenciales de diafiltración (con adición de agua) a fin de recuperar al máximo los XOS en la corriente de permeado, resultando en una recuperación del 88% de los XOS en los procesos de diafiltración. Además, en el proceso de UF + UF-diafiltración, se recuperó el 95.2% de los XOS del extracto crudo. Los resultados obtenidos son superiores a los obtenidos por Singh, et al., (62), quienes realizaron una hidrólisis enzimática y purificaron los XOS con membranas poliméricas comerciales de 10 kDa, recuperando un total de 72.2% de XOS (X2 – X3) a partir de cascara de almendras. Los permeados resultantes de la ultrafiltración -UF fueron sometidos a nanofiltración (NF), iniciando el proceso con 168 mL cuya concentración fue de 1.33 g/L de XOS, obteniendo en el retentado 25 mL de extracto con 7.63 g/L de XOS que representa el 85% de XOS recuperado.

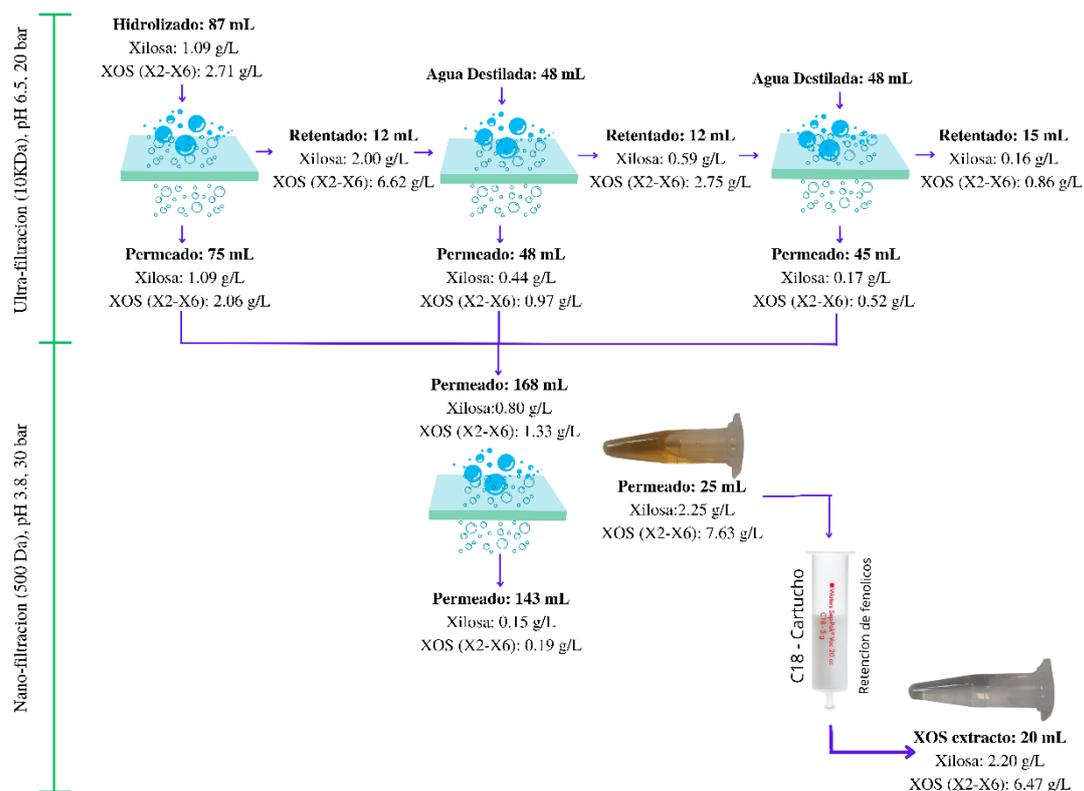


Figura 20. Concentración de XOS recuperado de la hidrólisis térmica en reactor con agitación de las etapas de ultra y nanofiltración con membranas poliméricas.

Los XOS (X2-X6) de la corriente del permeado del proceso de NF pueden ser recuperados a través de un proceso adicional de NF empleando membranas con menor tamaño de poro, por ejemplo, de 150-300 Da. Finalmente, el extracto obtenido en el retentado de la NF fue sometido a un proceso de remoción de fenólicos a través de *Sep-Pak C18 1 cc Vac Cartridge*, obteniéndose una remoción de 92% de los fenólicos, siendo el contenido en el extracto final de 0.08 ± 0.001 g/L.

3.6. Estabilidad térmica de los XOS (X2-X4) presente en los extractos

Los XOS obtenidos fueron sometidos a temperaturas de pasteurización y esterilización a fin evaluar su estabilidad. Los resultados, de esta etapa se muestran en la **Figura 21**, donde X2, X3 y X4 no presentaron ninguna variación en su concentración, de igual forma la xilosa (X1) no incremento, por lo tanto, podemos concluir que los XOS (X2-X4) son estables a la temperatura de 63 °C. La figura también muestra los resultados de concentración de XOS (X2-X4) en temperaturas de pasteurización rápida (72 °C) por 15 min, el mismo que comparado a la inicial (tiempo 0 de tratamiento), no mostro gran diferencia.

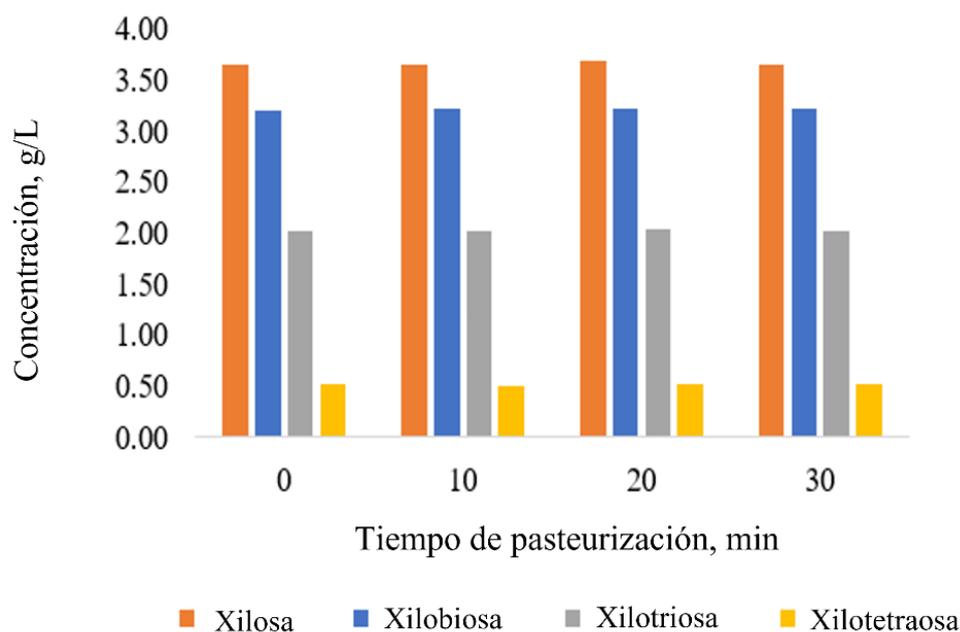


Figura 21. Estabilización térmica por pasteurización de los XOS obtenidos.

Finalmente, el extracto también fue sometido a proceso de esterilización por 15 min a 121 °C observándose también que no hubo alteración en la concentración. Los experimentos fueron realizados a pH 3.5. Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados en la literatura científica, por ejemplo, Wang, et al., (93), realizaron experimentos por 30 min entre 60 y 100°C y de 10 a 15 min a 121°C, encontraron la estabilidad completa de los XOS a 100°C a un pH de 2 a 2.5 unidades. Los resultados son mostrados en la **Figura 22**.

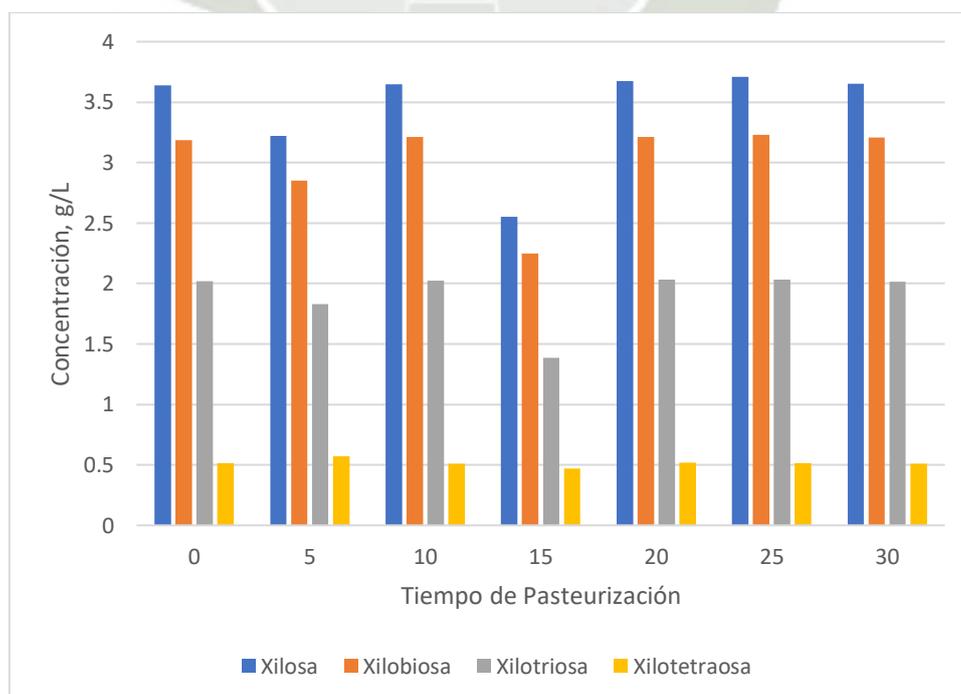


Figura 22. Estabilidad térmica de XOS en temperaturas de 60 a 100°C.

Considerando que las pruebas de estabilidad fueron realizadas utilizando los extractos que no fueron sometidos a purificación con las columnas Sep-Pak C18 cartridges, también se evaluó en cada proceso (pasteurización lenta y rápida) y esterilización, observándose que no hubo diferencia en la concentración de compuestos fenólicos totales, valores que son presentados en la **Figura 23**.

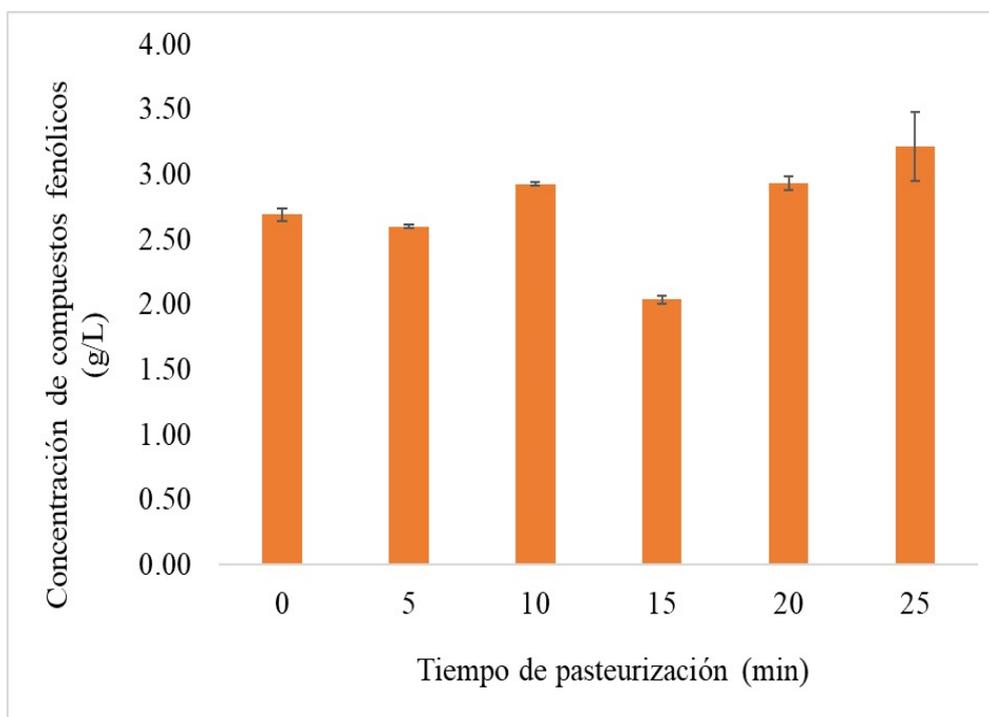


Figura 23. Retención de compuestos Fenólicos mediante un Cartucho.

CONCLUSIONES

HIPOTESIS: Se comprobó la hipótesis planteada, ya que, realizando los tratamientos hidrotérmicos controlados, se pudo obtener XOS a partir de la cascara de arroz, combinado, además de combinarse con la purificación por membranas, obteniendo un producto de calidad con fines comerciales.

Se identificaron los aspectos técnicos óptimos en la etapa de pretratamiento, dando mejores resultados los residuos con tratamiento alcalino asistido con ultrasonido (0.5M de NaOH por 1 h y 75% W); la obtención de la fracción de hemicelulosa fue mediante tratamiento alcalino (1.5 M de NaOH a 118.62°C y 76.73 min); y por último se realizó la purificación de los XOS obtenidos de los tratamientos hidrotérmicos en un reactor Parr con y sin agitación-

PRIMERO: Se realizó la caracterización de la cascarilla de arroz, obteniendo valores fue necesario coleccionar muestra de cascarilla de arroz, la cual fue caracterizada, del cual se obtuvo 35% de carbohidratos, seguido de xilano con 15% la cual contiene más del 50% en peso de carbohidrato. Además, contiene una gran cantidad de cenizas, alrededor de 85 – 90% correspondiente a sílice amorfa.

SEGUNDO: Se evaluaron las condiciones de experimentales para maximizar la obtención de lignina, cenizas y carbohidratos aplicando el pretratamiento alcalino teniendo variables de concentración de Hidróxido de sodio (0.1 – 0.3 M) y tiempo (1 – 4 h), obteniendo el porcentaje más alto de 17% de lignina con 0.1 M por 1 h, 25% de cenizas y 72% de carbohidratos con 0.2 M por 4 h y pretratamiento alcalino asistido con ultrasonido, evaluando la concentración de Xilosa, realizando 15 experimentos de los que se tuvo una mayor concentración bajo las condiciones de 0.5 M de NaOH por 1 h y 75 %W, obteniendo 1.08 mg de xilosa por gramo de cascarilla de arroz.

TERCERO: Se evaluó la extracción de hemicelulosa mediante tratamiento alcalino, optimizando su obtención mediante el modelo matemático de superficie de respuesta – Box ®Behnken, resultando como variables óptimas 1.5 M de NaOH a 118.62°C y 76.73 min, reportando el máximo valor de 277.21 mg de hemicelulosa por gramo de cascarilla de arroz.

CUARTO: Se evaluaron las condiciones para la obtención de XOS de la cascarilla de arroz por Hidrolisis térmica, aplicados en reactores, uno sin agitación con variables de tiempo (120 min), temperatura (180°C) y gramos de biomasa (3 g), produciendo bajo estas condiciones un máximo de 4.49 mg de XOS por gramo de biomasa; y otro con agitación produciendo un total

de 3.2 g por cada 100 g de biomasa aplicadas a diferentes tiempos (0 – 120 min), temperatura de 180°C y a 120 rpm.

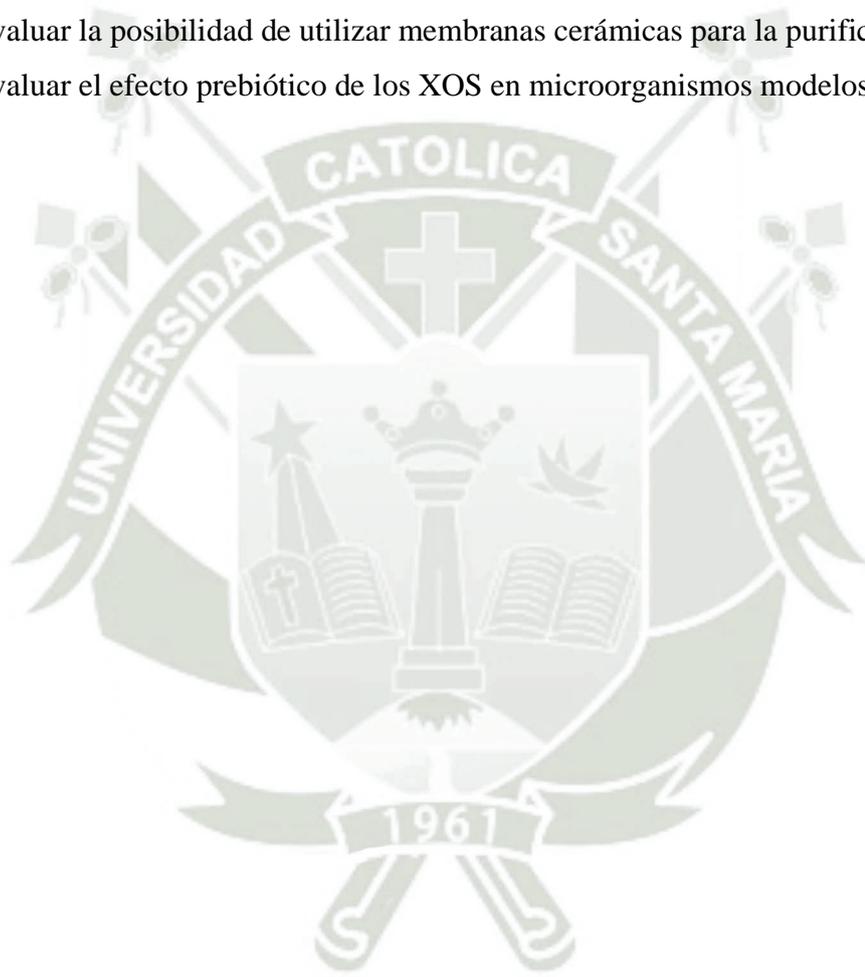
QUINTO: Se llevo a cabo la purificación de los XOS obtenidos de la Hidrolisis térmica sin y con agitación, obteniendo porcentajes máximos de recuperación de XOS de 82.07% y 72.2% respectivamente, mediante ultrafiltración con membrana a 150 kDa con presión de 20 bar y pH de 6.5 unidades; y nanofiltración a 500 Da con 20 bar de presión y pH 4. Además, se realizó la extracción de compuestos fenólicos, reteniendo el 16.32% a 63°C por 25 min, 10.62% a 72°C por 15 seg y 14.5% a 121°C por 15 min y la estabilización térmica de los XOS (X2-X4) por pasteurización lenta y rápida, estabilizándose completamente a 20 y 30 min a 63°C, 15 seg a 72°C y 15 min a 120°C.



RECOMENDACIONES

De acuerdo con lo experimentado, se recomienda lo siguiente:

- Evaluar tratamientos de hidrólisis enzimática empleando enzimas (xilanasas) de la hemicelulosa obtenida por procesos alcalinos.
- Optimizar las variables (presión, temperatura, tiempo) de la hidrólisis hidrotérmica para maximizar la producción de XOS.
- Evaluar la posibilidad de utilizar membranas cerámicas para la purificación de XOS.
- Evaluar el efecto prebiótico de los XOS en microorganismos modelos.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gadal N, Shrestha J, Poudel MN, Pokharel B. A review on production status and growing environments of rice in Nepal and in the world. *Arch Agric Environ Sci*. 2019;4(1):83–7.
2. Hossain MS, Santhanam A, Norulaini NN, Omar AM. Clinical solid waste management practices and its impact on human health and environment—A review. *Waste Manag*. 2011;31(4):754–66.
3. Quispe I, Navia R, Kahhat R. Life Cycle Assessment of rice husk as an energy source. A Peruvian case study. *J Clean Prod*. 2019;209:1235–44.
4. Quiceno Villada D, Mosquera Gutiérrez MY. Alternativas tecnológicas para el uso de la cascarilla de arroz como combustible. 2010;
5. Cano ME, García-Martin A, Comendador Morales P, Wojtusik M, Santos VE, Kovensky J, et al. Production of oligosaccharides from agrofood wastes. *Fermentation*. 2020;6(1):31.
6. Monteiro CR, Avila PF, Pereira MAF, Pereira GN, Bordignon SE, Zanella E, et al. Hydrothermal treatment on depolymerization of hemicellulose of mango seed shell for the production of xylooligosaccharides. *Carbohydr Polym*. 2021;253:117274.
7. Wei X, Huang X. Origin, taxonomy, and phylogenetics of rice. En: *Rice*. Elsevier; 2019. p. 1–29.
8. Muthayya S, Sugimoto JD, Montgomery S, Maberly GF. An overview of global rice production, supply, trade, and consumption. *Ann N Y Acad Sci*. 2014;1324(1):7–14.
9. Acevedo MA, Castrillo WA, Belmonte UC. Origen, evolución y diversidad del arroz. *Agron Trop*. 2006;56(2):151–70.
10. Goodman BA. Utilization of waste straw and husks from rice production: A review. *J Bioresour Bioprod*. el 1 de agosto de 2020;5(3):143–62.
11. Perfil Productivo y Competitivo de los Principales Cultivos del Sector [Internet]. [citado el 25 de junio de 2023]. Disponible en: <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiNzEzNTU2MmUtY2EzZC00YjQ2LTg5YzUtYzJjODRhZjg5NGY5IiwidCI6IjdmMDg0NjI3LTdmNDAtNDg3OS04OTE3LTk0Yjg2ZmQzNWYzZiJ9>
12. Carrión Jaramillo DC. PROYECTO DE INVERSIÓN PARA LA FABRICACIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DE SUSTRATO PARA JARDINES A PARTIR DE LA CASCARILLA DE ARROZ. 2011;
13. Nakamura Y, Ono Y, Saito T, Isogai A. Characterization of cellulose microfibrils, cellulose molecules, and hemicelluloses in buckwheat and rice husks. *Cellulose*. 2019;26:6529–41.
14. Akpenpuun T, Salau R, Adebayo A, Adebayo O, Salawu J, Durotoye M. Physical and combustible properties of briquettes produced from a combination of groundnut shell, rice husk, sawdust and wastepaper using starch as a binder. *J Appl Sci Environ Manag*. 2020;24(1):171–7.

15. Alam MM, Hossain MA, Hossain MD, Johir M, Hossen J, Rahman MS, et al. The potentiality of rice husk-derived activated carbon: From synthesis to application. *Processes*. 2020;8(2):203.
16. Sekifuji R, Tateda M. Study of the feasibility of a rice husk recycling scheme in Japan to produce silica fertilizer for rice plants. *Sustain Environ Res*. 2019;29:1–9.
17. Sapwarobol S, Saphyakhajorn W, Astina J. Biological functions and activities of rice bran as a functional ingredient: A review. *Nutr Metab Insights*. 2021;14:11786388211058560.
18. Mahdi SN, Hossiney N, Abdullah MMAB. Strength and durability properties of geopolymer paver blocks made with fly ash and brick kiln rice husk ash. *Case Stud Constr Mater*. 2022;16:e00800.
19. Kumar S, Sangwan P, Dhankhar RMV, Bidra S. Utilization of rice husk and their ash: A review. *Res J Chem Env Sci*. 2013;1(5):126–9.
20. Santibáñez L, Henríquez C, Corro-Tejeda R, Bernal S, Armijo B, Salazar O. Xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass: A comprehensive review. *Carbohydr Polym*. 2021;251:117118.
21. Mazlan NA, Samad KA, Yussof HW, Saufi SM, Jahim J. Xylooligosaccharides from potential agricultural waste: Characterization and screening on the enzymatic hydrolysis factors. *Ind Crops Prod*. 2019;129:575–84.
22. Johar N, Ahmad I, Dufresne A. Extraction, preparation and characterization of cellulose fibres and nanocrystals from rice husk. *Ind Crops Prod*. 2012;37(1):93–9.
23. Hafid HS, Omar FN, Zhu J, Wakisaka M. Enhanced crystallinity and thermal properties of cellulose from rice husk using acid hydrolysis treatment. *Carbohydr Polym*. 2021;260:117789.
24. Rashid S, Dutta H. Characterization of nanocellulose extracted from short, medium and long grain rice husks. *Ind Crops Prod*. 2020;154:112627.
25. Shahabazuddin M, Chandra TS, Meena S, Sukumaran RK, Shetty NP, Mudliar SN. Thermal assisted alkaline pretreatment of rice husk for enhanced biomass deconstruction and enzymatic saccharification: Physico-chemical and structural characterization. *Bioresour Technol*. 2018;263:199–206.
26. Zhu L, Zhong Z. Effects of cellulose, hemicellulose and lignin on biomass pyrolysis kinetics. *Korean J Chem Eng*. 2020;37(10):1660–8.
27. Zakaria SM, Idris A, Chandrasekaram K, Alias Y. Efficiency of bronsted acidic ionic liquids in the dissolution and depolymerization of lignin from rice husk into high value-added products. *Ind Crops Prod*. 2020;157:112885.
28. Cho EJ, Trinh LTP, Song Y, Lee YG, Bae HJ. Bioconversion of biomass waste into high value chemicals. *Bioresour Technol*. 2020;298:122386.

29. Mahmood N, Yuan Z, Schmidt J, Xu CC. Depolymerization of lignins and their applications for the preparation of polyols and rigid polyurethane foams: A review. *Renew Sustain Energy Rev.* 2016;60:317–29.
30. Ahmad Khorairi ANS, Sofian-Seng NS, Othaman R, Abdul Rahman H, Mohd Razali NS, Lim SJ, et al. A review on agro-industrial waste as cellulose and nanocellulose source and their potentials in food applications. *Food Rev Int.* 2021;1–26.
31. Carvalho AFA, de Oliva Neto P, Da Silva DF, Pastore GM. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Res Int.* 2013;51(1):75–85.
32. Su Z, Luo J, Li X, Pinelo M. Enzyme membrane reactors for production of oligosaccharides: A review on the interdependence between enzyme reaction and membrane separation. *Sep Purif Technol.* 2020;243:116840.
33. Gullón P, Moura P, Esteves MP, Girio FM, Domínguez H, Parajó JC. Assessment on the fermentability of xylooligosaccharides from rice husks by probiotic bacteria. *J Agric Food Chem.* 2008;56(16):7482–7.
34. Wang M, Zhan Y, Zhao J, Li Z. Pretreatment of moso bamboo with p-toluenesulfonic acid for the recovery and depolymerization of hemicellulose. *Bioresour Technol.* 2023;378:129006.
35. Galbe M, Wallberg O. Pretreatment for biorefineries: a review of common methods for efficient utilisation of lignocellulosic materials. *Biotechnol Biofuels.* 2019;12:1–26.
36. Khat-Udomkiri N, Sivamaruthi BS, Sirilun S, Lailerd N, Peerajan S, Chaiyasut C. Optimization of alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis for the extraction of xylooligosaccharide from rice husk. *AMB Express.* 2018;8(1):1–10.
37. Yan F, Tian S, Chen H, Gao S, Dong X, Du K. Advances in xylooligosaccharides from grain byproducts: Extraction and prebiotic effects. *Grain Oil Sci Technol.* 2022;
38. Yu J, Zhang J, He J, Liu Z, Yu Z. Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. *Bioresour Technol.* 2009;100(2):903–8.
39. Yang CY, Sheih IC, Fang TJ. Fermentation of rice hull by *Aspergillus japonicus* under ultrasonic pretreatment. *Ultrason Sonochem.* 2012;19(3):687–91.
40. Naidu DS, Hlangothi SP, John MJ. Bio-based products from xylan: A review. *Carbohydr Polym.* 2018;179:28–41.
41. Matsakas L, Raghavendran V, Yakimenko O, Persson G, Olsson E, Rova U, et al. Lignin-first biomass fractionation using a hybrid organosolv–Steam explosion pretreatment technology improves the saccharification and fermentability of spruce biomass. *Bioresour Technol.* 2019;273:521–8.
42. Olsson J, Novy V, Nielsen F, Wallberg O, Galbe M. Sequential fractionation of the lignocellulosic components in hardwood based on steam explosion and hydrotropic extraction. *Biotechnol Biofuels.* 2019;12(1):1–12.

43. Li W, Zheng P, Guo J, Ji J, Zhang M, Zhang Z, et al. Characteristics of self-alkalization in high-rate denitrifying automatic circulation (DAC) reactor fed with methanol and sodium acetate. *Bioresour Technol.* 2014;154:44–50.
44. Martín-Lara M, Chica-Redecillas L, Pérez A, Blázquez G, Garcia-Garcia G, Calero M. Liquid hot water pretreatment and enzymatic hydrolysis as a valorization route of Italian green pepper waste to delivery free sugars. *Foods.* 2020;9(11):1640.
45. Sun D, Sun SC, Wang B, Sun SF, Shi Q, Zheng L, et al. Effect of various pretreatments on improving cellulose enzymatic digestibility of tobacco stalk and the structural features of co-produced hemicelluloses. *Bioresour Technol.* 2020;297:122471.
46. Zhang X, Zhang W, Lei F, Yang S, Jiang J. Coproduction of xylooligosaccharides and fermentable sugars from sugarcane bagasse by seawater hydrothermal pretreatment. *Bioresour Technol.* 2020;309:123385.
47. Nitsos C, Matsakas L, Triantafyllidis K, Rova U, Christakopoulos P. Investigation of different pretreatment methods of Mediterranean-type ecosystem agricultural residues: characterisation of pretreatment products, high-solids enzymatic hydrolysis and bioethanol production. *Biofuels.* 2018;9(5):545–58.
48. Martínez CM, Cantero DA, Cocero M. Production of saccharides from sugar beet pulp by ultrafast hydrolysis in supercritical water. *J Clean Prod.* 2018;204:888–95.
49. Simangunsong E, Ziegler-Devin I, Chrusciel L, Girods P, Wistara N, Brosse N. Steam explosion of beech wood: effect of the particle size on the xylans recovery. *Waste Biomass Valorization.* 2020;11(2):625–33.
50. Scapini T, Dos Santos MS, Bonatto C, Wancura JH, Mulinari J, Camargo AF, et al. Hydrothermal pretreatment of lignocellulosic biomass for hemicellulose recovery. *Bioresour Technol.* 2021;342:126033.
51. Chen H, Liu J, Chang X, Chen D, Xue Y, Liu P, et al. A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. *Fuel Process Technol.* 2017;160:196–206.
52. de Freitas C, Carmona E, Brienzo M. Xylooligosaccharides production process from lignocellulosic biomass and bioactive effects. *Bioact Carbohydr Diet Fibre.* 2019;18:100184.
53. Muthuvelu KS, Rajarathinam R, Kanagaraj LP, Ranganathan RV, Dhanasekaran K, Manickam NK. Evaluation and characterization of novel sources of sustainable lignocellulosic residues for bioethanol production using ultrasound-assisted alkaline pretreatment. *Waste Manag.* 2019;87:368–74.
54. Hilares RT, Dionízio R, Prado C, Ahmed M, Da Silva S, Santos J. Pretreatment of sugarcane bagasse using hydrodynamic cavitation technology: Semi-continuous and continuous process. *Bioresour Technol.* 2019;290:121777.
55. Aachary AA, Prapulla SG. Value addition to corncob: production and characterization of xylooligosaccharides from alkali pretreated lignin-saccharide complex using *Aspergillus oryzae* MTCC 5154. *Bioresour Technol.* 2009;100(2):991–5.

56. Jayapal N, Samanta A, Kolte AP, Senani S, Sridhar M, Suresh K, et al. Value addition to sugarcane bagasse: xylan extraction and its process optimization for xylooligosaccharides production. *Ind Crops Prod.* 2013;42:14–24.
57. Samanta A, Senani S, Kolte AP, Sridhar M, Sampath K, Jayapal N, et al. Production and in vitro evaluation of xylooligosaccharides generated from corn cobs. *Food Bioprod Process.* 2012;90(3):466–74.
58. Poletto P, Pereira GN, Monteiro CR, Pereira MAF, Bordignon SE, de Oliveira D. Xylooligosaccharides: transforming the lignocellulosic biomasses into valuable 5-carbon sugar prebiotics. *Process Biochem.* 2020;91:352–63.
59. Hilares RT, Dionízio RM, Muñoz SS, Prado CA, de Sousa Júnior R, da Silva SS, et al. Hydrodynamic cavitation-assisted continuous pre-treatment of sugarcane bagasse for ethanol production: effects of geometric parameters of the cavitation device. *Ultrason Sonochem.* 2020;63:104931.
60. Chaturvedi T, Hulkko LSS, Fredsgaard M, Thomsen MH. Extraction, Isolation, and Purification of Value-Added Chemicals from Lignocellulosic Biomass. *Processes.* 2022;10(9):1752.
61. Huang C, Wang X, Liang C, Jiang X, Yang G, Xu J, et al. A sustainable process for procuring biologically active fractions of high-purity xylooligosaccharides and water-soluble lignin from Moso bamboo prehydrolyzate. *Biotechnol Biofuels.* 2019;12(1):1–13.
62. Singh RS, Singhania RR, Pandey A, Larroche C. Biomass, biofuels, biochemicals: advances in enzyme technology. Elsevier; 2019.
63. Wijaya H, Sasaki K, Kahar P, Rahmani N, Hermiati E, Yopi Y, et al. High enzymatic recovery and purification of xylooligosaccharides from empty fruit bunch via nanofiltration. *Processes.* 2020;8(5):619.
64. Buruiana CT, Gómez B, Vizireanu C, Garrote G. Manufacture and evaluation of xylooligosaccharides from corn stover as emerging prebiotic candidates for human health. *LWT.* 2017;77:449–59.
65. Chapla D, Pandit P, Shah A. Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. *Bioresour Technol.* 2012;115:215–21.
66. Moniz P, Pereira H, Duarte LC, Carvalheiro F. Hydrothermal production and gel filtration purification of xylo-oligosaccharides from rice straw. *Ind Crops Prod.* 2014;62:460–5.
67. Lau CS, Clausen EC, Lay JO, Gidden J, Carrier DJ. Separation of xylose oligomers using centrifugal partition chromatography with a butanol–methanol–water system. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2013;40(1):51–62.
68. Chen MH, Bowman MJ, Cotta MA, Dien BS, Iten LB, Whitehead TR, et al. *Miscanthus* × *giganteus* xylooligosaccharides: Purification and fermentation. *Carbohydr Polym.* 2016;140:96–103.
69. Marim AVC, Gabardo S. Xylooligosaccharides: prebiotic potential from agro-industrial residue, production strategies and prospects. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2021;37:102190.

70. de Oliveira MG, Forte MBS, Franco TT. A serial membrane-based process for fractionation of xylooligosaccharides from sugarcane straw hydrolysate. *Sep Purif Technol.* 2021;278:119285.
71. Conidi C, Cassano A, Drioli E. Membrane diafiltration for enhanced purification of biologically active compounds from goji berries extracts. *Sep Purif Technol.* 2022;282:119991.
72. Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Lab Anal Proced.* 2010;(TP-510-42618).
73. Efrinalia W, Novia N, Melwita E. Kinetic Model for Enzymatic Hydrolysis of Cellulose from Pre-Treated Rice Husks. *Fermentation.* 2022;8(9):417.
74. Pinales-Márquez CD, Rodríguez-Jasso RM, Araújo RG, Loredó-Trevino A, Nabarlantz D, Gullón B, et al. Circular bioeconomy and integrated biorefinery in the production of xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass: A review. *Ind Crops Prod.* 2021;162:113274.
75. Peanparkdee M, Patrawart J, Iwamoto S. Physicochemical stability and in vitro bioaccessibility of phenolic compounds and anthocyanins from Thai rice bran extracts. *Food Chem.* 2020;329:127157.
76. Lee JY, Kim MH, Kim JS, Yun BR, Kim DY, Chung CW. Biotransformation of d-Xylose-Rich Rice Husk Hydrolysate by a Rice Paddy Soil Bacterium, *Priestia* sp. Strain JY310, to Low Molecular Weight Poly (3-hydroxybutyrate). *Biomolecules.* 2023;13(1):131.
77. Klangpetch W, Pattarapisitporn A, Phongthai S, Utama-Ang N, Laokuldilok T, Tangjaidee P, et al. Microwave-assisted enzymatic hydrolysis to produce xylooligosaccharides from rice husk alkali-soluble arabinoxylan. *Sci Rep.* 2022;12(1):11.
78. Zhang H, Zhao X, Ding X, Lei H, Chen X, An D, et al. A study on the consecutive preparation of d-xylose and pure superfine silica from rice husk. *Bioresour Technol.* 2010;101(4):1263–7.
79. Della VP, Kühn I, Hotza D. Rice husk ash as an alternate source for active silica production. *Mater Lett.* 2002;57(4):818–21.
80. Chundawat NS, Parmar BS, Deuri AS, Vaidya D, Jadoun S, Zarrintaj P, et al. Rice husk silica as a sustainable filler in the tire industry. *Arab J Chem.* 2022;15(9):104086.
81. Wang Y, Wu J, Lin N, Liu D, Liu Z, Lin H. Enabling stable cycling performance with rice husk silica positive additive in lead-acid battery. *Energy.* 2023;269:126796.
82. Bilba K, Arsène MA, Ouensanga A. Sugar cane bagasse fibre reinforced cement composites. Part I. Influence of the botanical components of bagasse on the setting of bagasse/cement composite. *Cem Concr Compos.* 2003;25(1):91–6.
83. Terán-Hilares R, Reséndiz AL, Martínez RT, Silva S, Santos J. Successive pretreatment and enzymatic saccharification of sugarcane bagasse in a packed bed flow-through column reactor aiming to support biorefineries. *Bioresour Technol.* 2016;203:42–9.

84. Bazargan A, Wang Z, Barford JP, Saleem J, McKay G. Optimization of the removal of lignin and silica from rice husks with alkaline peroxide. *J Clean Prod.* 2020;260:120848.
85. Dagnino EP, Felissia FE, Chamorro E, Area MC. Studies on lignin extraction from rice husk by a soda-ethanol treatment: Kinetics, separation, and characterization of products. *Chem Eng Res Des.* 2018;129:209–16.
86. Kim I, Han JI. Optimization of alkaline pretreatment conditions for enhancing glucose yield of rice straw by response surface methodology. *Biomass Bioenergy.* 2012;46:210–7.
87. Wu H, Dai X, Zhou SL, Gan YY, Xiong ZY, Qin YH, et al. Ultrasound-assisted alkaline pretreatment for enhancing the enzymatic hydrolysis of rice straw by using the heat energy dissipated from ultrasonication. *Bioresour Technol.* 2017;241:70–4.
88. Moniz P, Pereira H, Quilhó T, Carvalheiro F. Characterisation and hydrothermal processing of corn straw towards the selective fractionation of hemicelluloses. *Ind Crops Prod.* 2013;50:145–53.
89. Vega FER, Muñoz SS, Gonçalves IS, Hilares FT, Balbino TR, Forte MBS, et al. Carbohydrates valorization of Quinoa (*Chenopodium quinoa*) stalk in xylooligosaccharides and carotenoids as emergent biomolecules. *Ind Crops Prod.* 2023;194:116274.
90. Mänttari M, Pihlajamäki A, Nyström M. Effect of pH on hydrophilicity and charge and their effect on the filtration efficiency of NF membranes at different pH. *J Membr Sci.* 2006;280(1–2):311–20.
91. Marcondes WF, Milagres AM, Arantes V. Co-production of xylo-oligosaccharides, xylose and cellulose nanofibrils from sugarcane bagasse. *J Biotechnol.* 2020;321:35–47.
92. Swart LJ, Bedzo OK, van Rensburg E, Görgens JF. Intensification of Xylo-oligosaccharides Production by Hydrothermal Treatment of Brewer's Spent Grains: The Use of Extremely Low Acid Catalyst for Reduction of Degradation Products Associated with High Solid Loading. *Appl Biochem Biotechnol.* 2021;193:1979–2003.
93. Wang J, Sun B, Cao Y, Tian Y, Wang C. Enzymatic preparation of wheat bran xylooligosaccharides and their stability during pasteurization and autoclave sterilization at low pH. *Carbohydr Polym.* 2009;77(4):816–21.

ANEXOS

Anexo 1. Galería fotográfica de los experimentos realizados para la obtención de XOS.



Figura 24. Muestra de cascarilla de arroz seca.



Figura 25. Cascarilla de arroz con pretratamiento, molido y seco.



Figura 26. Pretratamiento ácido de la cascarilla de arroz.



Figura 27. Experimentos de extracción alcalina para extracción de hemicelulosa.



Figura 28. Muestra de cascarilla de arroz para hidrolisis térmica en reactor Parr.



Figura 29. Hidrolisis térmica en reactor Parr no agitado.



Figura 30. Hidrolisis térmica en reactor Parr de 2L con agitación.



Figura 31. Purificación de XOS por ultra y nano filtración por membranas.

Anexo 2. Resultados del ANOVA de la hidrólisis alcalina asistida con US obtenida del Software Design Expert.

Tabla 14. Sugerencia de modelo matemático de acuerdo con los resultados ingresados al Software DX.

Source	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R ²	Predicted R ²	
Linear	0.0002	0.4483	0.7644	0.6304	
2FI	0.0053	0.9157	0.9286	0.8951	Suggested
Quadratic	0.8319	0.8008	0.9026	0.7587	
Cubic	0.8008		0.8396		Aliased

Tabla 15. Análisis ANOVA del diseño experimental de la hidrólisis alcalina asistida con US.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	0.5588	6	0.0931	31.34	< 0.0001	significant
A- Concentracion	0.0544	1	0.0544	18.29	0.0027	
B-Tiempo	0.4193	1	0.4193	141.11	< 0.0001	
C-potencia	0.0011	1	0.0011	0.3614	0.5643	
AB	0.0458	1	0.0458	15.42	0.0044	
AC	0.0089	1	0.0089	3.01	0.1211	
BC	0.0293	1	0.0293	9.85	0.0138	
Residual	0.0238	8	0.0030			
Lack of Fit	0.0104	6	0.0017	0.2603	0.9157	not significant
Pure Error	0.0133	2	0.0067			
Cor Total	0.5826	14				

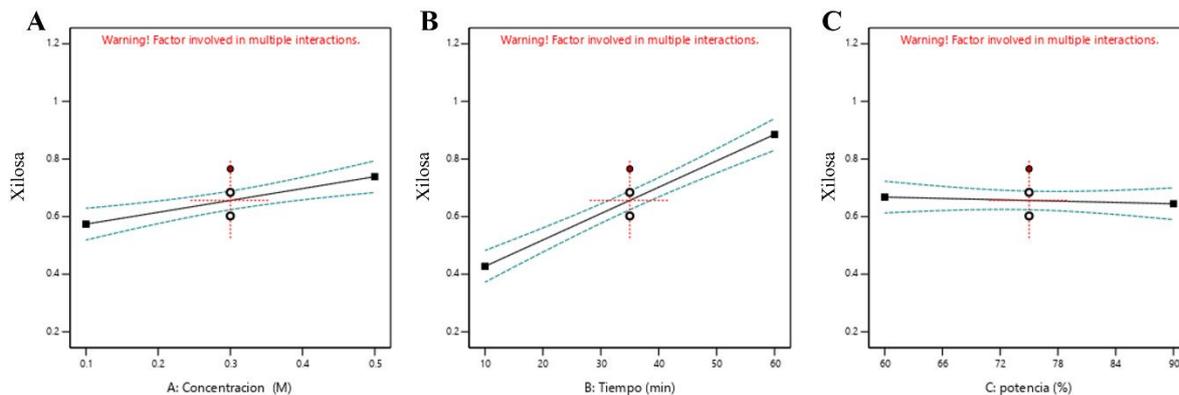


Figura 32. Graficas de interacción de variables (A) Concentración de NaOH, (B) Tiempo y (C) Potencia de US tomados del Software DX con la caracterización de la Xilosa

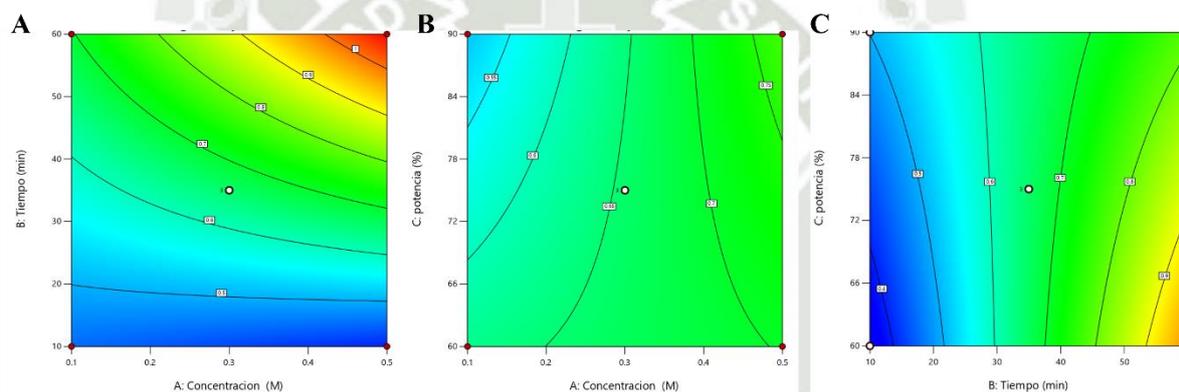


Figura 33. Representación 2D de la superficie de respuesta entre variables. (A) Tiempo vs Concentración. (B) Potencia vs Concentración. (C) Potencia vs Tiempo.

Anexo 3. Resultados del análisis ANOVA de la extracción alcalina de hemicelulosa de la cascarilla de arroz tomado del Software DX.

Tabla 16. Sugerencia de modelo matemático de acuerdo con resultados obtenido del Software DX.

Source	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R ²	Predicted R ²	
Linear	Linear	0.0009	0.1888	0.7005	0.5626
2FI	2FI	0.2826	0.1990	0.7375	0.4814
Quadratic	Quadratic	0.0151	0.6428	0.9397	0.8024
Cubic	Cubic	0.6428		0.9251	

Tabla 17. Resultados del análisis ANOVA de la extracción alcalina de hemicelulosa obtenida del Software DX.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	82206.40	9	9134.04	25.24	0.0012	significant
A-Concentración NaOH	52736.48	1	52736.48	145.71	< 0.0001	
B-Temperatura	10252.15	1	10252.15	28.33	0.0031	
C-Tiempo	1253.84	1	1253.84	3.46	0.1218	
AB	6442.83	1	6442.83	17.80	0.0083	
AC	192.38	1	192.38	0.5316	0.4987	
BC	537.71	1	537.71	1.49	0.2772	
A²	5.61	1	5.61	0.0155	0.9058	
B²	8450.19	1	8450.19	23.35	0.0047	
C²	2871.07	1	2871.07	7.93	0.0373	
Residual	1809.58	5	361.92			
Lack of Fit	910.98	3	303.66	0.6758	0.6428	not significant
Pure Error	898.61	2	449.30			
Cor Total	84015.98	14				

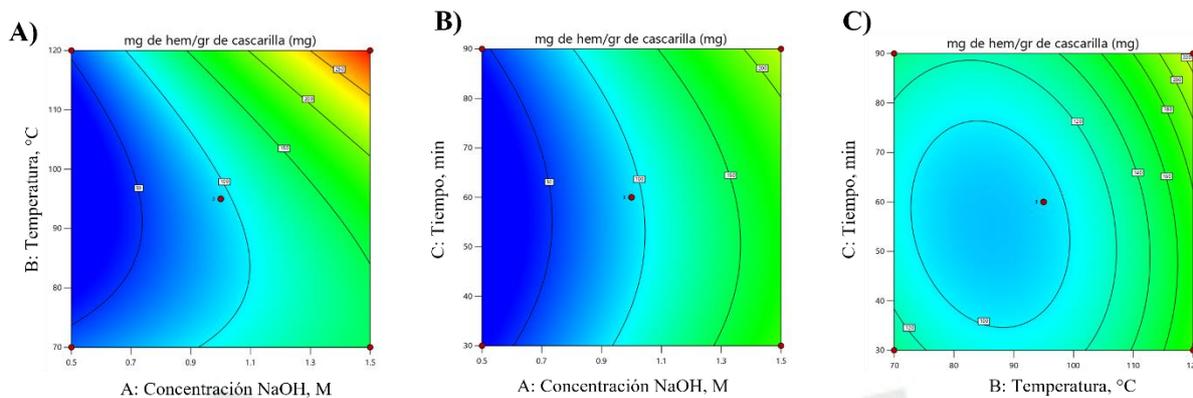


Figura 34. Representación gráfica en 2D de la superficie de respuesta de la extracción alcalina de hemicelulosa (A) Temperatura vs Concentración NaOH. (B) Tiempo vs Concentración de NaOH. (C) Tiempo vs Temperatura.

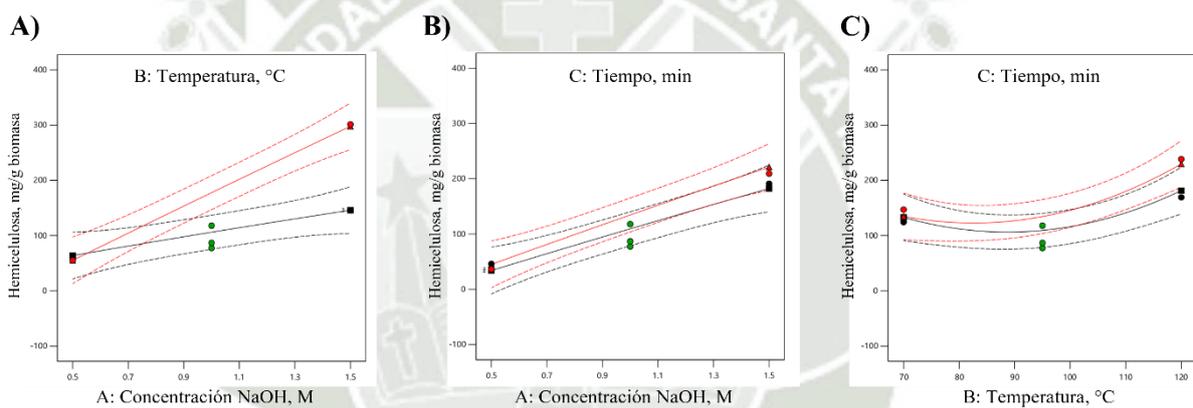


Figura 35. Interacción de variables. (A) Temperatura vs Concentración NaOH. (B) Tiempo vs Concentración NaOH. (C) Tiempo vs Temperatura.

Anexo 4. Retención de Compuestos fenólicos y Estabilización térmica de la purificación de XOS.

Tabla 18. Concentración de compuestos fenólicos retenidos de la purificación de XOS por filtración.

Tiempo, min	Temperatura, °C	Absorbancia (λ: 755 nm)	Concentración de Compuestos fenólicos, mg/L		Compuestos fenólicos, g/L	promedio	DE
0	63	0.633	2739.97	2.74	2.69	0.046	
		0.613	2654.01	2.65			
		0.616	2666.91	2.67			
5	63	0.599	2593.84	2.59	2.60	0.015	
		0.603	2611.03	2.61			
		0.596	2580.95	2.58			
10	63	0.672	2907.59	2.91	2.92	0.013	
		0.676	2924.79	2.92			
		0.678	2933.38	2.93			
15	63	0.476	2065.19	2.07	2.03	0.032	
		0.461	2000.72	2.00			
		0.469	2035.10	2.04			
20	63	0.663	2868.91	2.87	2.93	0.0513	
		0.685	2963.47	2.96			
		0.682	2950.57	2.95			
25	63	0.757	3272.92	3.27	3.21	0.2612	
		0.795	3436.25	3.44			
		0.676	2924.79	2.92			
30	63	0.69	2984.96	2.98	2.98	0.0065	
		0.691	2989.26	2.99			
		0.688	2976.36	2.98			
0.25	72	0.689	2980.66	2.98	3.01	0.0641	
		0.684	2959.17	2.96			
		0.712	3079.51	3.08			
15	120	0.713	3083.81	3.08	3.14	0.0703	
		0.745	3221.35	3.22			
		0.723	3126.79	3.13			

Tabla 19. Estabilización térmica en la producción de XOS.

Tiempo, min	X1	X2	X3	X4
0	3.64	3.19	2.02	0.51
5	3.22	2.85	1.83	0.57
10	3.65	3.21	2.02	0.51
15	2.55	2.25	1.39	0.47
20	3.68	3.21	2.03	0.52
25	3.71	3.23	2.03	0.51
30	3.65	3.21	2.02	0.51
0.25	3.64	3.20	2.03	0.52
15	3.68	3.13	2.08	0.59