

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



**EVALUACIÓN DEL PROCESO HIDROTÉRMICO PARA LA HIDRÓLISIS DE LA
FRACCIÓN DE HEMICELULOSA DE RESIDUOS DE CEBOLLA (*Allium cepa*) Y
MAÍZ (*Zea mays*) Y POSTERIOR PURIFICACIÓN CON MEMBRANAS DE LOS
XILOOLIGOSACÁRIDOS (XOS) PRODUCIDOS**

Tesis presentada por la Bachiller:

Pacosonco Paredes, Alejandra Susana

Para optar por el Título Profesional de

Ingeniera Biotecnóloga

Asesor:

PhD. Terán Hilares Ruly

Arequipa – Perú

2024

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 06 de Diciembre del 2023

Dictamen: 006168-C-EPIB-2023

Visto el borrador del expediente 006168, presentado por:

2016241862 - PACOSONCO PAREDES ALEJANDRA SUSANA

Titulado:

EVALUACIÓN DEL PROCESO HIDROTÉRMICO PARA LA HIDRÓLIS DE LA FRACCIÓN DE HEMICELULOSA DE RESIDUOS DE CEBOLLA (ALLIUM CEPA) Y MAÍZ (ZEA MAYS) Y POSTERIOR PURIFICACIÓN CON MEMBRANAS DE LOS XILOOLIGOSACÁRIDOS (XOS) PRODUCIDOS

Nuestro dictamen es:

APROBADO

**29520165 - TORRES VELA FERNANDO ANTERO
DICTAMINADOR**



**29280938 - BARDALES ALVAREZ ROXANA MARGARITA
DICTAMINADOR**



**43668681 - PAREDES FUENTES JULITZA LINDSEY
DICTAMINADOR**



EVALUACIÓN DEL PROCESO HIDROTÉRMICO PARA LA HIDRÓLISIS DE LA FRACCIÓN DE HEMICELULOSA DE RESIDUOS DE CEBOLLA (*Allium cepa*) Y MAÍZ (*Zea mays*) Y POSTERIOR PURIFICACIÓN CON MEMBRANAS DE LOS XILOOLIGOSACÁRI

INFORME DE ORIGINALIDAD

3%

INDICE DE SIMILITUD

3%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

1%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

repositorio.ucsm.edu.pe

Fuente de Internet

2%

2

cdn.www.gob.pe

Fuente de Internet

1%

3

repositorio.uchile.cl

Fuente de Internet

1%

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias < 1%

Excluir bibliografía

Apagado



Dedicatoria

A Dios, mis padres y a cada persona presente, realmente, en mis mejores y peores momentos.

Agradecimientos

A Dios por su guía y cuidado, por guardar cada uno de mis deseos y miedos, por mostrarme el camino a veces de maneras inusuales y por darme todo lo que tengo.

A mi familia, tanto a mis padres, Susana y Eduardo, como a mi hermano Joaquín, por su compañía, amor, confianza y calidez. Por ser tan fuertes e inspirarme a buscar y soñar más allá del horizonte.

A Miguel, por estar ahí, por la infinita paciencia, cariño y amor. Por creer en mí, por apoyar y celebrar todos mis sueños.

Al doctor Ruly, por ser un gran mentor, por la confianza y comprensión otorgada en cada etapa de trabajo realizada.

A todos los miembros del Laboratorio de Bioprocesos, por cada mañana, tarde y noche de trabajo, donde nunca faltaron las risas, amistad y las playlists variadas. Gracias a cada uno por cada momento, experiencia y conocimiento compartido.

ÍNDICE GENERAL

<i>Dedicatoria</i>	iii
<i>Agradecimientos</i>	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN	xiv
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS.....	6
OBJETIVOS	7
OBJETIVO GENERAL	7
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
TABLA DE VARIABLES E INDICADORES	8
CAPÍTULO I	9
1. MARCO TEÓRICO	9
1.1. Cebolla	9
1.1.1. Importancia del cultivo	9
1.1.2. Producción	9
1.1.3. Generación de residuos	10
1.2. Maíz Blanco Urubamba (Blanco Gigante Cusco).....	11
1.2.1. Importancia del cultivo	11

1.2.2.	Producción	11
1.2.3.	Generación de residuos	12
1.3.	Biomasa lignocelulósica.....	12
1.3.1.	Lignina	13
1.3.2.	Celulosa.....	14
1.3.3.	Hemicelulosa.....	14
1.3.3.1.	<i>Purificación fraccionada de hemicelulosas</i>	15
1.4.	Xilooligosacáridos (XOS).....	18
1.5.	Producción de XOS.....	18
1.5.1.	Primera estrategia: Procesos de una sola etapa.....	19
1.5.2.	Segunda estrategia: Procesos que combinan dos etapas	21
1.5.2.1.	<i>Etapa I: Pretratamiento</i>	21
1.5.2.2.	<i>Etapa II: Hidrólisis enzimática</i>	22
1.5.3.	<i>Downstream</i> o purificación de XOS	23
CAPÍTULO II.....		25
2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
1.1.	Lugar de ejecución	25
1.2.	Materiales	25
1.2.1.	Insumos	25
1.2.2.	Reactivos químicos	25
1.2.3.	Materiales de laboratorio (vidrio, porcelana, metal, etc.)	25

1.2.4.	Aparatos y equipos.....	26
1.2.5.	Software	27
1.3.	Métodos.....	28
1.3.1.	Producción de XOS a partir de hojas de Cebolla (<i>Allium cepa L.</i>).....	28
1.3.1.1.	<i>Obtención y caracterización composicional de hojas de cebolla</i>	28
1.3.1.2.	<i>Tratamiento Hidrotermal de hojas de cebolla</i>	37
1.3.2.	Producción de XOS a partir de pancas de Maíz Blanco Urubamba (Blanco Gigante Cusco) (<i>Zea mays</i>)	39
1.3.2.1.	<i>Obtención y caracterización composicional de pancas de maíz</i>	39
1.3.2.2.	<i>Tratamiento hidrotermal de pancas de maíz</i>	44
1.4.	Diagrama de flujo de actividades.....	51
1.4.1.	<i>Producción de XOS a partir de hojas de cebolla</i>	51
1.4.2.	<i>Producción de XOS a partir de pancas de maíz</i>	51
CAPÍTULO III.....		52
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
3.1.	Producción de XOS a partir de hojas de Cebolla (<i>Allium cepa L.</i>).....	52
3.1.1.	<i>Caracterización composicional de hojas de cebolla</i>	52
3.1.2.	<i>Tratamiento Hidrotermal de hojas de cebolla para producción de XOS</i>	56
3.2.	Producción de XOS a partir de pancas de Maíz Blanco Urubamba (Blanco Gigante Cusco) (<i>Zea mays</i>).....	59
4.2.1.	<i>Caracterización composicional de pancas de maíz</i>	59
4.2.2.	<i>Tratamiento hidrotermal de pancas de maíz para producción de XOS</i>	64

CONCLUSIONES	88
RECOMENDACIONES	89
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variables e Indicadores.....	8
Tabla 2. Composición química de hojas de cebolla. Nota: autoría propia.	52
Tabla 3. Porcentaje de hemicelulosa cruda recuperada en el proceso alcalino. Nota: autoría propia.	53
Tabla 4. Resultados de las pruebas realizadas a los hidrolizados obtenidos en diferentes tiempos. Nota: autoría propia.....	56
Tabla 5. Comparación de la composición química de la fibra lignocelulósica analizada (pancas de maíz). NR: no reportado. Nota: autoría propia.	60
Tabla 6. Porcentaje de hemicelulosa cruda recuperada en el proceso alcalino. Nota: autoría propia.	61
Tabla 7. Resultados de las pruebas realizadas a los hidrolizados obtenidos en diferentes tiempos. Nota: autoría propia.....	64
Tabla 8. Resultados obtenidos de las pruebas realizadas a los hidrolizados obtenidos a diferentes temperaturas. Nota: autoría propia.	65
Tabla 9. Resultados de las pruebas realizadas al hidrolizado obtenido en las mejores condiciones. Nota: autoría propia.	66
Tabla 10. Contenido de xilosa y XOS en los hidrolizados obtenidos en diferentes tiempos. Nota: autoría propia	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Obtención (a y b) y preparación (c y d) de hojas de cebolla. Nota: autoría propia..	28
Figura 2. Extracción Soxhlet. (a) Sistema completo armado, (b) Sobres de papel filtro que contenían la muestra en polvo. Nota: autoría propia.	30
Figura 3. Determinación de carbohidratos estructurales y lignina; (a) Material libre de extractivos, (b) Incubación a 30°C, (c) Dilución del ácido hasta una concentración del 4%. Nota: autoría propia.	31
Figura 4. Extracción de hemicelulosas de hojas de cebolla; (a) Fracciones líquidas recuperadas del tratamiento alcalino, (b) Extractos luego del cambio de pH y la adición de etanol, (c) primer y (d) segundo cambio de etanol, el precipitado se recuperó posteriormente. Nota: autoría propia.	36
Figura 5. Equipo de FTIR y accesorios empleados para el análisis de hemicelulosa cruda obtenida. Nota: autoría propia.....	37
Figura 6. Reactores Parr sin agitación empleados para el tratamiento hidrotérmico de los residuos. Nota: autoría propia.	38
Figura 7. Cromatógrafo Líquido de Ultra Alto Rendimiento (UHPLC) utilizado para la cuantificación de xilosa y XOS. Nota: autoría propia.	38
Figura 8. Preparación de residuos de maíz. (a) Pancas de maíz secas, (b) Molienda de pancas de maíz. Nota: autoría propia.....	39
Figura 9. Extracción Soxhlet para las pancas de maíz. Nota: autoría propia.....	40
Figura 10. Determinación de carbohidratos estructurales y lignina; (a) Material libre de extractivos, (b.) Adición de H ₂ SO ₄ al 72% p/p, (c) Muestras al culminar la incubación de 60 minutos. Nota: autoría propia.	41

Figura 11. Extracción de hemicelulosas de pancas de maíz; (a) Extractos luego del cambio de pH y la adición de etanol, (b) primer cambio de etanol y (c) muestras luego de 24 h, el precipitado se recuperó posteriormente. Nota: autoría propia.44

Figura 12. Tratamiento hidrotermal en reactor Parr agitado; (a) Equipo Parr con agitación (b) filtración de extractos obtenidos en diferentes tiempos de reacción. Nota: autoría propia.46

Figura 13. Sistema de filtración por membranas asistido con inyección de gas nitrógeno. Nota: autoría propia.47

Figura 14. Retención de compuestos fenólicos; Extracto obtenido en 30 minutos a 180°C (a), Filtración del extracto a través de papel filtro Whatman 40 (b), Activación de cartucho C18 (c), primer (d) y segundo (e) paso del extracto a través de cartucho C18. Nota: autoría propia....49

Figura 15. Obtención de XOS a partir de hojas de cebolla. Nota: autoría propia.51

Figura 16. Obtención de XOS a partir de pancas de maíz. Nota: autoría propia.....51

Figura 17. Sólidos recuperados de hemicelulosa cruda luego de su aislamiento a partir de hojas de cebolla. Nota: autoría propia.....54

Figura 18. Espectro FT-IR de hemicelulosa nativa. Adaptado de Salam et al. ⁵³.....55

Figura 19. Espectros de Infrarrojo correspondientes a los sólidos recuperados sometidos a tratamiento alcalino con NaOH a 0.5 M (a), 1.5 M (b), 2,5 M (c). Nota: autoría propia.55

Figura 20. Concentración de XOS obtenida bajo diferentes tiempos de reacción a una temperatura constante de 180°C. Nota: autoría propia.57

Figura 21. Diferencias en la composición lignocelulósica de residuos de cebolla y maíz.61

Figura 22. Sólidos recuperados de hemicelulosa cruda luego de su aislamiento a partir de pancas de maíz. Nota: autoría propia.....62

Figura 23. Espectro FTIR de hemicelulosa nativa. Adaptado de Tian et al. ⁶⁸.....63

Figura 24. Espectro de Infrarrojo correspondiente al sólido recuperado sometido a tratamiento alcalino con NaOH al 9% p/v. Nota: autoría propia.64

Figura 25. Concentración de XOS obtenida bajo diferentes temperaturas de reacción en un tiempo constante de 75 min. Nota: autoría propia.	65
Figura 26. Extracto obtenido (a), alícuotas del extracto en viales para su análisis por HPLC (b). Nota: autoría propia.	66
Figura 27. Extractos obtenidos en diferentes tiempos de reacción (a), filtros de jeringa de cartuchos de tratamiento C18 (b) y viales de los extractos obtenidos en diferentes tiempos (c). Nota: autoría propia.	67
Figura 28. Concentración de XOS obtenida bajo diferentes tiempos de reacción a una temperatura constante de 180°C. Nota: autoría propia.	67
Figura 29. Filtración con diferentes pH para la concentración del extracto obtenido. Nota: autoría propia.	71
Figura 30. Flujo respecto al tiempo para los diferentes valores de pH evaluados. Nota: autoría propia.	72
Figura 31. Concentración del extracto obtenido en reactores Parr no agitados. Nota: autoría propia.	75
Figura 32. Flujo de volumen de la primera (a), segunda (b) y tercera (c) etapa de filtración por membranas poliméricas. Nota: autoría propia.	76
Figura 33. Etapa inicial para la concentración del extracto obtenido del reactor Parr de 2 L. Nota: autoría propia.	77
Figura 34. Filtración por membranas del extracto sometido a retención de compuestos fenólicos, por duplicado (a) y (b). Nota: autoría propia.	79
Figura 35. Flujos de volumen de la primera (a) y segunda (b) etapa de filtración por membranas poliméricas. Nota: autoría propia.	80
Figura 36. Proceso de NF (600-800 Da) a pH 7 del extracto no sometido a retención de compuestos fenólicos. Nota: autoría propia.	81

Figura 37. Primera filtración por membranas del extracto no sometido a retención de compuestos fenólicos. Nota: autoría propia.....83

Figura 38. Flujos de volumen de la primera (a), segunda (b), tercera (c) y cuarta (d) etapa de filtración por membranas poliméricas. Nota: autoría propia.84



RESUMEN

Los residuos agrícolas y agroindustriales se componen principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina. La hemicelulosa puede ser hidrolizada parcialmente para la producción de xilooligosacáridos (XOS), prebióticos emergentes que destacan entre otros por su gran estabilidad a altas temperaturas (mayores a 100°C) y a diferentes niveles de pH (en el rango de 2,5-8). Las hojas de cebolla utilizadas se componían de 26,40% de celulosa, 5,05% de hemicelulosa y 5,37% de lignina y las pancas de maíz de 34,06% de celulosa, 31,70% de hemicelulosa y 4,65% de lignina. Después del tratamiento hidrotermal bajo las mejores condiciones (50 min a 180°C) en reactores Parr sin agitación, se obtuvo un extracto con 0,9 g de XOS por 100 g de hojas de cebolla. En el caso de las pancas de maíz, en reactores sin agitación (75 min a 180°C), se obtuvo 4,8 g de XOS por 100 g de material y en el reactor con agitación (30 min a 180°C) se obtuvo 3,1 g de XOS por 100 g de material. El hidrolizado de pancas de maíz obtenido en 75 min fue sometido a operaciones combinadas de UF (10 kDa a pH 7) y NF (500 Da a pH 4 y 150-300 Da a pH 4 y pH 7), concentrándose aproximadamente en el retentado final 89% y 67% del total de XOS a pH 4 y pH 7, respectivamente. En el caso del hidrolizado de maíz obtenido en 30 min, un proceso previo, aplicado a una fracción del hidrolizado, logró retener aproximadamente 85% de compuestos fenólicos en columnas C18, pero también 47% del total de XOS. Esto favoreció un proceso de filtración por membranas con menos etapas, empleando solo operaciones de NF (600-800 Da a pH 7 y 150 Da a pH 3,73), concentrándose en el retentado final aproximadamente 94% del total de XOS. La fracción no sometida a retención de compuestos fenólicos requirió operaciones combinadas de UF (10 kDa a pH 7 y 1000 Da a pH 7) y NF (600-800 Da a pH 7 y 150 Da a pH 3,78), concentrándose aproximadamente en el retentado final 94% del total de XOS.

Palabras clave: XOS, *Allium cepa*, *Zea mays*, lignocelulósicos, tratamiento hidrotérmico, membranas.

ABSTRACT

Agricultural and agro-industrial residues are mainly composed of cellulose, hemicellulose, and lignin. Hemicellulose can be partially hydrolyzed to produce xylooligosaccharides (XOS), emerging prebiotics that stand out among others for their high stability at high temperatures (above 100°C) and at different pH levels (in the range of 2.5-8). The onion leaves used were composed of 26.40% cellulose, 5.05% hemicellulose and 5.37% lignin and the corn husks of 34.06% cellulose, 31.70% hemicellulose and 4.65% lignin. After hydrothermal treatment under the best conditions (50 min at 180°C) in non-stirred Parr reactors, an extract with 0.9 g of XOS per 100 g of onion leaves was obtained. In the case of corn husks, in non-stirred reactors (75 min at 180°C), 4.8 g of XOS per 100 g of material was obtained and in the stirred reactor (30 min at 180°C), 3.1 g of XOS per 100 g of material was obtained. The corn husks hydrolysate obtained in 75 min was subjected to combined UF (10 kDa at pH 7) and NF (500 Da at pH 4 and 150-300 Da at pH 4 and pH 7) operations, concentrating approximately 89% and 67% of the total XOS at pH 4 and pH 7, respectively, in the final retentate. In the case of the corn hydrolysate obtained in 30 min, a previous process, applied to a fraction of the hydrolysate, managed to retain approximately 85% of phenolic compounds in C18 columns, but also 47% of the total XOS. This favored a membrane filtration process with fewer stages, using only NF operations (600-800 Da at pH 7 and 150 Da at pH 3.73), concentrating in the final retentate approximately 94% of the total XOS. The fraction not subjected to phenolic compound retention required combined UF (10 kDa at pH 7 and 1000 Da at pH 7) and NF (600-800 Da at pH 7 and 150 Da at pH 3.78) operations, concentrating approximately 94% of the total XOS in the final retentate.

Key words: XOS, *Allium cepa*, *Zea mays*, lignocellulosics, hydrothermal treatment, membranes.

INTRODUCCIÓN

La cebolla (*Allium cepa L.*) es uno de los cultivos alimentarios más importantes del mundo, su producción y procesamiento generan toneladas de residuos anualmente, a nivel mundial, los cuales presentan ciertas complicaciones para eliminarse de maneras convencionales, ya que su uso como forraje y para compostaje es limitado, además de que, debido a su alto contenido de humedad, la combustión de estos residuos resulta bastante cara ^{1,2}. De la misma manera, el maíz (*Zea mays*) es uno de los principales cultivos en la mayoría de países con una productividad agrícola relevante, donde su producción presenta tendencias de incremento junto con la producción anual de rastrojo de maíz; residuo que se compone de las hojas, tallos y mazorcas desechados luego de la cosecha; un gran porcentaje de este material residual podría utilizarse para la producción de biocombustibles, sin embargo, casi la mitad del rastrojo de maíz producido permanece sin utilizar debido a la falta de métodos de eliminación adecuados: mientras que una parte de este material es utilizado como alimento para animales, otra es quemada al aire libre, lo cual favorece la liberación de contaminantes hacia la atmósfera generando un impacto negativo en el ambiente ³.

Los problemas que surgen respecto a la inapropiada eliminación de los residuos agrícolas y agroindustriales no solo acarrear un efecto poco favorable para el ecosistema, sino que repercuten en la economía, ya que generalmente se desconoce el potencial que poseen estos residuos para valorizarse. La cebolla, uno de los principales vegetales representativos en el comercio del Perú, cuenta con una mayor producción en la región de Arequipa, la cual concentra alrededor del 60,9% de la producción nacional ⁴. Por otro lado, el maíz, en este caso el perteneciente a la variedad blanco Urubamba, raza Cusco gigante, el cual cuenta con denominación de origen, solo se produce en las provincias de Calca y Urubamba del Cusco, donde el 90% del área cultivable está destinado a esta variedad, teniendo niveles de rendimiento que oscilan en el rango de 3 a 4,8 t/ha ⁵. Dado este escenario es innegable que, al producirse

grandes cantidades de estos cultivos, se genere de igual manera una gran cantidad de residuos, ya sea luego de la cosecha o en etapas posteriores correspondientes a su procesamiento.

Los residuos generados de estas actividades, al ser biomasa lignocelulósica, son una materia prima de bajo costo, abundante y renovable, que puede ser empleada para la producción sustentable de diversas biomoléculas de valor agregado, como también de biocombustibles y bioenergía ⁶. Debido a la naturaleza lignocelulósica de la biomasa vegetal, esta puede ser fraccionada en celulosa, hemicelulosa y lignina, convirtiéndola en una materia prima prometedora en el contexto de biorrefinerías, ya que, como se ha ido mencionando, puede ser transformada en productos de alto valor ⁷. Los residuos de cebolla, como pieles y hojas, podrían ser una potencial y novedosa fuente de recursos biopoliméricos, ya que se componen aproximadamente de 41% y 46% de celulosa, 16% y 26% de hemicelulosa, y 39% y 26% de lignina, respectivamente ⁸. De la misma manera, los residuos de maíz han demostrado ser una opción atractiva de materia prima para los mismos fines, reportándose la siguiente composición aproximada para los diferentes elementos que constituyen esta biomasa residual: tallos: 40-50% de celulosa, 20-30% de hemicelulosa y 10-15% de lignina ⁹; hojas: 29% de celulosa, 43% de hemicelulosa y 10% de lignina (porcentajes en peso) ¹⁰; y por último mazorcas (polvo seco): 45% de celulosa, 33% de hemicelulosa y 14% de lignina ¹¹. Cabe resaltar que mientras la celulosa es un componente uniforme de la mayoría de los tipos de biomasa celulósica (presente en alrededor de un 40%), las proporciones y la composición de hemicelulosas y lignina difieren entre especies ¹².

La hemicelulosa contiene entre sus principales fracciones poliméricas al xilano, que al despolimerizarse da paso a la xilosa y a los xilooligosacáridos (XOS); estos últimos son oligómeros de azúcar (con grados de polimerización que van de 2 a 10) producidos, como se ha mencionado, por la hidrólisis parcial del xilano, el cual es un heteropolisacárido con un esqueleto homopolimérico de xilosa. Los XOS tienen un potencial reconocido como

prebióticos, siendo una de sus aplicaciones más importantes su uso como alimentos funcionales, ya que son compuestos que se mantienen estables bajo un amplio rango de pHs y temperaturas. De la misma manera, se ha destacado su función como aditivos hipocalóricos no cariogénicos, lo que favorece su implementación en dietas de adelgazamiento; además son utilizados como gelificantes, para el tratamiento de la diabetes, como inmunomoduladores, inmunoestimuladores, y antioxidantes ^{6,13}.

La obtención de xilooligosacáridos (XOS) a partir de biomasa lignocelulósica se realiza generalmente mediante dos estrategias. La primera estrategia consiste en un solo paso, donde se lleva a cabo una hidrólisis, mediante tratamiento térmico, ya sea con vapor de agua o agua caliente, a temperaturas y presiones elevadas. La segunda estrategia consiste en dos pasos, combinando un tratamiento hidrotérmico o químico con hidrólisis enzimática, en la cual se emplean endo-1,4- β -xilanasas; esta enzima cataliza la hidrólisis de los enlaces 1,4- β -xilosa del xilano, teniendo como resultado la liberación de moléculas más pequeñas como xilotriosa, xilobiosa y xilosa ¹⁴. El tratamiento hidrotermal se considera un proceso de refinería de biomasa ecoamigable ya que no hace uso de químicos más que de agua; además, no provoca problemas significativos de corrosión y permite la solubilización de los hidrolizados de hemicelulosa sin que se produzca una hidrólisis completa ¹². Sin embargo, durante el tratamiento de la biomasa lignocelulósica, no queda exenta la formación de diversos compuestos (impurezas) no deseados, que incluyen monosacáridos, ácido acético, derivados de lignina soluble, compuestos inorgánicos solubles y furfural, lo cual afecta de manera adversa la propiedad prebiótica de los XOS, por lo que una eficiente purificación de estos compuestos resulta ser un proceso necesario de vital importancia ¹⁴.

Para la purificación de XOS existen diversos métodos con el objetivo de eliminar productos secundarios no deseados. Entre las metodologías generalmente empleadas se encuentra la cromatografía de intercambio iónico, el uso de carbón activado, el sobre encalado y la

extracción por solventes. Sin embargo, estas metodologías presentan ciertas desventajas: la cromatografía de intercambio iónico implica altos costos y no es adecuada para la producción a gran escala; el uso de carbón activado involucra la necesidad de emplear grandes cantidades de este material aumentando los costos operacionales, además de que una cierta cantidad de XOS puede perderse cuando se utiliza carbón activado y en el caso de la extracción por solventes, el tiempo de proceso es largo y el rendimiento de recuperación bajo ¹⁴.

Dentro de las diferentes estrategias de purificación, la tecnología basada en membranas ha surgido como una alternativa prometedora para purificar XOS, haciendo uso generalmente de membranas de ultrafiltración (UF) y nanofiltración (NF). Esta tecnología resulta atractiva debido al ahorro de energía que implica, su alta eficiencia y por ser amigable con el medio ambiente ¹⁵. Los trabajos empleando esta tecnología para la purificación de XOS aún son escasos, sin embargo, ya se ha explorado el fraccionamiento en serie de XOS empleando membranas a partir de diferentes fuentes como tallos de algodón y cáscaras de almendra ^{16, 17}. Diversos antecedentes en el uso de esta tecnología para fraccionar y purificar oligosacáridos (como los XOS) en moléculas de tamaños específicos deseados, le han conferido un merecedor reconocimiento de aplicabilidad para este fin. Algo en lo que coinciden diversos estudios es que el rendimiento, en el caso de utilizar membranas de nanofiltración, puede verse afectado tanto por las características de las membranas o de los oligosacáridos a purificar ¹⁸. Con relación a este tema, el proceso de diafiltración (DF) surge como una operación beneficiosa, la cual consiste en la adición de un disolvente, generalmente agua, al depósito de alimentación con el fin de concentrar un producto en el retentado o recuperarlo en el permeado, este enfoque es una estrategia para mejorar el rendimiento de la concentración o recuperación de XOS de bajo peso molecular como xilobiosa (X_2) y xilotriosa (X_3), los cuales poseen un alto potencial prebiótico. Al tratarse de una operación simple y con resultados notables, la diafiltración tiene

potencial para aplicarse ampliamente en futuros estudios basados en la tecnología de membranas ¹⁵.

En el presente trabajo, con el fin de producir XOS a partir de residuos agrícolas de cebolla (*Allium cepa*) y de maíz (*Zea mays*), se evaluará la aplicación de un tratamiento hidrotermal utilizando agua como solvente, seguido de una etapa de purificación y concentración basada en tecnología de membranas, empleando membranas de ultrafiltración (UF) y nanofiltración (NF).



HIPÓTESIS

Dado que los residuos agroindustriales de cebolla y maíz son materiales lignocelulósicos compuestos por fracciones de celulosa, hemicelulosa y lignina con potencial para producir xilooligosacáridos (XOS), es posible que se logre una eficiente obtención de XOS al emplear un proceso de hidrólisis hidrotérmica seguido de una etapa de purificación y concentración de los oligosacáridos obtenidos, mediante filtración por membranas.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el proceso hidrotérmico para la hidrólisis de la fracción de hemicelulosa de residuos de cebolla (*Allium cepa*) y maíz (*Zea mays*) y posterior purificación con membranas de los xilooligosacáridos (XOS) producidos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de las hojas de cebolla y pancas de maíz, obtenidos de un campo agrícola del distrito de Tiabaya y del mercado “La Chavela”, respectivamente.
2. Evaluar diferentes condiciones de temperatura y tiempo, con el fin de determinar las mejores condiciones para la reacción de hidrólisis hidrotérmica necesaria para la hidrólisis de la fracción de hemicelulosa presente en los residuos de cebolla y maíz.
3. Evaluar el potencial de membranas de ultrafiltración (UF) y nanofiltración (NF) para la purificación y concentración de XOS.
4. Cuantificar la xilosa y XOS obtenidos, en las diferentes etapas de hidrólisis hidrotérmica y filtración por membranas, mediante la técnica de cromatografía líquida (HPLC).

TABLA DE VARIABLES E INDICADORES

A continuación, se muestra el cuadro con las variables dependientes e independientes, considerando solo las etapas donde se evaluará la influencia de variables. Las etapas no consideradas en el cuadro de variables se realizarán acorde a procedimientos ya establecidos en otros estudios.

Tabla 1. Variables e Indicadores.

ETAPAS	VARIABLES			
	Independientes		Dependientes	
	Indicadores	Unidades	Indicadores	Unidades
<i>Tratamiento hidrotermal</i>	Tiempo de hidrólisis	Minutos (min)	Compuestos fenólicos totales	g EAG/L
	Temperatura del proceso	°C	Concentración de xilosa	g de xilosa/L
			Concentración de XOS (X ₂ -X ₄)	g de XOS/L
<i>Filtración por membranas</i>	Tamaño de poro	Dalton (Da)	Concentración de xilosa	g de xilosa/L
	Presión	Bar		
	pH	-	Concentración de XOS (X ₂ -X ₄)	g de XOS/L
	Temperatura	°C		

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Cebolla

1.1.1. Importancia del cultivo

La cebolla (*Allium cepa L.*), es uno de los cultivos alimentarios más importantes del mundo ocupando el tercer lugar después de la papa y el tomate ¹⁹. Su cultivo se conoce desde hace más de 4000 años, con un posible origen en Asia Central; actualmente se extiende por todo el mundo gracias a su alta adaptabilidad a diferentes climas y suministros de agua. El bulbo, la parte más utilizable de esta hortaliza, finaliza su formación luego del primer año de crecimiento, por lo que es considerado como cultivo anual, a pesar de tratarse de una planta bienal ²⁰. Morfológicamente el bulbo consta de bases de hojas orientadas cilíndricamente, llamadas escamas, las cuales se encuentran unidas a un tallo corto en forma de disco (placa basal). Estas escamas acumulan agua y productos de la fotosíntesis, lo que las lleva a hincharse formando el bulbo. A medida que este madura, las escamas externas se convierten en una piel seca e impermeable, lo que ayuda a prevenir la desecación ¹⁹. Desde la antigüedad, la cebolla se ha utilizado tradicionalmente en medicina popular y como ingrediente casi universal en la preparación de alimentos, por lo cual su cultivo se realiza de diferentes maneras, según su forma, color, tamaño, contenido de materia seca y picor ²⁰.

1.1.2. Producción

La producción de cebolla se divide en tres segmentos principales de productos: bulbos para el mercado de productos frescos, cebollas deshidratadas para el procesamiento de alimentos y cebollas verdes para ensalada para consumo fresco ²¹. La producción mundial de bulbos de cebolla en 2018 se estimó en 96,7 millones de toneladas, según datos recopilados por la FAO en 2020, siendo los mayores productores los países asiáticos, los cuales representan el 67,5% de la producción mundial, donde destacan China e India; por otro lado, los países europeos

generan el 9,3% de la producción mundial, del cual el 66% proviene de países pertenecientes a la Unión Europea, siendo los más importantes España y Holanda ²⁰. Los países de América del Sur aportan un 9% a la producción mundial, con Brasil, Perú, Argentina, Colombia y Chile a la cabeza ²². A nivel nacional, 04 regiones concentraron el 90,1% de la producción de cebolla en 2017, estas regiones fueron: Arequipa con una participación de 62,3%, Ica con 20,9%, La Libertad con 3,8% y Lima con 3,3% ²³. Siendo considerado el principal productor de cebolla el departamento de Arequipa, el cual concentró el 60,9% de la producción nacional en 2019 ⁴. Respecto a su almacenamiento, las cebollas se pueden almacenar hasta por 9 meses si se dispone de refrigeración o almacenamiento en atmósfera controlada, esta característica resulta ventajosa para su producción masiva, lo cual beneficia su prevalencia en todo el mundo ²¹. Aun así, el almacenamiento prolongado de cebollas a granel puede resultar en pérdidas notables de hasta un 25-30%, por lo cual una estrategia para garantizar la estabilidad del producto y proteger su calidad sensorial específica es su procesamiento. Es por esto por lo que el mercado internacional se encuentra cada vez más enfocado a productos deshidratados como hojuelas, aros, gránulos, polvo, etc., y a cebolla procesada, congelada o enlatada, en vinagre y en salmuera. Cabe resaltar que la demanda y producción de cebolla viene en aumento cada año, esta tendencia quedó evidenciada en los años 2008 a 2018 ya que, entre esos 10 años, la producción de cebolla aumentó aproximadamente un 30% ²⁰.

1.1.3. Generación de residuos

Por lo general, las hojas de esta hortaliza se descartan en el campo después de la cosecha, ya que el producto de interés es el bulbo ⁸; por otro lado, durante el procesamiento de cebolla se generan desechos como las pieles, escamas carnosas externas (generalmente 2), raíces y la parte superior (punta) de los bulbos; resultado del pelado mecánico de los mismos; también llegan a descartarse los bulbos deformados, dañados o podridos, al no ser aptos para su uso o consumo ²⁰. A manera de ilustrar la cantidad de residuos de cebolla generados, se presenta el

caso de la Unión Europea, la cual, según la bibliografía disponible, produce de manera anual 500.000 toneladas de residuos de cebolla, principalmente en países con una producción significativa, como España, Países Bajos y Reino Unido ²⁴. La eliminación por maneras convencionales de los desechos de cebolla plantea ciertos problemas ya que estos residuos no pueden utilizarse como forraje debido a su aroma y posible toxicidad; también su compostaje es limitado por la alta susceptibilidad al crecimiento del fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* (podredumbre blanca) y al alto contenido de compuestos azufrados; asimismo, la combustión de los residuos de cebolla es bastante cara debido al alto contenido de humedad ^{1,2}.

1.2. Maíz Blanco Urubamba (Blanco Gigante Cusco)

1.2.1. Importancia del cultivo

El maíz (*Zea mays*) blanco gigante es originario del departamento del Cusco, del Valle Sagrado de los Incas, comprendido en las provincias de Urubamba y Calca, entre los 2600 y 3050 m.s.n.m. de altitud. Pertenece a la variedad blanco Urubamba y a la raza Cusco gigante, denominado así por el tamaño de sus granos. Esta raza pertenece al grupo de maíz amiláceo y es el más importante, en materia económica, entre las otras variedades de maíz cultivados en la región del Cusco por la calidad de sus granos, determinada por su gran tamaño, textura suave y color blanco ⁵.

1.2.2. Producción

El maíz blanco gigante, como ya se ha mencionado, es de procedencia cusqueña, cultivado en las provincias de Calca y Urubamba, donde el 90% del área cultivable está destinado a este maíz. Los aspectos climáticos y del suelo en las zonas de cultivo hacen que presente características únicas, que no podrían darse en otros lugares del Perú. Estos factores ambientales han permitido que este tipo de maíz sea una de las razas más evolucionadas del país, con alta fertilización y poblaciones de 55000 plantas/ha. La provincia de Calca es la

principal zona para este cultivo, presentando los mayores indicadores de producción, llegando a producir casi 5 toneladas al año, con un nivel de rendimiento de 4,6 t/ha⁵. El maíz Blanco Gigante Cusco es una de las variedades de mayor volumen de comercialización en el mercado nacional y el de mayor volumen de exportación. En el país y en algunos lugares del exterior existen variedades de granos similares en apariencia externa, pero no cuentan con las dimensiones, suavidad y densidad o peso específico del maíz blanco gigante, características aparentemente determinadas por el origen genético o por la influencia ambiental de la zona de producción²⁵.

1.2.3. Generación de residuos

La mayor parte de generación de residuos se da en la etapa de cosecha, los tallos son cortados tanto para obtener choclo como para obtener grano. Por lo general es costumbre vender las plantas en pie y el comprador se encarga de la cosecha dejando el follaje para el productor²⁵. Los principales residuos generados resultantes del cultivo de maíz son sus mazorcas y hojas, estos residuos representan el 20-30% de la cosecha de maíz y son considerados subproductos de bajo beneficio²⁶. En general, el rastrojo de maíz generado es clasificado como un residuo, y no como un cultivo energético ni mucho menos como un desperdicio. El rastrojo de maíz es dejado en los campos luego de la cosecha, y su valor se deriva de su contribución a la materia orgánica del suelo²⁷.

1.3. Biomasa lignocelulósica

Generalmente, 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 ^{28,29}. Esta biomasa lignocelulósica es considerada el residuo agrícola más abundante disponible en el mundo ³⁰. Es por tanto una materia prima muy prometedora para las biorrefinerías, su valorización es una fuente abundante de vectores energéticos útiles, compuestos químicos e ingredientes, 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, lactosacarosa, etc.), biocombustibles (etanol, butanol, dimetiléter, biodiesel e hidrógeno), compuestos bioactivos (flavonoides, ácidos fenólicos, terpenos, terpenoides y carotenoides), nanocelulosa (bacteriana y la relacionada con la madera), lignina y sus derivados (fuente de compuestos aromáticos a partir de biomasa y posible sustituto de la fracción aromática o BTEX producida en refinerías de petróleo) ³¹. Es por ello por lo que los oligómeros de celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina y otros polímeros relacionados con la biomasa lignocelulósica, como la quitina, componen una clase de compuestos de valor agregado con un enorme potencial ¹³.

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 ³². 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 catalíticas (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 ¹³.

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 macrofibrillas ¹³. 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 ²⁸. Por otro lado, la celulosa también puede utilizarse para la producción de celooligómeros (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, sin embargo, son menos estudiados que otros oligosacáridos debido a la naturaleza refractaria de la celulosa ¹³.

1.3.3. Hemicelulosa

Las hemicelulosas, también conocidas como poliosas, son el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, están presentes en la pared celular de las plantas con una asociación cercana con la celulosa y lignina, lo que contribuye a la rigidez de la pared celular. Estos

polisacáridos son parcialmente solubles en agua y solubles en álcali diluido, lo que hace posible su separación en este tipo de medio ³³. 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, además de arabinosa y ácido urónico ³⁴. Una de las principales fracciones poliméricas de las hemicelulosas es el xilano, un polímero de xilosa unido por enlaces β -1,4-xilosídicos que puede despolimerizarse 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) ¹³.

1.3.3.1. Purificación fraccionada de hemicelulosas

Las hemicelulosas, por lo general, están unidas a otros componentes de pared celular como celulosa, proteínas, lignina y compuestos fenólicos mediante enlaces covalentes y de hidrógeno e interacciones iónicas e hidrofóbicas ³⁵. Existen diferentes métodos de aislamiento de hemicelulosas, entre los cuales se destacan la extracción mediante tratamiento alcalino, extracción con solventes orgánicos, tratamientos mecánico-químicos (ultrasonidos o uso de extrusor de doble husillo) y tratamientos hidrotermales (explosión de vapor o irradiación con microondas). También existen metodologías para la purificación fraccionada de hemicelulosas como precipitación con etanol, precipitación con sulfato de amonio, precipitación con complejo de yodo, precipitación supercrítica antisolvente, cromatografía de columna, separación por membranas, entre otras.

Aislamiento de Hemicelulosas - Tratamiento Alcalino

El interés en el aislamiento de hemicelulosas a partir de biomasa lignocelulósica se ha incrementado en los últimos años, teniendo como principal objetivo encontrar una metodología adecuada para la liberación selectiva de todas las hemicelulosas de otros componentes de la pared celular, sin implicar su degradación durante los procesos de aislamiento. El tratamiento alcalino es uno de los métodos empleados para este fin. Se entiende que el aislamiento de la matriz de hemicelulosa resulta restringido por los enlaces que forma con la lignina (enlaces covalentes, principalmente enlaces α -bencil éter) y con unidades acetilo y ácidos hidroxicinámicos (enlaces éster), además de que los enlaces de hidrógeno entre los componentes individuales (polisacáridos) de la pared celular impiden también el aislamiento de los componentes de hemicelulosa. La extracción alcalina ha demostrado ser una forma efectiva para la remoción de hemicelulosas, los tratamientos alcalinos aplicados a materiales lignocelulósicos logran la ruptura de la pared celular al disolver hemicelulosas, lignina y sílice, hidrolizando ésteres urónicos y acéticos e hinchando la celulosa, disminuyendo su cristalinidad. Además, este tipo de tratamiento corta los enlaces inicialmente mencionados, como los α -éter entre la lignina y las hemicelulosas; así como los enlaces éster entre las hemicelulosas y/o lignina y los ácidos hidroxicinámicos, como los ácidos p-cumárico y ferúlico. Sin embargo, las extracciones alcalinas tienen la desventaja de desacetilar las hemicelulosas ³⁵. Las hemicelulosas extraídas alcalinamente se precipitan, en parte, por neutralización o acidificación suave, y en parte, por la posterior adición de un exceso de acetona o etanol. El tipo de álcali, la concentración, el tiempo y la temperatura tienen un efecto notable en el rendimiento de recuperación de hemicelulosas ³⁵.

Purificación Fraccionada de Hemicelulosas - Precipitación con Etanol

Las hemicelulosas, heteropolisacáridos no celulósicos de cadena ramificada corta, están constituidas por varias unidades diferentes de azúcar, dispuestas en diferentes proporciones y

con diferentes sustituyentes. Varias técnicas de fraccionamiento han sido empleadas con el fin de obtener fracciones más homogéneas de estos heteropolisacáridos, ya que generalmente, como ya se ha mencionado, estos varían en características estructurales ³⁵. Extracciones sucesivas con solventes neutros o alcalinos lograrían el aislamiento fraccionado de hemicelulosas, sin embargo, las hemicelulosas aisladas seguirían siendo una mezcla de diferentes polisacáridos. Para la obtención de fracciones hemicelulósicas homogéneas es necesaria una purificación de las hemicelulosas aisladas. Como se ha descrito previamente, las hemicelulosas pueden ser aisladas a partir de materiales lignocelulósicos mediante extracción con soluciones alcalinas, y su recuperación por neutralización y precipitación con etanol ha llevado a esta secuencia de procedimientos a ser la metodología de fraccionamiento convencional más utilizada. Esta práctica ha llevado a identificar tres tipos de hemicelulosas, las “hemicelulosas A” representan la fracción insoluble en agua que precipita al neutralizar un extracto alcalino a un pH de 4,5-5,0 con ácido acético; mientras que las “hemicelulosas B” son aisladas mediante una precipitación con 3 volúmenes de etanol, y la parte restante, generalmente desechada, es denominada “hemicelulosas C”. Se cree que el primer tipo de hemicelulosas son homogéneas, mientras que las hemicelulosas B son una mezcla de varios polímeros diferentes, tanto lineales como ramificados y, por otro lado, las hemicelulosas C son polímeros más ramificados y de bajo peso molecular ³⁵.

Como ya se ha mencionado, uno de los principales métodos de recuperación y purificación de hemicelulosas es la precipitación de las fracciones de polisacáridos mediante la adición de disolventes orgánicos miscibles a soluciones acuosas. El etanol es el solvente mayormente utilizado, pero también pueden emplearse otros solventes orgánicos como metanol y acetona. Las precipitaciones repetidas en etanol pueden aumentar la pureza de la hemicelulosa obtenida, sin embargo, no siempre se cumple esto debido a que pueden coprecipitar otros polisacáridos disueltos, lo cual significaría un problema. Esta operación de precipitación fraccionada está

influenciada por el tiempo y temperatura, variables que tienen influencia sobre los cambios conformacionales que conducen a la agregación molecular ³⁵.

1.4. Xilooligosacáridos (XOS)

Los xilooligosacáridos son oligómeros de azúcar compuestos por unidades de β -D-xilopiranosil (xilosa) unidas a través de enlaces β (1 \rightarrow 4)-xilósídicos. Estos azúcares, presentes de forma natural en los brotes de bambú, frutas, verduras, leche y miel, son producidos industrialmente mediante la hidrólisis del xilano a partir de biomasa lignocelulósica. Los xilooligosacáridos han ganado valor en el mercado debido a su efecto prebiótico, en humanos y animales, a dosis bajas (1,4 g/día en adultos). Diversos beneficios para la salud han sido documentados respecto a estos oligómeros, que incluyen la reducción del colesterol en sangre, aumento en la absorción de calcio, efectos antioxidantes, mantenimiento de la salud gastrointestinal, riesgo reducido de cáncer de colon, efecto citotóxico sobre células leucémicas humanas y beneficios para pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Los XOS fueron reconocidos como oligosacáridos prebióticos por la Asociación Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP), sin embargo, son considerados como prebióticos emergentes debido a que se requiere mayor evidencia de su resistencia a la digestión gástrica y estimulación selectiva del crecimiento de microbiota de bacterias beneficiosas. Los XOS poseen otras características que aumentan su atractivo industrial como su alto rango de estabilidad para temperaturas de hasta 100°C y rangos de pH de 2,5-8; su bajo valor calórico y su poder edulcorante, convirtiéndolos en ingredientes ideales para alimentos funcionales y edulcorantes dietéticos ³⁰.

1.5. 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

xilanólicas y su reciclabilidad, el tipo de hidrólisis xilanólica, 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 ³⁶. 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. Debido a esto se han realizado varios estudios evaluando diferentes estrategias de producción y purificación, con el fin de encontrar un proceso de producción que permita obtener el mayor rendimiento de XOS con grados de polimerización del rango deseado. Generalmente, la producción de XOS a partir de biomasa lignocelulósica se realiza a través de dos principales estrategias: procesos de un solo paso, generalmente empleando autohidrólisis; y procesos que combinan dos etapas: pretratamiento, donde se pueden emplear procesos térmicos, físicos, químicos o la combinación de ellos; y un tratamiento posterior, donde generalmente se aplica hidrólisis enzimática. Actualmente, este último enfoque (el de 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 encarecen los costos de producción al generar dificultades en la purificación del producto final ³⁰.

1.5.1. Primera estrategia: Procesos de una sola etapa

Como ya se ha mencionado, la autohidrólisis es el tratamiento generalmente empleado cuando se trata de esta primera estrategia. Este y otros tipos de tratamiento hidrotermal se consideran altamente eficientes desde un punto de vista ambiental, energético y económico, y están asociados a la aplicación de agua como solvente a altos rangos de temperatura y presión. El tratamiento hidrotermal tiene diversas ventajas como un costo competitivo, la limitación del uso de catalizadores y sus propiedades sostenibles y eco amigables. Además, esta técnica promueve la extensión del área de contacto entre el agua y la superficie de la materia prima lo

cual aumenta sensiblemente la disolución de hemicelulosa (nuestra fracción objetivo) haciendo posible la recuperación del producto y aumentando el rendimiento de los procesos en caso de aplicarse después una hidrólisis enzimática, lo que correspondería ya a la segunda estrategia de producción de XOS, donde se combinan dos etapas ³⁷. Usar esta técnica de tratamiento hidrotermal para el fraccionamiento de la biomasa puede resultar en la obtención de un extracto rico en hemicelulosa, la cual a menudo se compondrá de oligómeros de xilano. Adicional a ello también puede utilizarse para la separación enfocada a celulosa o lignina, aspecto que destaca la relevancia que tiene este tipo de tratamiento en un concepto de biorrefinería ³⁸. Los efectos del tratamiento hidrotermal se pueden resumir en los siguientes cinco pasos ³⁹: (i) escisión de hemicelulosa en oligómeros de peso molecular decreciente, ya que en esta etapa inicial se produce el fraccionamiento completo de la estructura; (ii) autohidrólisis, proceso que ocurre a través de la desacetilación de la hemicelulosa; (iii) disolución de hemicelulosa y transferencia de masa entre la fracción sólida y la líquida; (iv) producción de monómeros de azúcar, así como de productos de degradación, como furfural e hidroximetilfurfural (HMF); y (v) modificaciones en la porosidad del sólido, que pueden causar extracción, hinchamiento y compactación de la biomasa ^{39,40}. En los procesos hidrotermales se debe tomar en cuenta la naturaleza y alcance de las diferentes técnicas que pueden aplicarse, además de la severidad de la reacción, la cual está relacionada con el tiempo de residencia, la temperatura y la carga del catalizador. Los procesos más severos tienden a generar concentraciones más elevadas de productos de degradación (furfural e HMF) los cuales tienen un efecto adverso en organismos fermentadores en etapas posteriores de conversión a otros productos ³⁷. Las temperaturas típicas en los tratamientos hidrotermales son superiores a los 100°C, lo que implica que se requiere una presión superior a la presión del vapor de agua con el fin de mantener el agua en su estado líquido ^{41,42}. Según la temperatura y presión de la reacción se pueden identificar dos tipos de tratamiento hidrotermal: el proceso subcrítico y el proceso supercrítico. Respecto al

primero, este puede incluir explosión de vapor no catalizada (*Steam explosion – SE*), explosión de vapor catalizada por ácido (*Acid-catalized steam explosion - ACSE*), y agua líquida caliente (*Liquid-hot water - LHW*); y opera por debajo del punto crítico del agua pura (374°C y 22,1 MPa), contrario al proceso supercrítico (*Supercritical water hydrolysis - SCW*), el cual opera por encima de este punto ³⁷. SE (también llamada autohidrólisis) y LHW son las dos técnicas generalmente empleadas para el tratamiento hidrotermal de la biomasa lignocelulósica y consecuente recuperación de hemicelulosa, ningún químico es añadido en el proceso (solo agua) por tal motivo ambas técnicas son consideradas eco amigables ³⁷.

1.5.2. Segunda estrategia: Procesos que combinan dos etapas

1.5.2.1. Etapa I: Pretratamiento

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 ³⁶. Entre los varios métodos de pretratamiento conocidos, tenemos el pretratamiento hidrotermal, que se lleva a cabo durante la autohidrólisis, el cual utiliza altas temperaturas que van generalmente entre los rangos de 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 ⁴³; esta metodología se apoya en el hecho de que la hemicelulosa es vulnerable a la exposición al agua a altas temperaturas y presiones, ya que esta penetra en las estructuras de las células vegetales, hidratando la celulosa y despolimerizando la hemicelulosa ³⁶. 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 seguida liberación de oligosacáridos y de

productos no tan deseados como monosacáridos y compuestos tóxicos ⁴⁴. En el caso del 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 ⁴³; 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 ⁴⁵. 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 ¹². Existen diferentes complicaciones con estos métodos de pretratamiento, a modo de síntesis se sabe que el tratamiento hidrotermal durante la autohidrólisis también produce componentes tóxicos y no deseados como monosacáridos, lignina, furfurales e hidroximetilfurfural; este pretratamiento también carece de especificidad, produciendo una gran cantidad de XOS con un alto grado de polimerización y xilosa, indeseable para aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica, y al requerir altas temperaturas es necesario el uso de equipos especializados. Por otro lado, el pretratamiento químico, al utilizar fuertes condiciones alcalinas y ácidas para la hidrólisis, causan corrosión de los equipos utilizados y contaminación ambiental. Sin embargo, se señala que el pretratamiento químico, así como el pretratamiento físico, seguido de la hidrólisis enzimática, son más efectivos cuando se usan en combinación entre sí que la aplicación de hidrólisis física o hidrólisis química solas ³⁶.

1.5.2.2. *Etapas II: 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, actualmente 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 produce 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 escindir 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 ³⁰. Las enzimas xilanólíticas 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 xilanólíticas 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 ser caras. 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 ³⁶. 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 ³⁰.

1.5.3. *Downstream* o purificación de XOS

La aplicabilidad de XOS en las industrias alimentaria y farmacéutica depende de la pureza de estos, siendo deseable que el producto final contenga xilobiosa (X_2), xilotriosa (X_3), 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 ³⁶.

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. Lugar de ejecución

Para el presente trabajo se utilizó el laboratorio de Bioprocesos del pabellón F (F-405), del campus principal de la Universidad Católica de Santa María (UCSM). Los análisis de HPLC se realizaron en el Laboratorio de Tecnología de Alimentos, ubicado en el mismo pabellón F (F-404).

1.2. Materiales

1.2.1. Insumos

- Residuos (hojas) de Cebolla roja arequipeña *Allium cepa*.
- Residuos (pancas) de Maíz blanco Urubamba *Zea mays*.

1.2.2. Reactivos químicos

- Alcohol, 96°, Alsucorp
- El Ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 96-97%, el Carbonato de Sodio (Na_2CO_3), el Hidróxido de Sodio (NaOH), el reactivo fenol de Folin-Ciocalteu, el Ácido acético (glacial) al 100% y el Bromuro de Potasio (KBr), se obtuvieron de Merck & Co., Inc.
- Estándar de alta pureza: D(+)-glucosa, anhidro para bioquímica, Emsure Merck
- Estándar de alta pureza: D(+)-xilosa, Sigma Aldrich
- Estándar de alta pureza: L(+)-arabinosa, para microbiología, Merck Millipore
- Estándar de XOS: Xilobiosa, Xilotriosa y Xilotetraosa pureza >95% (HPLC), Megazyme

1.2.3. Materiales de laboratorio (vidrio, porcelana, metal, etc.)

- Extractor Soxhlet, probetas de vidrio, vasos de precipitado, tubos de ensayo, baguetas de vidrio, matraces, matraces Kitasato, crisoles filtrantes, balones volumétricos, crisoles de porcelana y viales de vidrio de 1,5 ml, para HPLC

- Papel filtro cualitativo Whatman 4 (medida: 460 × 570 mm) y Whatman 40 (125 mm)
- Pinzas de metal, adaptadores de filtro de caucho, jeringas de 1 y 100 ml
- Filtros de jeringa de nylon de 0,22 µm, Millex-GV
- Cartuchos de columna C18 (Waters Sep-Pak Vac 35cc, C₁₈ – 10 g)
- Cartuchos de tratamiento C18 (para jeringa)
- Membranas de 10000 Da (UF), Sterlitech (Synder Flat Sheet Membrane, ST, PES, UF); membranas de 1000 Da (UF), Sterlitech (TriSep Flat Sheet Membrane, UA60, PPA, UF); membranas de 600-800 Da (NF), Sterlitech (Synder Flat Sheet Membrane, NFG, PA-TFC, NF); membranas de 500 Da (NF), Sterlitech (Microdyn Nadir Flat Sheet Membrane, NP030, PES, NF); membranas de 150-300 Da (NF), Sterlitech (SUEZ (GE) Flat Sheet Membrane, DK, TFC, NF) y membranas de 150 Da (NF), Sterlitech (TriSep Flat Sheet Membrane, TS80, PA, NF)

1.2.4. Aparatos y equipos

- Horno de calor y secado Binder FD56
- Molino manual
- Analizador de humedad Mettler Toledo HE73
- Balanza analítica (0,001 g – 210 g), OHAUS AR2140
- Balanza (0,01 g – 2200 g), OHAUS SPX2202
- Manta de calentamiento Preasion 98-II-C
- Baño María, Witeg DH.WB0 Series
- Autoclave, Witeg WAC 47
- Bomba de filtración al vacío, Millipore
- Espectrofotómetro UV-Visible, Genesys 150
- Mufla Thermolyne, Thermo Scientific
- Cocinilla eléctrica

- Campana extractora, Biobase FH1200(X)
- Termoreactor Spectroquant TR420
- Cromatógrafo Líquido de Alto Rendimiento (HPLC), Thermo Scientific Ultimate 3000
- Knauer RI-Detector RefractoMax 520
- 300×7,7 mm Carbohydrate H+ 8u HyperRez XP Column, 1 PK
- 50×7,7 mm Carbohydrate H+ 8um HypeRez XP Guard Col, 1 PK
- Columna cromatográfica (azúcares y XOS)
- Equipo de FTIR, Thermo Scientific Nicolet Summit FTIR Spectrometer
- Accesorios para equipo FTIR, Specac
- Reactores Parr sin agitación de 25 ml
- Reactor Parr con agitación de 2 L
- Sistema de filtración: Sterlitech HP4750 High Pressure Stirred Cell (S/P: HP4750)
- Vortex VWR 10153-814
- Potenciómetro Mettler Toledo FiveEasy
- Centrífuga Gemmy PLC-05
- Agitador magnético, VWR Hotplate/Stirrer

1.2.5. Software

- Chromeleon 7
- OMNIC Paradigm Desktop Software

1.3. Métodos

1.3.1. Producción de XOS a partir de hojas de Cebolla (*Allium cepa L.*)

1.3.1.1. *Obtención y caracterización composicional de hojas de cebolla*

Hojas de cebolla

Las hojas de cebolla roja Arequipeña (*Allium cepa L.*) fueron recolectados de un campo agrícola ubicado en el distrito de Tiabaya, en el lindero límite de Tunales y Pampas Nuevas, en el momento justo de la actividad de cosecha. Las hojas, usualmente denominadas “tallos falsos”, fueron recogidas directamente. Estos residuos fueron transportados al laboratorio, limpiados y separados de material no apto, secados hasta una humedad menor al 10%, molidos con un molino manual y almacenados en bolsas herméticas para su posterior análisis composicional (contenido de extractivos, celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas) (Figura 1).



Figura 1. *Obtención (a y b) y preparación (c y d) de hojas de cebolla. Nota: autoría propia.*

Caracterización composicional de hojas de cebolla

Se realizó la caracterización composicional de los residuos a fin de conocer el contenido de extractivos, celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas de la biomasa. Los análisis fueron realizados en base a las metodologías y procedimientos propuestos por la *National Renewable Energy Laboratory* (NREL), con ligeras modificaciones, utilizando muestras molidas⁴⁶⁻⁴⁸.

Determinación de contenido de extractivos

Esta etapa se inició con la medición del contenido de humedad (porcentaje de humedad) de las muestras, con el fin de trabajar con los valores de peso seco de cada una de ellas. El peso seco se determinó, para esta y otras muestras en esta y las siguientes etapas, con la ecuación 1. La extracción se realizó mediante el método Soxhlet (Figura 2), y se adicionó 1-4 g de muestra molida a sobres tarados de papel filtro. Se registró el peso de cada muestra contenida en los sobres (la cantidad de muestra necesaria dependió de la densidad aparente de la biomasa). Este ensayo se realizó por triplicado, es decir, se consideraron tres sobres de trabajo que, al colocarse dentro de la cámara del equipo Soxhlet, su altura no debía exceder la altura del tubo de sifón del equipo. Tomando en cuenta ello, se procedió a ensamblar el resto del equipo Soxhlet. Las muestras fueron sometidas a dos extracciones exhaustivas de 6 horas cada una, con etanol al 96% utilizando en cada extracción un volumen de 350 ml de solvente. Al finalizar la extracción con etanol, los sobres fueron puestos a secar a temperatura ambiente para luego poder registrar el peso de los contenidos de los sobres de trabajo, con el fin de determinar el porcentaje (%) de extractivos solubles en etanol. Para poder determinar el porcentaje de extractivos solubles en agua, el procedimiento se repitió de la misma manera con la biomasa resultante luego de la extracción con etanol. Los porcentajes de extractivos se calcularon siguiendo la ecuación 2.

$$W_{seco} = W_{total} - \left(W_{total} \times \left(\frac{\%H}{100} \right) \right) \quad (1)$$

Donde:

- W_{seco} : Peso seco.
- W_{total} : Peso total, sin corrección de humedad.
- $\%H$: Porcentaje de humedad de la muestra.

$$\% \text{ Extractivos} = \left(\frac{W_{seco\ inicial} - W_{seco\ final}}{W_{seco\ inicial}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Donde:

- $W_{seco\ inicial}$: Peso seco de la muestra registrado antes de la extracción Soxhlet.
- $W_{seco\ final}$: Peso seco de la muestra registrado después de la extracción Soxhlet.

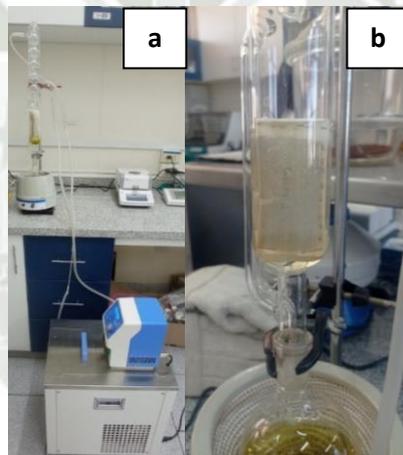


Figura 2. Extracción Soxhlet. (a) Sistema completo armado, (b) Sobres de papel filtro que contenían la muestra en polvo. Nota: autoría propia.

Determinación de carbohidratos estructurales y lignina

El procedimiento a continuación se realizó utilizando el material libre de extractivos (solubles tanto en etanol como en agua) (Figura 3.a) y consistió en una hidrólisis ácida de dos pasos, que permitió fraccionar la biomasa de manera que pudo cuantificarse más fácilmente mediante espectroscopía UV-Vis y HPLC (1). Los ensayos se realizaron por triplicado, el análisis se inició pesando $300,0 \pm 10,0$ mg de muestra en cada tubo de vidrio de trabajo tarado. Se registró el porcentaje de humedad de la muestra y el peso de muestra contenido en cada tubo. Luego,

se agregaron $3,00 \pm 0,01$ ml de ácido sulfúrico al 72% p/p a cada tubo y con la ayuda de una varilla de vidrio se mezcló el contenido de cada uno de ellos. Los tubos se colocaron en un baño de agua a 30 ± 3 °C durante 60 ± 5 minutos. Durante el tiempo de incubación, las muestras fueron agitadas cada 10 minutos, sin retirar los tubos del baño de agua. Completada la hidrólisis de 60 minutos, los tubos se retiraron del baño de agua y se procedió a diluir el ácido a una concentración del 4% agregando $84,00 \pm 0,04$ ml de agua destilada, para este fin el contenido de los tubos fue transferido a matraces de 100 ml. Los matraces fueron colocados en la autoclave durante una hora a 121°C. Después de completar el ciclo de autoclave, los hidrolizados se dejaron enfriando hasta llegar a temperatura ambiente.

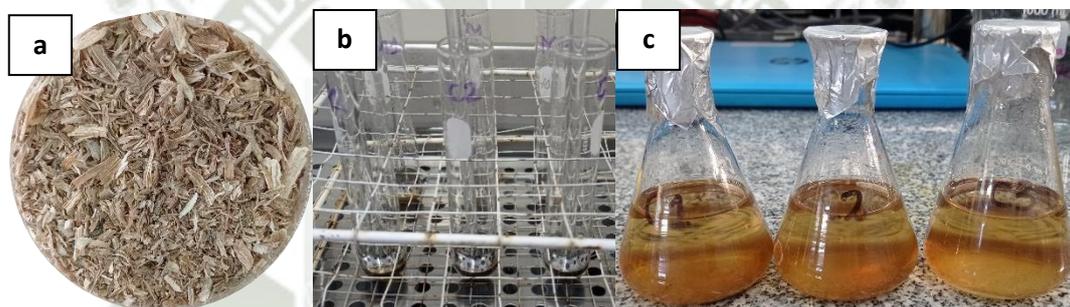


Figura 3. Determinación de carbohidratos estructurales y lignina; (a) Material libre de extractivos, (b) Incubación a 30°C, (c) Dilución del ácido hasta una concentración del 4%.
Nota: autoría propia.

Determinación de lignina insoluble en ácido

Para la determinación de lignina insoluble en ácido se filtraron al vacío los hidrolizados esterilizados en autoclave a través de crisoles filtrantes asignados, previamente pesados. El filtrado se recolectó y se tomó una alícuota de aproximadamente 50 ml, reservados en tubos Falcon de la misma capacidad, para poder determinar posteriormente la lignina soluble en ácido y los carbohidratos presentes; para este fin, los filtrados, se conservaron en refrigeración para su posterior análisis. Luego de haber recolectado apropiadamente la alícuota de hidrolizado, se utilizó agua destilada para la transferencia cuantitativa de todos los sólidos restantes de los matraces a sus respectivos crisoles filtrantes. Los crisoles junto con los residuos insolubles en

ácido fueron secados a 105 ± 3 °C por 4 horas, al finalizar el tiempo de secado, las muestras se enfriaron en un desecador para después registrar los pesos del crisol junto a los residuos secos. El cálculo del porcentaje de lignina insoluble en ácido (LIA) fue realizado empleando la ecuación 3.

$$\%LIA = \frac{ODW_{lignina\ insoluble}}{ODW_{muestra}} \times 100 \quad (3)$$

Donde:

- $ODW_{lignina\ insoluble}$: peso seco de los residuos insolubles en ácido, en gramos.
- $ODW_{muestra}$: peso seco de la muestra, en gramos.

Determinación de lignina soluble en ácido

Para la determinación de lignina soluble en ácido se llevó a cabo un análisis de espectrofotometría UV-visible, utilizando como blanco agua destilada. Se analizaron las alícuotas recolectadas previamente y se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda apropiada, la cual se definió considerando lo reportado por Sluiter et al. (2012)⁴⁷ para el tipo de biomasa bagazo, de esta manera se trabajó con una longitud de onda de 240 nm. Cabe resaltar también que para este tipo de biomasa se utilizó un valor de $\epsilon = 25$. Las muestras fueron diluidas con agua destilada, según fue necesario, para llevar las absorbancias obtenidas al rango de 0,7 - 1,0. El cálculo del porcentaje de lignina soluble en ácido (LSA) fue realizado empleando la ecuación 4.

$$\%LSA = \frac{UV_{abs} \times Volumen_{filtrado} \times Dilución}{\epsilon \times ODW_{muestra} \times Longitud\ de\ trayectoria} \times 100 \quad (4)$$

Donde:

- $UV\ abs$: Absorbancia UV-Vis promedio para la muestra a la longitud de onda apropiada.

- *Volumen filtrado*: Volumen de filtrado (licor de hidrólisis) de 0,087 L.
- *Dilución*: $\frac{\text{Volumen}_{\text{muestra}} + \text{Volumen}_{\text{solvente diluyente}}}{\text{Volumen}_{\text{muestra}}}$
- ϵ : Capacidad de absorción de la biomasa a una longitud de onda específica.
- ODW_{muestra} : peso seco de la muestra en gramos.
- *Longitud de trayectoria*: Longitud de trayectoria de la celda UV-Vis en cm, que es igual a 1.

Determinación de carbohidratos estructurales

Los carbohidratos estructurales fueron determinados por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Por cada muestra de alícuota recolectada en las etapas previas se prepararon viales por duplicado. Para la preparación de cada vial, las muestras fueron pasadas por filtros de jeringa de nylon de 0,20 μm . Cada vial contenía aproximadamente 1 ml de muestra. Los resultados se expresaron en g/L de Glucosa, Xilosa y Arabinosa, a partir de estos valores se calculó el porcentaje de Celulosa y Hemicelulosa con los resultados de concentración obtenidos de Glucosa y Xilosa-Arabinosa respectivamente. El porcentaje de celulosa se calculó con la ecuación 5, por otro lado, el porcentaje de hemicelulosa se calculó con la ecuación 6.

$$\% \text{ Celulosa} = [\text{Azúcar}] \times \frac{\text{Volumen}_{\text{filtrado}}}{ODW_{\text{muestra}}} \times 0,90 \times 100 \quad (5)$$

Donde:

- *[Azúcar]*: concentración de glucosa en g/L.
- *Volumen filtrado*: Volumen de trabajo (licor de hidrólisis) en L.
- ODW_{muestra} : peso seco de la muestra en gramos.
- *0,90*: índice para el cálculo del porcentaje de celulosa.

$$\% \text{ Hemicelulosa} = [\text{Azúcar}] \times \frac{\text{Volumen}_{\text{filtrado}}}{ODW_{\text{muestra}}} \times 0,88 \times 100 \quad (6)$$

Donde:

- *[Azúcar]*: suma de las concentraciones de xilosa y arabinosa en g/L.
- *Volumen_{filtrado}*: Volumen de trabajo (licor de hidrólisis) en L.
- *ODW_{muestra}*: peso seco de la muestra en gramos.
- 0,88: índice para el cálculo del porcentaje de hemicelulosa.

Determinación de cenizas

Para este fin se trabajó con los sólidos residuales resultantes de la determinación de lignina insoluble en ácido. Los crisoles de trabajo se prepararon previamente secándolos en una mufla a 250°C por 30 minutos. Al finalizar el tiempo de secado, los crisoles se llevaron a un desecador para luego registrar su peso. El contenido de cada repetición (triplicado) capturado en los crisoles filtrantes fue transferido a un crisol, para luego registrar su peso junto con el peso de la muestra que contenía. Los crisoles fueron llevados a una mufla a 550°C por 6 horas. Al finalizar, los crisoles fueron llevados a un desecador, para luego registrar el peso de cada uno junto con el peso de las cenizas que contenía. El cálculo del porcentaje de cenizas fue realizado empleando la ecuación 7, además de ello, utilizando estos valores, se realizó la corrección del porcentaje de lignina insoluble (ecuación 8) y del porcentaje de lignina total (ecuación 9).

$$\%Cenizas = \frac{\text{masa de producto obtenida}}{\text{materia prima empleada}} \times 100 \quad (7)$$

Donde:

- *Masa de producto obtenida*: Peso de cenizas, en gramos.
- *Materia prima empleada*: Peso de materia prima inicial empleada, en gramos. En este caso se consideraría la suma de pesos secos de biomasa empleada inicialmente para la caracterización.

$$\%LIA_{real} = \frac{(W_{cenizas} \div n)}{ODW_{muestra}} \times 100 \quad (8)$$

Donde:

- $W_{cenizas}$: Peso de las cenizas en gramos.
- n : Número de crisoles filtrantes cuyo contenido fue depositado en un solo crisol de porcelana.
- $ODW_{muestra}$: Peso seco de la muestra en gramos.

$$\%Lignina\ total_{real} = \%LIA_{real} + \%LSA \quad (9)$$

Donde:

- $\%LIA_{real}$: Porcentaje de Lignina Insoluble en Ácido real, valor previamente corregido.
- $\%LSA$: Porcentaje de Lignina Soluble en Ácido, obtenido luego de lecturas espectrofotométricas.

Extracción de hemicelulosas

Se realizaron pruebas de extracción de hemicelulosas, con material libre de extractivos, en base a lo reportado por Ghosh et al. (2021)⁴⁹. Las hojas de cebolla fueron sometidos a un tratamiento alcalino bajo diferentes concentraciones de NaOH (0,5, 1,5 y 2,5) M, expresados también como 2, 6 y 10 % p/v, respectivamente, por duplicado. Se adicionaron aproximadamente 10 g de material seco con 100 ml de NaOH, de cada concentración, a matraces de vidrio de 250 ml y se llevaron a la autoclave por 1 h a 121 °C. Al terminar el ciclo de autoclave se filtró el contenido de cada matraz con ayuda de bolsas de tela, donde la fracción líquida fue sometida a un proceso de extracción de hemicelulosas. Se midió el volumen recuperado de cada fracción líquida obtenida (Figura 4.a), para luego acidificarlas con ácido acético hasta un pH 5. Luego del cambio de pH, se adicionaron 3 volúmenes de etanol al 96%, con respecto al volumen de cada fracción obtenida, para ello se promediaron los volúmenes obtenidos y se agregaron los 3 volúmenes de etanol respecto al promedio calculado, siendo para esta ocasión 223 ml (Figura

4.b). Los extractos se dejaron en refrigeración a 10 °C por 24 horas. Al finalizar el tiempo establecido, se cambió el volumen de etanol inicial por otros 223 ml, esto se llevó a cabo retirando cuidadosamente el sobrenadante, conservando el sólido sedimentado, y se dejó en refrigeración a 10°C por otras 24 horas (Figura 4.c). El etanol fue nuevamente decantado cuidadosamente, y al sólido remanente se le agregaron 50 ml de etanol, nuevamente se dejó en refrigeración a 10°C por 24 horas (Figura 4.d), luego de este tercer lavado con etanol, el precipitado fue recuperado por decantación y se dejó secando en una estufa a 60°C por 24 horas. Para poder verificar cualitativamente la validez del fraccionamiento, los sólidos obtenidos a partir de la fracción líquida fueron analizados por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y se determinó también su porcentaje de cenizas.

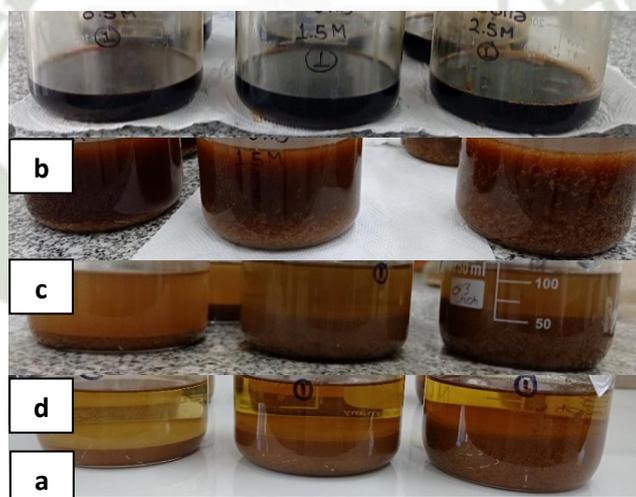


Figura 4. Extracción de hemicelulosas de hojas de cebolla; (a) Fracciones líquidas recuperadas del tratamiento alcalino, (b) Extractos luego del cambio de pH y la adición de etanol, (c) primer y (d) segundo cambio de etanol, el precipitado se recuperó posteriormente.
Nota: autoría propia.

Para el análisis por FTIR es necesario el uso del reactivo bromuro de potasio (KBr), el cual servirá como blanco para las lecturas. Inicialmente se dejó secando tanto el KBr como las muestras a analizar a una temperatura de 103°C por 30 min, para luego dejarlos enfriar en un desecador. Para la preparación del blanco se pesó 50 mg de KBr seco, de la misma manera se pesó la misma cantidad para cada muestra a analizar, la cantidad de muestra a adicionar fue de 0,5 mg. Tanto el blanco como las muestras fueron molidos en un mortero especial, para

luego generar pastillas correspondientes a cada polvo obtenido y su posterior lectura en el equipo de FTIR (Figura 5).



Figura 5. Equipo de FTIR y accesorios empleados para el análisis de hemicelulosa cruda obtenida. Nota: autoría propia.

1.3.1.2. *Tratamiento Hidrotermal de hojas de cebolla*

El tratamiento hidrotermal empleado fue el proceso subcrítico con Agua líquida caliente (*Liquid-Hot Water - LHW*) y se llevó a cabo en reactores Parr sin agitación, de un volumen de trabajo de 25 ml (Figura 6). Se trabajó con $2,5 \pm 0,2$ g de biomasa seca, es decir, hojas de cebolla en polvo, los cuales fueron colocados en el recipiente de PTFE del reactor asignado, junto con 15 ml de agua destilada. Como primera etapa se trabajó con una temperatura constante de 180°C bajo diferentes tiempos de reacción (40, 45, 50, 55, 60, 75, 90) min, para poder determinar el mejor tiempo de reacción para el tratamiento hidrotermal. Los reactores fueron colocados dentro de una estufa en los tiempos de trabajo anteriormente mencionados, cabe resaltar que para cada ensayo se consideró la velocidad de calentamiento y enfriamiento reportada por el fabricante de los reactores siendo esta $\leq 5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, con el fin de calcular el tiempo de espera necesario para llegar a la temperatura de trabajo en cada caso. Los extractos obtenidos luego de cada ensayo fueron evaluados para la determinación de compuestos fenólicos mediante el método de Folin-Ciocalteu y para la cuantificación de xilosa y XOS mediante la técnica de HPLC.



Figura 6. Reactores Parr sin agitación empleados para el tratamiento hidrotérmico de los residuos. Nota: autoría propia.

Cuantificación de Xilosa y XOS obtenidos mediante la técnica de cromatografía líquida (HPLC)

Como ya se ha mencionado, los extractos resultantes de los ensayos para diferentes temperaturas y tiempos de reacción fueron sometidos a evaluación bajo la técnica de HPLC (Figura 7), por duplicado, con el fin de cuantificar la xilosa y XOS presentes luego de cada tratamiento hidrotérmico. Los azúcares (glucosa, xilosa, arabinosa) 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 (IR). 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 µm, los cuales fueron comparados con estándares de entre X₁ y X₄.



Figura 7. Cromatógrafo Líquido de Ultra Alto Rendimiento (UHPLC) utilizado para la cuantificación de xilosa y XOS. Nota: autoría propia.

1.3.2. Producción de XOS a partir de pancas de Maíz Blanco Urubamba (Blanco Gigante Cusco) (*Zea mays*)

1.3.2.1. *Obtención y caracterización composicional de pancas de maíz*

Pancas de maíz

Las pancas del maíz Blanco Urubamba (Blanco Gigante Cusco) (*Zea mays*), fueron obtenidos de los puestos de verduras del mercado “La Chavela” ubicado en el distrito de Miraflores. Estos residuos fueron transportados al laboratorio, limpiados y separados de material no apto, secados hasta una humedad menor al 10%, molidos con un molino manual y almacenados en bolsas herméticas para su posterior caracterización composicional (contenido de extractivos, celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas) (Figura 8).



Figura 8. Preparación de residuos de maíz. (a) Pancas de maíz secas, (b) Molienda de pancas de maíz. Nota: autoría propia.

Caracterización composicional de pancas de maíz

Se realizó la caracterización composicional de los residuos a fin de conocer el contenido de extractivos, celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas de la biomasa. Los análisis fueron realizados en base a las metodologías y procedimientos propuestos por la *National Renewable Energy Laboratory* (NREL), utilizando muestras molidas ⁴⁶⁻⁴⁸.

Determinación de contenido de extractivos

Esta etapa se inició con la medición del contenido de humedad (porcentaje de humedad) de las muestras, con el fin de trabajar con los valores de peso seco de cada una de ellas. El peso seco se determinó con la ecuación 1. La extracción se realizó mediante el método Soxhlet (Figura 9), y se adicionó 1-2 g de muestra molida a sobres tarados de papel filtro, registrándose el peso de cada muestra contenida en los sobres. Este ensayo se realizó por triplicado, es decir, se consideraron tres sobres de trabajo que, al colocarse dentro de la cámara del equipo Soxhlet, su altura no debía exceder la altura del tubo de sifón del equipo. Tomando en cuenta ello, se procedió a ensamblar el resto del equipo Soxhlet. Las muestras fueron sometidas a una extracción exhaustiva de 6 horas, con 350 ml de etanol al 96%. Al finalizar la extracción, los sobres fueron puestos a secar a temperatura ambiente para luego poder registrar el peso de sus contenidos, con el fin de determinar el porcentaje (%) de extractivos solubles en etanol. Los porcentajes de extractivos se calcularon siguiendo la ecuación 2.



Figura 9. Extracción Soxhlet para los residuos de maíz. Nota: autoría propia.

Determinación de carbohidratos estructurales y lignina

El procedimiento a continuación se realizó utilizando el material libre de extractivos (Figura 10.a) y consistió en una hidrólisis ácida de dos pasos, que permitió fraccionar la biomasa de manera que pudo cuantificarse más fácilmente mediante espectroscopía UV-Vis y HPLC (1). Los ensayos se realizaron por triplicado, el análisis se inició pesando $300,0 \pm 10,0$ mg de

muestra en cada tubo de vidrio de trabajo tarado. Se registró el porcentaje de humedad de la muestra y el peso de muestra contenido en cada tubo. Luego, se agregaron $3,00 \pm 0,01$ ml de ácido sulfúrico al 72% p/p a cada tubo y con la ayuda de una varilla de vidrio se mezcló el contenido de cada uno de ellos (Figura 10.b). Los tubos se colocaron en un baño de agua a 30 ± 3 °C durante 60 ± 5 minutos. Durante el tiempo de incubación, las muestras fueron agitadas cada 10 minutos, sin retirar los tubos del baño de agua. Completada la hidrólisis de 60 minutos (Figura 10.c), los tubos se retiraron del baño de agua y se procedió a diluir el ácido a una concentración del 4% agregando $84,00 \pm 0,04$ ml de agua destilada, para este fin el contenido de los tubos fue transferido a matraces de 100 ml. Los matraces fueron colocados en la autoclave durante una hora a 121°C. Después de completar el ciclo de autoclave, los hidrolizados se dejaron enfriando hasta llegar a temperatura ambiente.



Figura 10. Determinación de carbohidratos estructurales y lignina; (a) Material libre de extractivos, (b.) Adición de H_2SO_4 al 72% p/p, (c) Muestras al culminar la incubación de 60 minutos. Nota: autoría propia.

Determinación de lignina insoluble en ácido

Para la determinación de lignina insoluble en ácido se filtraron al vacío los hidrolizados esterilizados en autoclave a través de crisoles filtrantes asignados, previamente pesados. El filtrado se recolectó y se tomó una alícuota de aproximadamente 50 ml, reservados en tubos Falcon de la misma capacidad, para poder determinar posteriormente la lignina soluble en ácido y los carbohidratos presentes; para este fin, los filtrados, se conservaron en refrigeración para su posterior análisis. Luego de haber recolectado apropiadamente la alícuota de hidrolizado, se

utilizó agua destilada para la transferencia cuantitativa de todos los sólidos restantes de los matraces a sus respectivos crisoles filtrantes. Los crisoles junto con los residuos insolubles en ácido fueron secados a 105 ± 3 °C por 4 horas, al finalizar el tiempo de secado, las muestras se enfriaron en un desecador para después registrar los pesos del crisol junto a los residuos secos. El cálculo del porcentaje de lignina insoluble en ácido (LIA) fue realizado empleando la ecuación 3.

Determinación de lignina soluble en ácido

Para la determinación de lignina soluble en ácido se llevó a cabo un análisis de espectrofotometría UV-visible, utilizando como blanco agua destilada. Se analizaron las alícuotas recolectadas previamente y se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda apropiada, la cual se definió considerando lo reportado por Sluiter et al. (2012)⁴⁷ para el tipo de biomasa correspondiente a rastrojo de maíz, siendo esta 320 nm. Cabe resaltar también que para este tipo de biomasa se utilizó un valor de $\epsilon = 30$. Las muestras fueron diluidas con agua destilada, según fue necesario, para llevar las absorbancias obtenidas al rango de 0,7 – 1,0. El cálculo de la cantidad de lignina soluble en ácido (LSA) fue realizado empleando la ecuación 4.

Determinación de carbohidratos estructurales

Los carbohidratos estructurales fueron determinados por cromatografía líquida (HPLC). Por cada muestra de alícuota recolectada en las etapas previas se prepararon viales por duplicado. Para la preparación de cada vial, las muestras fueron pasadas por filtros de jeringa de nylon de $0,20 \mu\text{m}$. Cada vial contenía aproximadamente 1 ml de muestra. Los resultados se expresaron en g/L de Glucosa, Xilosa y Arabinosa, a partir de estos valores se calculó el porcentaje de Celulosa y Hemicelulosa con los resultados de concentración obtenidos de Glucosa y Xilosa-Arabinosa respectivamente. El porcentaje de celulosa se calculó con la ecuación 5, por otro lado, el porcentaje de hemicelulosa se calculó con la ecuación 6.

Determinación de cenizas

Para este fin se trabajó con los sólidos residuales resultantes de la determinación de lignina insoluble en ácido. Los crisoles de trabajo se prepararon previamente secándolos en una mufla a 250°C por 30 minutos. Al finalizar el tiempo de secado, los crisoles se llevaron a un desecador para luego registrar su peso. El contenido de cada repetición (triplicado) capturado en los crisoles filtrantes fue transferido a un crisol, para luego registrar su peso junto con el peso de la muestra que contenía. Los crisoles fueron llevados a una mufla a 550°C por 6 horas. Al finalizar, los crisoles fueron llevados a un desecador, para luego registrar el peso de cada crisol junto con el peso de las cenizas que contenía. El cálculo del porcentaje de cenizas fue realizado empleando la ecuación 7, además de ello, utilizando estos valores, se realizó la corrección del porcentaje de lignina insoluble (ecuación 8) y del porcentaje de lignina total (ecuación 9).

Extracción de hemicelulosas

Se realizaron pruebas de extracción de hemicelulosas en base a lo trabajado por Puițel et al. (2022)⁵⁰. Las pancas de maíz fueron sometidos a un tratamiento alcalino bajo una concentración de NaOH 2,25 M, expresado también como 9% p/v, por triplicado. Se adicionaron aproximadamente 10 g de material seco con 300 ml de NaOH al 9% p/v y se llevaron a la autoclave por 118 min a 116°C. Al terminar el ciclo de autoclave se filtró el contenido de cada matraz con ayuda de bolsas de tela, la fracción líquida obtenida fue sometida a un proceso de extracción de hemicelulosas. Se midió el volumen recuperado de cada fracción líquida obtenida, para luego acidificarlas con ácido acético hasta un pH 5. Luego del cambio de pH, se adicionaron 2 volúmenes de etanol al 96% (Figura 11.a), con respecto al volumen de cada fracción obtenida, para ello se promediaron los volúmenes obtenidos y se agregaron los 2 volúmenes de etanol respecto al promedio calculado, siendo para esta ocasión 650 ml. Los extractos se dejaron en refrigeración a 10°C por 24 horas. Al finalizar el tiempo establecido, se

retiró cuidadosamente el sobrenadante, conservando el sólido sedimentado, y se adicionó 200 ml de etanol para dejarse nuevamente en refrigeración a 10°C por 24 horas (Figura 11.b), al finalizar el tiempo de espera luego del segundo lavado con etanol (Figura 11.c), el precipitado fue recuperado por decantación y se dejó secando en una estufa a 60°C por 24 horas. Para poder verificar cualitativamente la validez del fraccionamiento, los sólidos obtenidos a partir de la fracción líquida fueron analizados por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y se determinó también su porcentaje de cenizas.

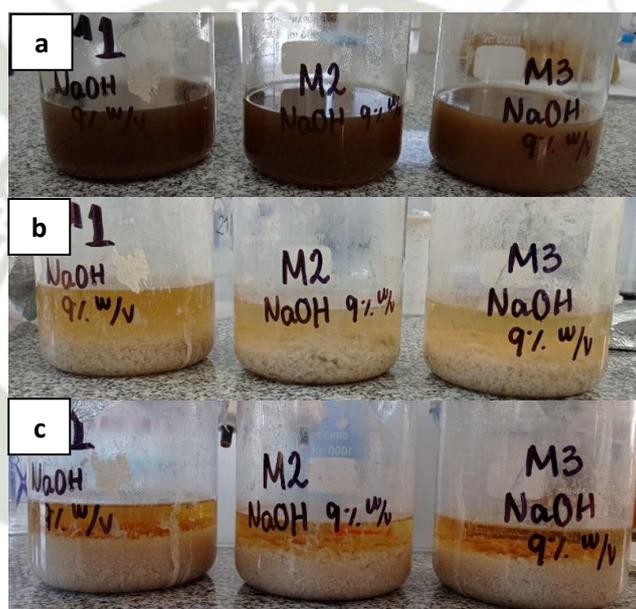


Figura 11. Extracción de hemicelulosas de pancas de maíz; (a) Extractos luego del cambio de pH y la adición de etanol, (b) primer cambio de etanol y (c) muestras luego de 24 h, el precipitado se recuperó posteriormente. Nota: autoría propia.

1.3.2.2. Tratamiento hidrotérmico de pancas de maíz

Hidrólisis en reactores Parr sin agitación

El tratamiento hidrotérmico empleado fue el proceso subcrítico con Agua líquida caliente (*Liquid-Hot Water* – LHW) y se llevó a cabo en reactores Parr sin agitación, de un volumen de trabajo de 25 ml. Se trabajó con $2,5 \pm 0,2$ g de biomasa seca, es decir, pancas de maíz en polvo, los cuales fueron colocados en el recipiente de PTFE del reactor asignado, junto con 15 ml de

agua destilada. Como primera etapa se trabajó con una temperatura constante de 180°C bajo diferentes tiempos de reacción (50, 65, 70, 75, 80, 85 y 90) min, para poder determinar el mejor tiempo de reacción para el tratamiento hidrotermal. Por otro lado, también se trabajó con un tiempo de reacción constante de 75 min bajo diferentes temperaturas de reacción (160, 175 y 180) °C, con el fin de determinar la mejor temperatura para llevar a cabo la reacción. Los reactores fueron colocados dentro de una estufa en las temperaturas de trabajo anteriormente mencionadas, cabe resaltar que para cada ensayo se consideró la velocidad de calentamiento y enfriamiento reportada por el fabricante de los reactores siendo esta ≤ 5 °C/min, con el fin de calcular el tiempo de espera necesario para llegar a la temperatura de trabajo en cada caso. Los extractos obtenidos luego de cada ensayo fueron evaluados para la determinación de compuestos fenólicos mediante el método de Folin-Ciocalteu y para la cuantificación de xilosa y XOS mediante la técnica de HPLC.

Tratamiento hidrotermal bajo las mejores condiciones

Luego de los ensayos previos se determinaron las mejores condiciones de reacción considerando un tiempo de 75 min a una temperatura de 180°C. Utilizando las mismas proporciones biomasa/solvente se realizó la obtención de un extracto rico en XOS, el cual pasó por una posterior etapa de concentración mediante filtración por membranas.

Hidrólisis en reactor Parr con agitación

El tratamiento hidrotermal llevado a cabo en este reactor también correspondió al proceso subcrítico con agua caliente (*Liquid-Hot Water – LHW*) (Figura 12.a). Se trabajó con $50,0 \pm 1,0$ g de biomasa seca y con 600 ml de agua destilada para tiempos de 15, 30 y 45 min. Los ensayos fueron realizados considerando una temperatura de reacción de 180°C y una velocidad de agitación de 100 rpm. Los extractos obtenidos luego de cada ensayo fueron filtrados a través de papel filtro cualitativo Whatman 4 (Figura 12.b) para luego ser evaluados y realizarse la cuantificación de xilosa y XOS, presentes en los extractos, mediante la técnica de HPLC. Es

así como también se determinaron las mejores condiciones de trabajo empleando este tipo de reactor, el extracto obtenido bajo estas condiciones también fue sometido a una etapa de concentración mediante filtración de membranas.

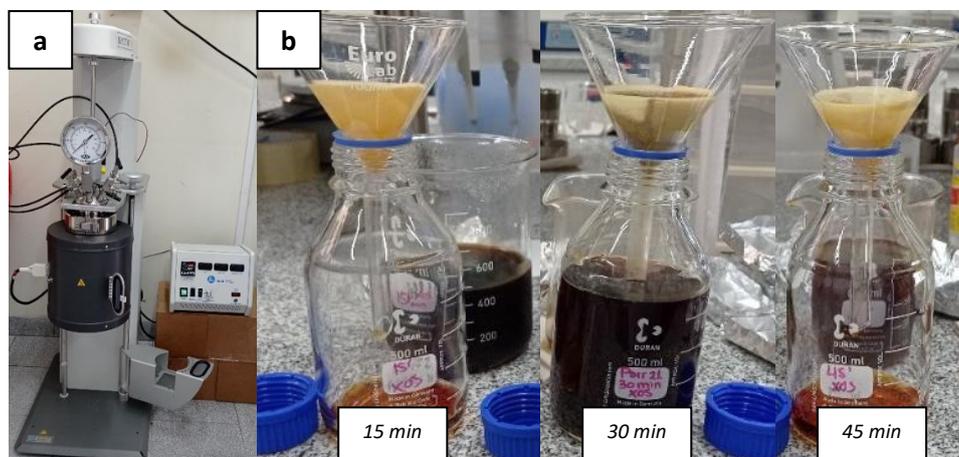


Figura 12. Tratamiento hidrotérmico en reactor Parr agitado; (a) Equipo Parr con agitación (b) filtración de extractos obtenidos en diferentes tiempos de reacción. Nota: autoría propia.

Concentración de XOS mediante filtración por membranas

Para esta etapa se empleó un sistema de filtración por membranas asistido con inyección de gas nitrógeno (Figura 13) y membranas poliméricas MWCO de diferentes tamaños de poro. Se realizaron diferentes ensayos tanto para el extracto obtenido del proceso con reactores Parr sin agitación y para el extracto obtenido del proceso en el reactor Parr con agitación. Los extractos utilizados en esta etapa fueron los resultantes de las mejores condiciones para cada ensayo, en cada etapa de filtración se registró tanto el tiempo como el volumen de extracto obtenido, con el fin de comparar el flujo de volumen registrado en cada filtración, además de tomarse alícuotas de los extractos de entrada y salida (permeado y retentado) para evaluar la concentración de Xilosa y XOS (g/L) mediante HPLC. Para los ajustes de pH requeridos se utilizó NaOH (0,5 N) y HCl (0,5 N).



Figura 13. Sistema de filtración por membranas asistido con inyección de gas nitrógeno.
Nota: autoría propia.

Concentración de extracto obtenido de reactores Parr sin agitación

Pruebas con diferentes pH

El extracto fue inicialmente filtrado a través de papel filtro Whatman para eliminar las impurezas que pudieran estar presentes en el extracto original, luego fue sometido a pruebas preliminares bajo diferentes valores de pH (4, 5,5 y 7) utilizando una membrana de ultrafiltración de 10 kDa, a una presión de 20 bar.

Filtración por membranas

El proceso de filtración por membranas se realizó en 3 etapas: i) Ultrafiltración (UF): 10 kDa, pH 7, 20 bar; ii) Nanofiltración (NF): 500 Da, pH 4, 30 bar y iii) Nanofiltración (NF): 150-300 Da, pH 4 y 7, 40 bar.

En la primera etapa, utilizando membranas de 10 kDa, se realizaron dos operaciones de diafiltración (DF) con agua destilada adicionales, para el retentado obtenido de la filtración principal y de la primera DF, respectivamente. El permeado de la filtración principal y el obtenido de la primera DF se mezclaron para poder pasar a la segunda etapa de filtración,

utilizando una membrana de 500 Da, el retentado resultante pasó a la tercera etapa de filtración empleando membranas de 150-300 Da, a pH 4 y 7.

Concentración de extracto obtenido de reactor Parr con agitación

Retención de compuestos fenólicos

El extracto fue inicialmente filtrado a través de papel filtro Whatman 40 para eliminar las impurezas que pudieran estar presentes en el extracto original. Se realizaron dos tipos de ensayos en esta primera etapa, parte del extracto original (150 ml) fue sometido a un proceso de retención de compuestos fenólicos empleando cartuchos de columna C18, el extracto pasó dos veces consecutivas por esta columna, se utilizaron dos diferentes cartuchos en cada paso. Otra fracción del extracto original (150 ml) fue sometida directamente al proceso de filtración por membranas. Los cartuchos de columna C18 fueron activados antes de su uso, haciendo pasar a través de ellos 2 volúmenes de etanol al 96% (20 ml) para luego ser lavados con 4 volúmenes de agua destilada (40 ml); todo el proceso descrito se observa en la Figura 14. Se tomaron alícuotas de los extractos en cada etapa posterior, las cuales fueron analizadas utilizando HPLC para cuantificar la xilosa y XOS presentes en cada muestra y también para la determinación de compuestos fenólicos presentes por el método de Folin-Ciocalteu.

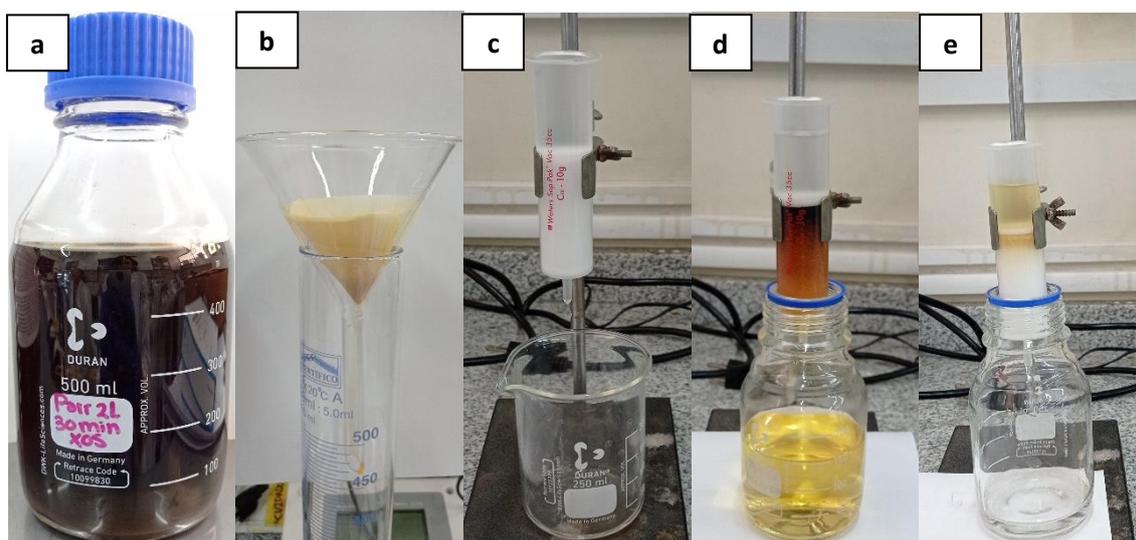


Figura 14. Retención de compuestos fenólicos; Extracto obtenido en 30 minutos a 180°C (a), Filtración del extracto a través de papel filtro Whatman 40 (b), Activación de cartucho C18 (c), primer (d) y segundo (e) paso del extracto a través de cartucho C18. Nota: autoría propia.

Filtración por membranas de extracto sometido a retención de compuestos fenólicos

El proceso de filtración se realizó por duplicado y constó de dos etapas: i) Nanofiltración (NF): 600-800 Da, pH 7, 30 bar y ii) Nanofiltración (NF): 150 Da, pH 3,73, 40 bar.

En la primera etapa, utilizando membranas de 600-800 Da, se realizó una operación de DF adicional con agua destilada, para el retentado obtenido de la filtración principal. El volumen de agua destilada añadido dependió de la cantidad de retentado recuperada, teniendo que triplicarse el volumen del retentado original solamente adicionando agua destilada, siendo este el nuevo volumen de entrada para cada DF (a partir de esta en adelante). El permeado de la filtración principal y el obtenido de la DF se mezclaron para poder pasar a la segunda etapa de filtración, utilizando una membrana de 150 Da.

Filtración por membranas de extracto no sometido a retención de compuestos fenólicos

Este proceso de filtración también se realizó por duplicado y constó de cuatro etapas: i) Ultrafiltración (UF): 10 kDa, pH 7, 20 bar, ii) Ultrafiltración (UF): 1000 Da, pH 7, 20 bar, iii) Nanofiltración (NF): 600-800 Da, pH 7, 30 bar y iv) Nanofiltración (NF): 150 Da, pH 3,78, 40 bar.

En la primera, segunda y tercera etapa se realizó una operación de DF adicional con agua destilada, para el retentado obtenido de la filtración principal de cada etapa mencionada. Los permeados de la filtración principal y los obtenidos de la DF se mezclaron para poder pasar a la siguiente etapa, consecutivamente. La cuarta etapa consistió en una sola filtración empleando la mezcla de permeados obtenidos en la tercera etapa (permeado de filtración + permeado de diafiltración).

Cuantificación de Xilosa y XOS obtenidos mediante la técnica de cromatografía líquida (HPLC)

Como ya se ha mencionado, se tomaron alícuotas de los extractos en cada etapa del proceso de obtención de XOS a partir de pancas de maíz, para luego ser sometidos a evaluación bajo la técnica de HPLC por duplicado, con el fin de cuantificar la xilosa y XOS presentes. Cabe resaltar que, a partir de la etapa de tratamiento hidrotérmico en reactor Parr agitado hasta la etapa de filtración por membranas, para la preparación de cada vial, las muestras fueron pasadas por filtros de jeringa del mismo material que los cartuchos de columna C18, con el fin de retener parte de los compuestos fenólicos presentes en cada muestra. Cada vial contenía aproximadamente 1 ml de muestra.

1.4. Diagrama de flujo de actividades

1.4.1. Producción de XOS a partir de hojas de cebolla

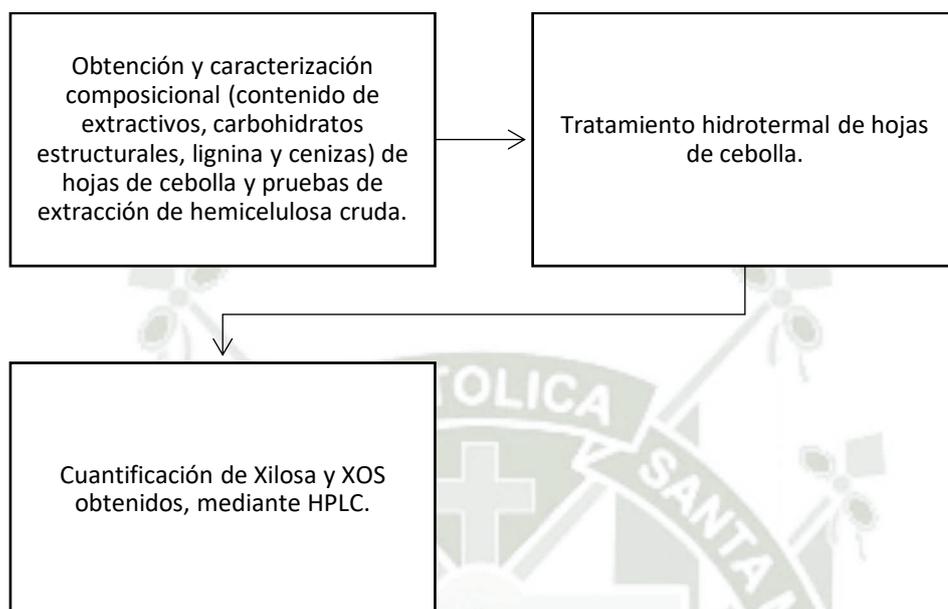


Figura 15. Obtención de XOS a partir de hojas de cebolla. Nota: autoría propia.

1.4.2. Producción de XOS a partir de pancas de maíz

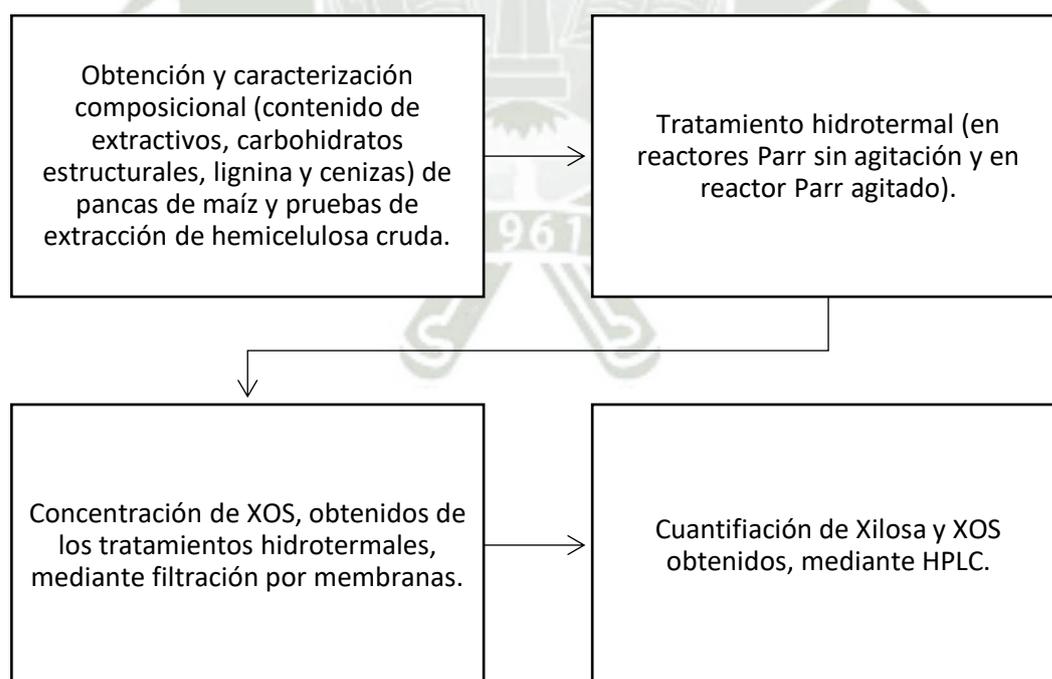


Figura 16. Obtención de XOS a partir de pancas de maíz. Nota: autoría propia.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Producción de XOS a partir de hojas de Cebolla (*Allium cepa L.*)

3.1.1. Caracterización composicional de hojas de cebolla

Las hojas de cebolla fueron caracterizadas en su contenido de extractivos, celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas, los mismos que se muestran en la Tabla 2. Como se muestra, las hojas de cebolla presentan un 26,40% de celulosa, 5,05% de hemicelulosa y 5,37% de lignina. Los resultados obtenidos fueron mucho menores en comparación con lo reportado por Reddy & Rhim (2018)⁸ donde la composición química de este mismo material residual fue de 45,5% de celulosa, 25,5% de hemicelulosa y 26,2% de lignina, además el porcentaje de extractivos resultó también siendo menor con un valor de 2,8%. Sin embargo, de acuerdo con las características del material, el contenido de extractivos no podía ser muy bajo conforme a lo reportado por Reddy & Rhim (2018)⁸, ya que el tratamiento con etanol removió más del 31% del peso seco, adicionalmente el tratamiento con agua permitió la remoción del 36% del peso, lo cual indica que el material presenta una compleja estructura y composición elevada de extractivos. Por ejemplo, las hojas de cebolla fresca contienen principalmente compuestos como polifenoles, flavonoides, carotenoides, vitaminas y clorofilas⁵¹. Por lo tanto, la diferencia en los resultados de composición obtenidos podría atribuirse a los distintos métodos analíticos y a la variedad trabajada. Por otra parte, el contenido de cenizas (0,74%) se contrasta con lo reportado por Bhadwal et al. (2022)⁵² donde el contenido de cenizas para hojas de cebolla fue de 0,15 %.

Tabla 2. Composición química de hojas de cebolla. Nota: autoría propia.

Extractivos (%)	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)	Cenizas (%)
66,82 ± 1,00	26,40 ± 0,00	5,05 ± 0,00	5,37 ± 0,17	0,74 ± 0,00

Extracción de hemicelulosas

Las hojas de cebolla, libre de extractivos, fueron utilizados para la obtención de hemicelulosa a través de procesos alcalinos utilizando diferentes concentraciones de NaOH (0,5, 1,5 y 2,5 M), por 1 h a 121 °C, con una carga de sólido-líquido de 10%. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Porcentaje de hemicelulosa cruda recuperada en el proceso alcalino. Nota: autoría propia.

Tratamiento Alcalino	Biomasa inicial (g)	Hemicelulosa cruda recuperada		
		Peso (g)	Rendimiento hemicelulosa cruda (%)	Cenizas (%)
NaOH 0,5 M	9,14 ± 0,04	1,32 ± 0,04	14,49	39,20 ± 2,42
NaOH 1,5 M	9,31 ± 0,04	1,84 ± 0,14	19,73	33,00 ± 0,28
NaOH 2,5 M	9,28 ± 0,04	3,02 ± 0,97	32,52	37,12 ± 0,76

Esta sección estuvo enfocada en la extracción de hemicelulosas con NaOH, este tipo de tratamiento alcalino altera la pared celular disolviendo la lignina de las hemicelulosas, hidrolizando los ésteres urónicos y acéticos, hinchando la celulosa y reduciendo su cristalinidad y rompiendo los enlaces α -éter y los enlaces éster presentes entre la lignina y las hemicelulosas⁵³. Los precipitados del filtrado tras la adición de etanol se recogieron con un rendimiento de hemicelulosa cruda entre el 14% y el 32%, entre los cuales se destacó, en este caso, el rendimiento obtenido en base al tratamiento alcalino con NaOH 2,5 M (Tabla 3). Los tratamientos alcalinos han sido ampliamente estudiados para la extracción de fracciones de hemicelulosa a partir de residuos, por ejemplo, Kundu et al. (2018)⁵⁴ utilizaron NaOH para la extracción de hemicelulosa, a partir de mazorca de maíz, alcanzando hasta un 44% de rendimiento de hemicelulosa cruda en condiciones no optimizadas (NaOH 2,5 M, 100°C, 60 min). Efectivamente, los resultados de Kundu et al. no pueden ser comparados con los

obtenidos en este trabajo, ya que son materiales con características diferenciadas, pero se puede evidenciar que existen muchos factores que van a influenciar en el rendimiento y la pureza del producto. En la Tabla 3, se puede observar también que el contenido de ceniza o material inorgánico en los polvos obtenidos por proceso alcalino es alto, esto se debe principalmente a las sales formadas durante la neutralización con ácido acético, el NaOH y el material inorgánico presente en el material. Además, es conocido que los extractos provenientes de procesos alcalinos aplicados a materiales lignocelulósicos contienen hemicelulosas, oligómeros de lignina, monómeros fenólicos, ácido acético y sales inorgánicas ⁵⁵. Sin embargo, muchos de estos componentes no son recuperados en la etapa de precipitación con etanol.

Los sólidos recuperados de hemicelulosa cruda (Figura 17) fueron analizados por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) a fin de verificar la presencia de hemicelulosa en el polvo, los mismos que se muestran en la Figura 19.

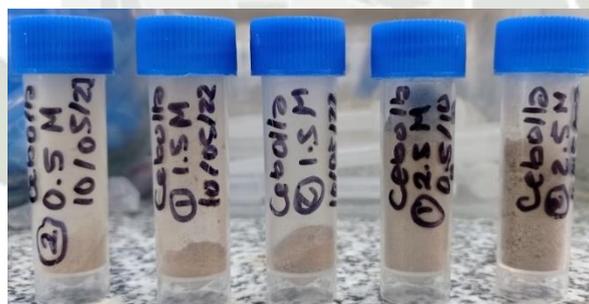


Figura 17. Sólidos recuperados de hemicelulosa cruda luego de su aislamiento a partir de hojas de cebolla. Nota: autoría propia.

Los espectros FTIR fueron comparados con los reportados en la literatura científica. Por ejemplo, Salam et al. (2012) ⁵³ reporta la Figura 18 correspondiente a una hemicelulosa nativa, donde se observan las absorbancias a 1638, 1580, 1467, 1414, 1342, 1268, 1170, 1129, 1045 y 898 cm^{-1} . La presencia de una banda aguda a 897 cm^{-1} sería característica de los enlaces β -glucosídicos entre las unidades de azúcares. La banda a 1045 cm^{-1} se asignaría a los modos de estiramiento C-O y C-O-C y de flexión C-OH. La aparición de otras dos bandas prominentes a 1414 y 1467 cm^{-1} se atribuiría a los modos de flexión C-H en la hemicelulosa, OH y CH_2 ,

respectivamente. En 3420 cm^{-1} la banda ancha intensa se debería a los grupos hidroxilo de enlace de hidrógeno y en 2890 cm^{-1} aparecería la banda de vibración C-H simétrica ⁵³. La ausencia de picos a 1700 cm^{-1} , que corresponden a grupos carboxílicos, indicaría que el producto no contiene impurezas como el ácido acético ⁵³. Las bandas de absorción de la hemicelulosa nativa presentan semejanza a los obtenidos en las diferentes muestras de hemicelulosa cruda obtenida, sin embargo, las diferencias en las intensidades de las bandas pueden deberse a la pureza del tipo de material del cual fue obtenido la hemicelulosa nativa.

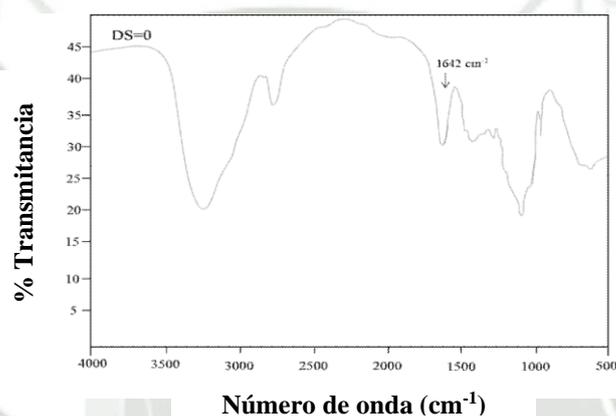


Figura 18. Espectro FT-IR de hemicelulosa nativa. Adaptado de Salam et al. ⁵³.

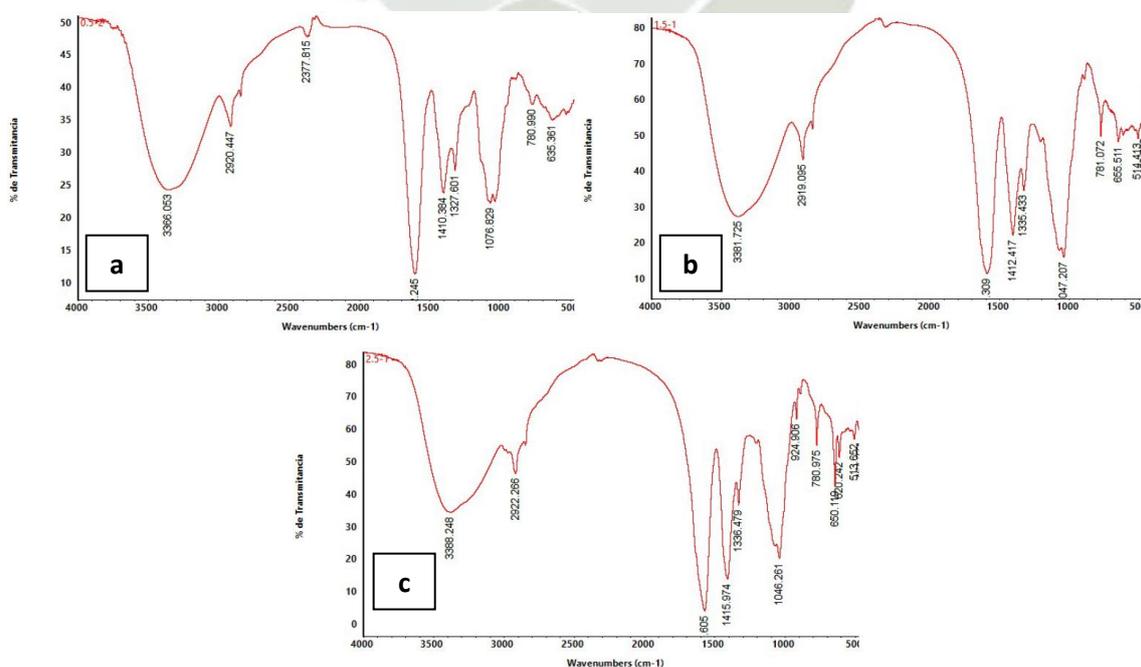


Figura 19. Espectros de Infrarrojo correspondientes a los sólidos recuperados sometidos a tratamiento alcalino con NaOH a 0.5 M (a), 1.5 M (b), 2,5 M (c). Nota: autoría propia.

Como se ha observado, los polvos denominados hemicelulosa cruda presentan hemicelulosa en su composición, sin embargo, es necesario en una etapa posterior purificarla a fin de mejorar los procesos de hidrólisis posteriores para la producción de XOS. No obstante, considerando el porcentaje de hemicelulosa en el material (hojas de cebolla), esta vía no sería muy conveniente. De esta forma, se evaluó la vía hidrotérmica para la conversión de la hemicelulosa en el material de forma directa a XOS, lo que se muestra en la siguiente sección.

3.1.2. Tratamiento Hidrotermal de hojas de cebolla para producción de XOS

Las hojas de cebolla libre de extractivos fueron sometidos a un proceso hidrotérmico a 180 °C a fin de producir XOS. Los experimentos fueron realizados por 40, 45, 50, 55, 60, 75 y 90 min, los resultados de estas pruebas se muestran en la Tabla 4, en los extractos obtenidos en el proceso hidrotérmico, se analizaron los contenidos de xilosa y XOS por HPLC y compuestos fenólicos.

Tabla 4. Resultados de las pruebas realizadas a los hidrolizados obtenidos en diferentes tiempos. Nota: autoría propia.

Tiempo de reacción (min)	Compuestos fenólicos totales (g EAG/L)	Xilosa (g/L)	XOS (X ₂ -X ₄) (g/L)
40	3,27 ± 0,06	0,55 ± 0,25	0,96
45	3,36 ± 0,38	0,36 ± 0,14	0,97
50	3,69 ± 0,10	0,23 ± 0,00	1,45
55	3,20 ± 0,50	0,23 ± 0,05	1,42
60	3,48 ± 0,08	0,28 ± 0,07	1,39
75	4,09 ± 0,09	0,23 ± 0,06	1,00
90	4,26 ± 0,09	0,25 ± 0,01	0,77

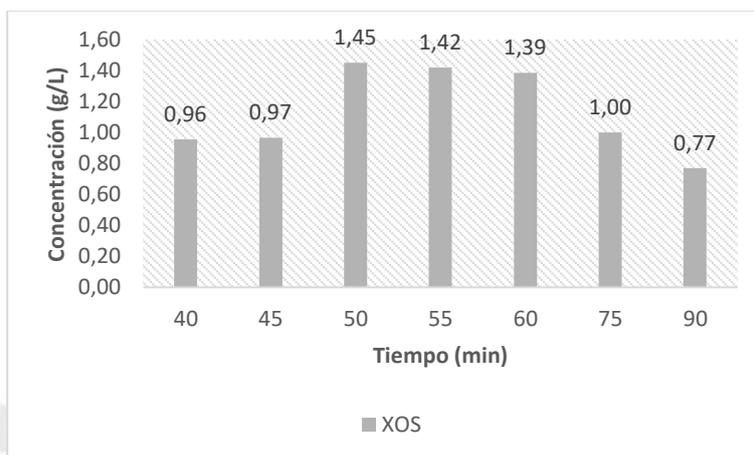


Figura 20. Concentración de XOS obtenida bajo diferentes tiempos de reacción a una temperatura constante de 180°C. Nota: autoría propia.

Como se observa en la Tabla 4 y en la Figura 20, el mejor tiempo de reacción a una temperatura constante de 180 °C fue el de 50 min, debido a que en este tiempo de reacción se observó la mayor cantidad de XOS (1,45 g/L), donde el 19% correspondía a X₂ y el 81% a X₃. Respecto a la xilosa, se observó una disminución en la concentración con el incremento en el tiempo de proceso, esto se debe principalmente a la conversión de xilosa en furfural, conforme reportado por Jönsson & Martín ¹². Además, tiempos prolongados de tratamiento hacen que los oligómeros también disminuyan en su concentración, como es observado en tiempo mayores a 60 min. El tiempo de tratamiento es fundamental y depende de las características del material, lo que significa que las condiciones ideales serán diferentes. Adicionalmente, 3,69 g/L de compuestos fenólicos totales fueron determinados en el extracto obtenido en 50 min de tratamiento.

La concentración de XOS (X₂-X₄) obtenida luego del tratamiento hidrotermal a 180°C durante 50 min es de 1,45 g/L, cantidad muy baja para considerar este tipo de residuos como potencial fuente de xilooligosacáridos, pues se estaría obteniendo 0,9 g de XOS por 100 g de material (hojas de cebolla). Este tipo de procesamiento hidrotermal, el cual es considerado una tecnología libre de solventes orgánicos por solo utilizar agua como solvente, es capaz de solubilizar la hemicelulosa en oligómeros de interés. Esta tecnología no fue previamente

reportada para residuos de cebolla, sin embargo, esta misma técnica fue empleada para la producción de xilooligosacáridos a partir de bagazo de caña de azúcar, donde Monteiro et al. (2022) reportaron la producción de 6,76 g de XOS a partir de 100 g de bagazo de caña de azúcar al trabajar a 180°C, con una presión de 2,5MPa en 15 minutos ⁵⁶. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, al compararse con los resultados reportados por Monteiro et al., resultan bastante inferiores, además de considerarse el bajo contenido de hemicelulosa en el material. Hasta la fecha no existen reportes del uso de hojas de cebolla para la producción de XOS, sin embargo, se consideró este residuo como una posible nueva fuente de este tipo de compuesto de interés al presentar una fracción aprovechable para este fin, esto se reportó en el trabajo realizado por Reddy & Rhim (2018), el cual estuvo enfocado en la extracción y caracterización de microfibras de celulosa a partir de residuos agrícolas de cebolla y ajo; trabajo en el cual se reportó que las hojas (tallos falsos) de cebolla utilizados contenían 2,8% de extractivos, 45,5% de celulosa, 25,5% de hemicelulosa y 26,2% de lignina ⁸, resultados que, como ya se ha visto, difieren considerablemente de lo obtenido en el presente trabajo. Si bien, al parecer las hojas de cebolla no son una potencial fuente para la producción de XOS, considerando el bajo porcentaje de hemicelulosa en su composición, estos pueden presentar otro tipo de compuestos de interés como compuestos fenólicos. Además, el contenido relativamente alto de celulosa en los residuos de tallo de cebolla sugiere que tienen un alto potencial para su utilización como una nueva fuente de recursos de biopolímeros ⁸. Otro tipo de residuo aprovechable de cebolla es la piel de este bulbo, de la cual pueden aislarse fibrillas nanocelulósicas, como en el trabajo de Datta et al. (2023) ⁵⁷, mediante procesos de cloración y extracción alcalina; en este trabajo, la presencia de 43,4% de celulosa con menor contenido de hemicelulosas (15,1%) y lignina (39,3%) indicaba que este tipo de residuo era una fuente adecuada para la extracción de nanofibras de celulosa, las cuales pueden utilizarse eficazmente como membrana para aplicaciones de barrera de gases y como relleno en biocompuestos ⁵⁷. Existe otra forma de

aprovechar los residuos de cebolla al estar estos incluidos en una matriz mixta de otros residuos vegetales, es el caso presentado por Blue et al. (2023)⁵⁸ el cual utilizó un pretratamiento alcalino con KOH de una matriz de residuos vegetales, que contenía predominantemente cebollas, con el objetivo principal de encontrar una condición que maximizara el rendimiento de azúcares fermentables y minimizara al mismo tiempo el de inhibidores de fermentación; en este trabajo se obtuvo un rendimiento óptimo de azúcar de ~0,46 g/g de residuos vegetales secos a 150°C, 3,5% en peso de KOH y 30 min, este pretratamiento también dio lugar a un rendimiento de ácido orgánico de ~0,36 g/g de residuos vegetales secos, sin furanos detectables. Los azúcares y los ácidos orgánicos podrían servir como productos químicos de plataforma para el desarrollo de una biorrefinería urbana⁵⁸.

En base a las consideraciones descritas, se optó por utilizar otro material lignocelulósico con mayor porcentaje de hemicelulosa en su composición, seleccionando las pancas de maíz blanco de la variedad Urubamba para evaluar su potencial para la producción de XOS.

3.2. Producción de XOS a partir de pancas de Maíz Blanco Urubamba (Blanco Gigante Cusco) (*Zea mays*)

4.2.1. Caracterización composicional de pancas de maíz

Las pancas de maíz fueron caracterizadas en su contenido de extractivos, celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas, los mismos que se muestran en la Tabla 5. Como se observa, las pancas de maíz contienen un 34,06% de celulosa, 31,70% de hemicelulosa y 4,65% de lignina, valores que se encuentran dentro de los reportados en la literatura científica. Teniendo los datos mostrados en la Tabla 5 como referencia, se puede observar una notoria diferencia entre el porcentaje de extractivos presentes en la muestra, considerando que el tratamiento con etanol removió más del 32% del peso del material, lo que indicaría que el material de estudio presenta una composición relativamente elevada de extractivos. Por ejemplo, las pancas de

maíz contienen otros componentes como proteínas, lípidos y almidón⁵⁹ y compuestos fenólicos como polifenoles, taninos y flavonoides⁶⁰, de modo que los diferentes resultados de composición obtenidos podrían atribuirse a los distintos métodos analíticos utilizados y variedades trabajadas.

Tabla 5. Comparación de la composición química de la fibra lignocelulósica analizada (pancas de maíz). NR: no reportado. Nota: autoría propia.

Fuente	Extractivos (%)	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)	Cenizas (%)
Este estudio	32,88 ± 0,51	34,06 ± 0,00	31,70 ± 0,00	4,65 ± 0,03	2,78 ± 0,00
Chen et al. (2023) ¹⁰	NR	28,95	42,94	10,37	NR
Michelin & Teixeira (2016) ⁶¹	NR	32,50	30,40	15,5	2,00
Jantip & Suwanruji (2011) ⁶²	17,92	56,39	21,93	7,64	3,65
Barl et al. (1991) ⁶³	NR	38,20	44,50	6,60 (Klason)	2,80
Barl et al. (1986) ⁶⁴	NR	38,80	44,50	7,10 (Klason)	2,80

Existe una importante diferencia entre composición lignocelulósica de los residuos utilizados (Figura 21), donde claramente destacan las pancas de maíz por sobre las hojas de cebolla. Esto podría deberse a varios factores empezando por el hecho de que son plantas de especies diferentes lo que conlleva a las diferencias en la composición química en sus tejidos. Además, influye la parte de la planta sometida a análisis, ya que también existen variaciones en la composición debido a esto. Otra de las principales razones de esta diferencia puede deberse a la necesidad de rigidez que deben tener estos tejidos y a la función que estos cumplen en las plantas. Mientras que las pancas en el maíz deben proporcionar una mayor rigidez para soportar la altura y peso de las mazorcas (lo que conlleva a una composición rica en celulosa y hemicelulosa), las hojas de cebolla, al tratarse de una planta bulbosa, no necesitarían ser tan rígidas, ya que no deben soportar tanto peso.

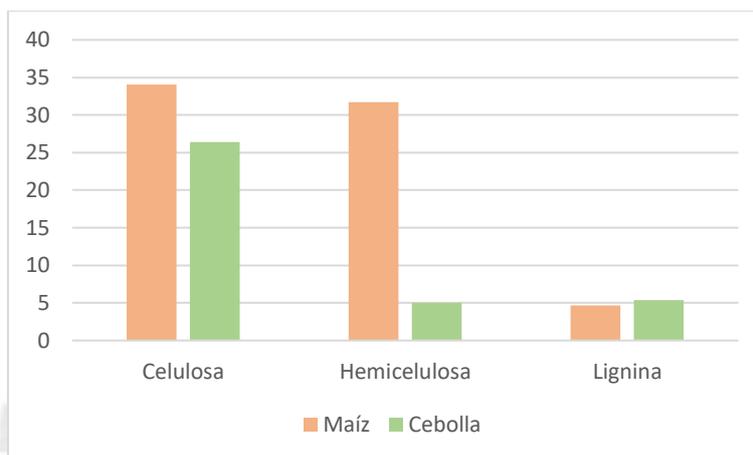


Figura 21. Diferencias en la composición lignocelulósica de residuos de cebolla y maíz.

Extracción de hemicelulosas

Las pancas de maíz fueron utilizados para la obtención de hemicelulosa a través de un proceso alcalino utilizando NaOH 9% p/v, por 118 minutos a 116 °C, con una carga de sólido-líquido de 3,33%. Los resultados se muestran en la Tabla Tabla 6.

Tabla 6. Porcentaje de hemicelulosa cruda recuperada en el proceso alcalino. Nota: autoría propia.

Biomasa inicial (g)	Hemicelulosa cruda recuperada		
	Peso (g)	Rendimiento hemicelulosa cruda (%)	Cenizas (%)
9,89 ± 0,02	7,69 ± 1,14	77,79	37,40 ± 2,52

Los precipitados del filtrado tras la adición de etanol se recogieron con un rendimiento aproximado de hemicelulosa cruda del 78% (Tabla 6). La separación de componentes a través del uso de solventes alcalinos combinados con precipitación ácida y extracción con etanol tiene su fundamento basado en que el sedimento después de la adición del disolvente alcalino es celulosa, el sólido remanente de la precipitación ácida del licor es lignina y el precipitado de la extracción con etanol del licor es hemicelulosa ⁶⁵. Como ejemplo tenemos lo realizado por Sobri et al. ⁶⁶ donde utilizaron NaOH para la extracción de hemicelulosa, a partir de hoja de palma aceitera, alcanzando un 84% de rendimiento de hemicelulosa cruda en condiciones

optimizadas (NaOH 6% p/v, 100°C y 60 min), también tenemos lo realizado por Mattos et al.⁶⁷ quienes utilizaron NaOH para la extracción de arabinoxilanos, polisacáridos que forman parte de la hemicelulosa, a partir de fibra de maíz (pericarpio del maíz), alcanzando un 22% de rendimiento de arabinoxilanos bajo condiciones de NaOH 6% p/v, a temperatura ambiente en agitación por 5 horas. Ciertamente no es posible establecer una comparación directa entre los hallazgos de Sobri et al. y Mattos et al. y los resultados obtenidos en este estudio, debido a las notables diferencias en las propiedades de los materiales utilizados. No obstante, es evidente que diversos factores ejercen una influencia significativa en el rendimiento y la pureza del producto. En la Tabla 6, también es evidente que los polvos obtenidos mediante el proceso alcalino muestran un contenido significativo de cenizas o material inorgánico, esto se atribuye en gran medida, como ya se ha mencionado, a las sales que se forman durante la neutralización con ácido acético, al NaOH empleado y a la presencia de materiales inorgánicos en la sustancia original.

Los sólidos recuperados (hemicelulosa cruda) los mismos que se muestran en la Figura 22, fueron analizados por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) a fin de verificar la presencia de hemicelulosa en el polvo, los mismos que se muestran en la Figura 24.



Figura 22. Sólidos recuperados de hemicelulosa cruda luego de su aislamiento a partir de pancas de maíz. Nota: autoría propia.

El espectro FTIR fue comparado con lo reportado en la literatura científica. Por ejemplo, Tian et al. (2017)⁶⁸ reporta la Figura 23 correspondiente a hemicelulosa nativa, donde se observan las absorbancias a 3241, 2923, 1424, 1044 y 897 cm^{-1} . La banda ancha a 3241 cm^{-1} estaría

asignada al grupo hidroxilo (O-H), la banda alrededor de 2930 cm^{-1} se debería al estiramiento C-H de los grupos metilo, la banda alrededor de 1431 cm^{-1} representaría la flexión C-H, OH⁶⁹, la señal a 1044 cm^{-1} se originaría en la vibración de estiramiento asimétrico C-O-C de la hemicelulosa¹⁰ y una banda aguda a 897 cm^{-1} se asignaría a los enlaces β -glicosídicos entre las unidades de xilosa en las hemicelulosas⁶⁹. Además, las absorciones en la región de $1200\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ pueden dar información sobre los tipos de polisacáridos presentes⁶⁹. Las bandas de absorción de la hemicelulosa nativa presentan semejanza a las obtenidas en la muestra de hemicelulosa cruda obtenida, sin embargo, las diferencias en las intensidades de las bandas pueden deberse a la pureza del tipo de material del cual fue obtenido la hemicelulosa nativa. Como se ha observado, los polvos denominados hemicelulosa cruda contienen hemicelulosa en su composición. No obstante, es necesario realizar una etapa posterior de purificación para mejorar los procesos de hidrólisis destinados a la producción de XOS. Dado el porcentaje de hemicelulosa presente en el material, en este caso, las pancas de maíz, esta ruta podría resultar conveniente. Sin embargo, se llevó a cabo una evaluación de la vía hidrotérmica para convertir directamente la hemicelulosa del material en XOS. Debido a la falta de disponibilidad de la enzima (xilanasas) se procedió con la opción térmica.

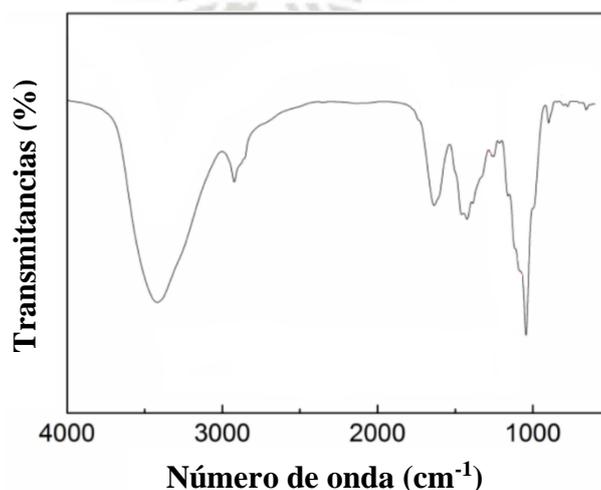


Figura 23. Espectro FTIR de hemicelulosa nativa. Adaptado de Tian et al.⁶⁸.

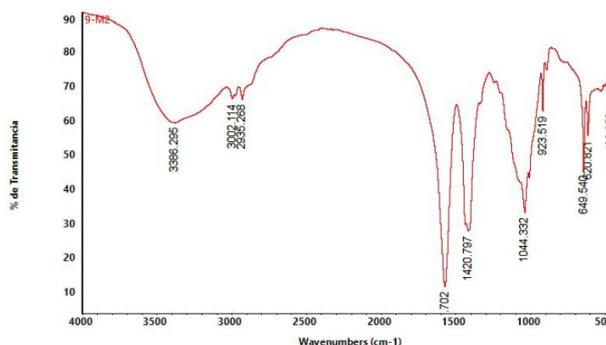


Figura 24. Espectro de Infrarrojo correspondiente al sólido recuperado sometido a tratamiento alcalino con NaOH al 9% p/v. Nota: autoría propia.

4.2.2. Tratamiento hidrotérmico de pancas de maíz para producción de XOS

Hidrólisis en reactores Parr no agitados

Las pancas de maíz fueron sometidos a un proceso hidrotérmico a 180 °C a fin de producir xilosa y XOS en reactores no agitados. Los experimentos fueron realizados por 50, 65, 70, 75, 80, 85 y 90 min, los resultados de estas pruebas se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Resultados de las pruebas realizadas a los hidrolizados obtenidos en diferentes tiempos. Nota: autoría propia.

Tiempo de reacción (min)	Compuestos fenólicos totales (g EAG/L)	Xilosa (g/L)	XOS (X ₂ -X ₄) (g/L)
50	4,02 ± 0,12	18,53 ± 0,37	0,55
65	4,02 ± 0,16	20,75 ± 0,96	6,83
70	3,34 ± 0,65	20,55 ± 1,40	6,42
75	3,76 ± 0,17	20,39 ± 2,56	10,28
80	3,85 ± 0,11	20,83 ± 0,76	7,53
85	4,17 ± 0,22	20,15 ± 1,10	8,09
90	3,33 ± 0,03	11,46 ± 0,15	0,15

Como se observa en la Tabla 7, el mejor tiempo de reacción a una temperatura constante de 180 °C fue el de 75 min, debido a que en este tiempo de reacción se observó la mayor cantidad de XOS (10,28 g/L), además se obtuvo 3,76 g/L de compuestos fenólicos totales. Además, el

extracto obtenido bajo estas condiciones presentó una concentración de 8,17 g/L de glucosa, 10,80 g/L de xilosa y 1,11 g/L de arabinosa.

Por otro lado, tomando el mejor tiempo de reacción determinado previamente (75 minutos) se evaluaron diferentes temperaturas de trabajo (160, 175 y 180) °C, los resultados se muestran en la Tabla 8 y en la Figura 25. Como se observa, la mejor temperatura de reacción a un tiempo constante de 75 min fue 180 °C, debido a que en esta temperatura de reacción se observó la mayor cantidad de XOS (10,28 g/L), de los cuales el 78% correspondía a X₂, 17% correspondía a X₃ y 5% correspondía a X₄, además se obtuvo 3,76 g/L de compuestos fenólicos totales. Bajo estas condiciones (75 min a 180°C) se logró obtener 6,2 g de XOS por 100 g de material (pancas de maíz).

Tabla 8. Resultados obtenidos de las pruebas realizadas a los hidrolizados obtenidos a diferentes temperaturas. Nota: autoría propia.

Temperatura de reacción (°C)	Compuestos fenólicos totales (g EAG/L)	Xilosa (g/L)	XOS (X ₂ -X ₄) (g/L)
160	3,10 ± 0,60	26,09 ± 4,98	0,91
175	4,36 ± 0,07	22,33 ± 2,05	7,63
180	3,76 ± 0,17	20,39 ± 2,56	10,28

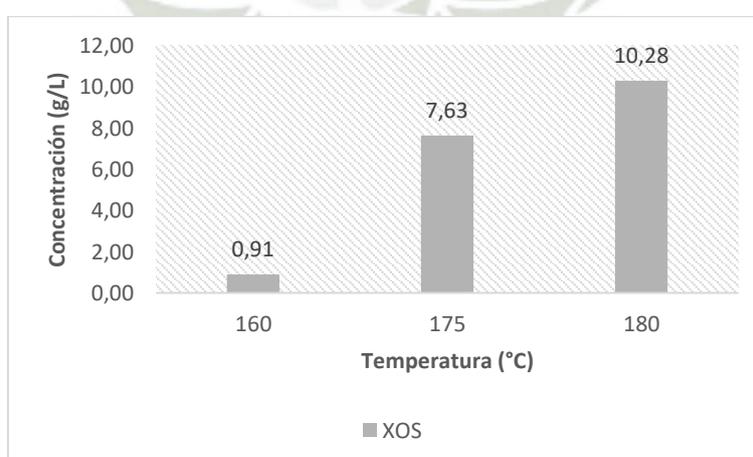


Figura 25. Concentración de XOS obtenida bajo diferentes temperaturas de reacción en un tiempo constante de 75 min. Nota: autoría propia.

Replicación del tratamiento hidrotérmico bajo las mejores condiciones

Posterior a la determinación de la temperatura y tiempo que permitió obtener mayores concentraciones de XOS (X₂-X₄), en reactores sin agitación, se procedió a realizar un tratamiento hidrotérmico bajo las mejores condiciones (180°C por 75 min) a fin de obtener un extracto rico en XOS (Figura 26), los resultados de los análisis realizados se muestran en la Tabla 9. Como se observa, se obtuvo un extracto que contenía 8,09 g/L de XOS (X₂-X₄), de los cuales el 70% correspondía a X₂, 23% correspondía a X₃ y 7% correspondía a X₄. Obteniéndose así 4,8 g de XOS por 100 g de material (pancas de maíz).



Figura 26. Extracto obtenido (a), alícuotas del extracto en viales para su análisis por HPLC (b). Nota: autoría propia.

Tabla 9. Resultados de las pruebas realizadas al hidrolizado obtenido en las mejores condiciones. Nota: autoría propia.

Mejores condiciones en reactores no agitados	Compuestos fenólicos totales (g EAG/L)	Xilosa (g/L)	XOS (X ₂ -X ₄) (g/L)
180°C por 75 min	3,53 ± 0,10	20,63 ± 0,71	8,09

Hidrólisis en reactor Parr agitado

La reacción de hidrólisis de la hemicelulosa presente en los pancas de maíz también se llevó a cabo en un reactor de mayor tamaño (2 L) con agitación, donde se buscó determinar el mejor tiempo de reacción, trabajando en 15, 30 y 45 min, a una temperatura constante de 180°C (Figura 27), los resultados de estas pruebas se muestran en la Tabla 10 y Figura 28.

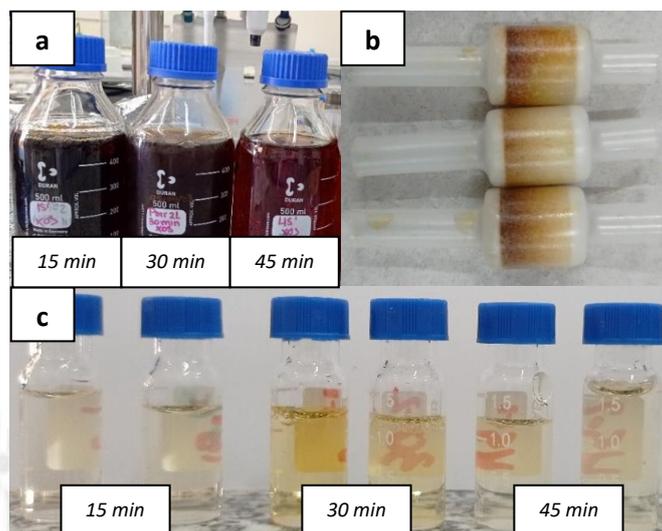


Figura 27. Extractos obtenidos en diferentes tiempos de reacción (a), filtros de jeringa de cartuchos de tratamiento C18 (b) y viales de los extractos obtenidos en diferentes tiempos (c). Nota: autoría propia.

Tabla 10. Contenido de xilosa y XOS en los hidrolizados obtenidos en diferentes tiempos. Nota: autoría propia

Tiempo de reacción (min)	Xilosa (g/L)	XOS (X ₂ -X ₄) (g/L)
15	6,32 ± 0,70	1,78
30	6,60 ± 0,06	2,56
45	6,49 ± 0,58	1,03

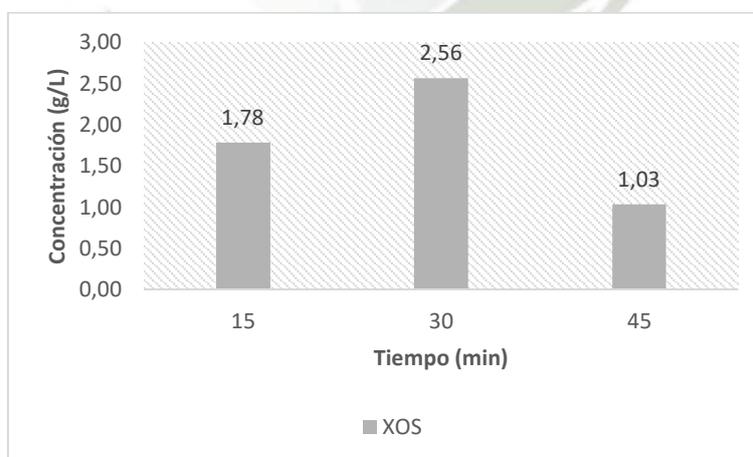


Figura 28. Concentración de XOS obtenida bajo diferentes tiempos de reacción a una temperatura constante de 180°C. Nota: autoría propia.

Como se observa en la Tabla 10, el mejor tiempo de reacción en el reactor Parr agitado de 2 L a una temperatura constante de 180 °C fue el de 30 min, debido a que en este tiempo de reacción se observó la mayor cantidad de XOS (2,56 g/L), de los cuales el 56% correspondía a X₂, 22% correspondía a X₃ y 22% correspondía a X₄. Obteniéndose así 3,1 g de XOS por 100 g de material (pancas de maíz).

La diferencia entre las concentraciones de XOS (X₂-X₄) obtenidas tanto en los reactores de 25 ml (no agitados) y el reactor Parr de 2 L (agitado), 8,09 y 2,56 g/L, respectivamente, se debe principalmente a la relación sólido líquido utilizada, trabajándose en el reactor no agitado con una carga de sólidos de 16% y en el reactor Parr agitado con 8%. Sin embargo, considerando los g de XOS por 100 g de biomasa, se observa que el reactor Parr agitado permitió obtener 3,1 g de XOS y el reactor Parr no agitado 4,8 g de XOS. Esta ligera diferencia podría deberse al diferente modo de llegar a 180°C en cada equipo. El incremento de temperatura en los reactores no agitados, la cual fue asistida con una estufa de calentamiento, parece ser menos severa que la asistida por el controlador del equipo Parr agitado, sin embargo, también puede deberse a los diferentes mejores tiempos de reacción establecidos para cada equipo, considerando que los tiempos establecido en el Parr no agitado no eran exactos, ya que apenas fueron calculados en base a las especificaciones del equipo (velocidad de calentamiento y enfriamiento: $\geq 5^{\circ}\text{C} / \text{min}$) y la temperatura externa pudo influenciar en esa variabilidad.

Para la producción de XOS a partir de los diferentes residuos agrícolas considerados en este trabajo se consideró una estrategia que involucraba un solo paso. Esta estrategia implica una autohidrólisis basada en un tratamiento termal con agua caliente a altas temperaturas. Existe otra estrategia que combina el primer paso mencionado, que puede consistir en un tratamiento hidrotérmico o químico, con una hidrólisis enzimática usando una endo-1,4- β - xilanasas, esta catalizaría la hidrólisis de los enlaces 1,4- β -xilosa en el xilano, lo que resultaría en la liberación de moléculas más pequeñas como X₃, X₂ y xilosa ¹⁴. El tratamiento hidrotermal es considerado

un proceso de refinación de biomasa ecoamigable debido a que no requiere más químicos que el agua, no causa problemas significativos de corrosión y permite la solubilización de hidrolizados de hemicelulosa sin que se produzca una hidrólisis completa ¹². Sin embargo, durante este tratamiento también se producen varios compuestos no deseados, incluyendo monosacáridos, ácido acético, derivados de lignina soluble, compuestos solubles inorgánicos y furfural ⁷⁰⁻⁷². La presencia de ácido acético, furfural y compuestos fenólicos disueltos derivados de lignina afecta negativamente las propiedades prebióticas de los XOS, por lo que la producción de XOS de alta pureza se considera importante ¹⁴. En el procesamiento hidrotermal el agua penetra en la biomasa, hidrata la celulosa y elimina la mayor parte de las hemicelulosas y una pequeña parte de la lignina. La solubilización de las hemicelulosas está catalizada por iones de hidronio resultantes de la autoionización del agua. El control del pH en torno a valores neutros minimiza la formación de inhibidores de la fermentación ¹².

El tratamiento hidrotermal mediante *Liquid Hot Water* (LHW), como otros procesos de hidrólisis, tiene un impacto sobre la composición de las materias primas, lo cual son el objetivo principal de estos procesos de conversión de material lignocelulósico. Se espera que este tipo de tratamiento remueva una gran fracción de hemicelulosa de las materias primas, disolviéndola y/o degradándola en los hidrolizados. Es posible también encontrar una pequeña fracción de glucosa en los hidrolizados resultantes de los tratamientos hidrotérmicos, ya que esta puede derivarse de la misma hemicelulosa o de una pequeña parte de celulosa que haya sido despolimerizada. Otra característica del proceso de tratamiento por LHW, aparte del fraccionamiento selectivo de la materia prima, es la liberación de oligosacáridos en los hidrolizados. La liberación de más monosacáridos, en este caso xilosa, que oligosacáridos puede estar relacionada con el pH de la muestra ⁶¹. Los tratamientos a valores de pH bajos hidrolizan la mayor parte de hemicelulosa en monómeros, mientras que tratamientos llevados a cabo a un pH neutro produce una mayor cantidad de oligosacáridos con algunos monómeros

⁷³. Carvalheiro et al. (2004) reportó que para la materia prima de grano usado en cervecería tratado por LHW a 190°C durante 20 min, obtuvo en el hidrolizado 6,75 g/L de XOS y 5,17 g/L de xilosa, aparte de una alta concentración de productos de degradación, tales como furfural e hidroximetilfurfural (HMF) ⁷⁴.

En el trabajo realizado por Kim et al. (2022) ¹⁴, se sometió a tratamiento hidrotermal los residuos agrícolas de palma de aceite, específicamente del racimo de fruto vacío. El pretratamiento hidrotermal fue desarrollado utilizando un reactor Parr agitado de 2 L a escala de laboratorio. La relación sólido:líquido en el reactor fue de 1:11,5 (p/v). El tratamiento hidrotermal fue realizado bajo una agitación de 150 rpm y 190°C por 10 minutos. Al finalizar el tratamiento hidrotermal se determinó el rendimiento del xilano extraído, siendo este 51,2%. Kim et al. (2022) ¹⁴ menciona que una alternativa para mejorar la extracción de xilano es aumentar la temperatura de reacción, sin embargo, los contenidos de xilosa e impurezas como compuestos fenólicos, ácido acético y productos de descomposición de azúcar aumentarían también ⁷⁵. Kim et al. (2022) utilizó el tratamiento hidrotermal a modo de pretratamiento ya que luego de la extracción de xilano éste se sometió a una hidrólisis enzimática para producir XOS de bajo peso molecular, compuestos principalmente por xilobiosa (X₂) y xilotriosa (X₃), los cuales son recursos altamente efectivos para el crecimiento de probióticos como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus brevis spp.* Cabe resaltar que cuando el xilano no fue sometido a hidrólisis enzimática, el contenido total de X₂ y X₃ fue de 21,3%, mientras que al utilizar una xilanasa se logró obtener un 79,5% de contenido total de xilobiosa (X₂) y xilotriosa (X₃) ¹⁴.

Concentración de XOS mediante filtración por membranas

Concentración de extracto obtenido de reactores no agitados

Filtración de extractos a diferentes pH

El hidrolizado obtenido luego de 75 min de procesamiento hidrotermal en reactores no agitados de 25 ml fue sometido a un proceso de UF (10 kDa) a pH 4, 5,5 y 7, para evaluar el

comportamiento de las membranas en función a la concentración de xilosa y XOS y la cantidad de XOS en g presente en los extractos de entrada, permeado y retentado, resultados que se muestran en la Figura 29. A pH 4 se recuperó en el permeado 500 mg de XOS (X_2 - X_4), de los cuales el 83% corresponde a X_2 , 11% corresponde a X_3 y 6% corresponde a X_4 ; en el caso del retentado, se recuperó 700 mg de XOS (X_2 - X_4) de los cuales el 71% corresponde a X_2 , 17% a X_3 y 12% a X_4 . Por otro lado, a pH 5,5 se recuperó en el permeado 500 mg de XOS (X_2 - X_4), de los cuales el 81% corresponde a X_2 , 10% corresponde a X_3 y 8% corresponde a X_4 ; en el caso del retentado, se recuperó también 500 mg de XOS (X_2 - X_4) de los cuales el 65% corresponde a X_2 , 24% corresponde a X_3 y 12% corresponde a X_4 . Por último, a pH 7 se recuperó en el permeado 500 mg de XOS de los cuales el 77% corresponde a X_2 , 12% corresponde a X_3 y 11% corresponde a X_4 ; en el caso del retentado, se recuperó 400 mg de XOS (X_2 - X_4) de los cuales el 63% corresponde a X_2 , 26% corresponde a X_3 y 11% corresponde a X_4 . Respecto a los porcentajes de recuperación de XOS (X_2 - X_4), estos fueron calculados en base a los pesos iniciales y finales obtenidos en g, para cada caso. A pH 4 se recuperó aproximadamente en el permeado 46% del total de XOS y en el retentado 54%; por otro lado, a pH 5,5 se recuperó aproximadamente en el permeado 47% y en el retentado 53%; finalmente, a pH 7 se recuperó aproximadamente en el permeado 57% y en el retentado 43%.

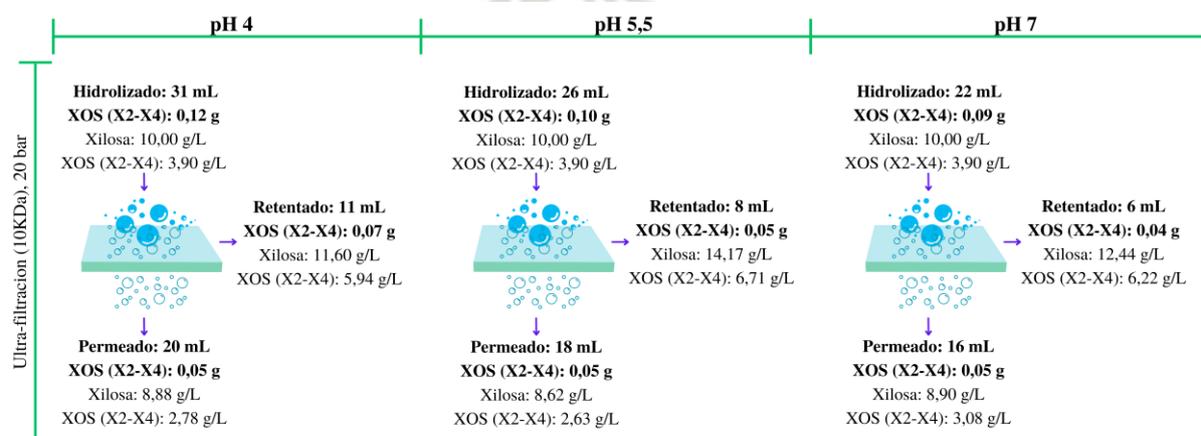


Figura 29. Filtración con diferentes pH para la concentración del extracto obtenido. Nota: autoría propia.

La comparación del volumen y flujo obtenido respecto al tiempo de filtración para cada valor de pH se observa en la Figura 30. Respecto a los flujos de trabajo promedio, a pH 4, 5,5 y 7 se obtuvo un flujo de 1,20, 0,80 y 1,46 ml/min, en 29, 23 y 15 minutos, respectivamente.

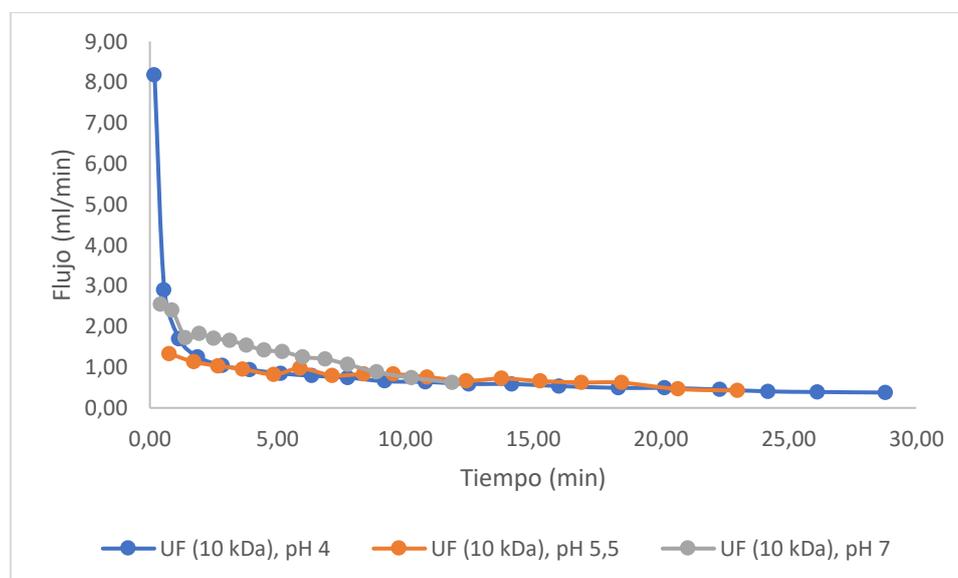


Figura 30. Flujo respecto al tiempo para los diferentes valores de pH evaluados. Nota: autoría propia.

Es importante recordar, para este y los posteriores ensayos de filtración por membranas, que los XOS tienen un peso molecular relativo de 200-300 kDa⁷⁶, donde la xilobiosa (X₂) pesa 282,24 Da, la xilotriosa (X₃) 414,36 Da y la xilotetraosa (X₄) 546,47 Da. Rosas et al. (2023)⁷⁷ obtuvo una mayor concentración de X₂, X₃ y X₄ en los permeados a valores de pH altos (6,6 - 7,6) empleando una membrana de UF de 10 kDa, comportamiento similar observado en este estudio a pH 7, en comparación con los otros dos valores de pH trabajados. El flujo de operación también se vio influenciado por el pH, obteniendo un flujo mayor (1,46 ml/min) a pH 7 y menores flujos de permeado a pH 4 y 5,5, con valores de 1,20 y 0,80 ml/min, respectivamente, comportamiento análogo obtenido por Rosas et al. (2023)⁷⁷, quienes obtuvieron en los primeros 10 minutos, valores de 2,1, 1,9 y 1,8 ml/min a pH 6,6, 7,6 y 5,6, respectivamente y menores flujos de permeado a pH 3,6 y 4,6, siendo en promedio 0,9 y 1,3 ml/min, respectivamente. Esto se debería a que a valores altos de pH las membranas

poliméricas se vuelven más hidrofílicas y con más carga negativa, lo que permite un alto flujo de permeado y un fuerte rendimiento antiincrustante, disminuyendo la retención de moléculas sin carga, como la xilosa y XOS ⁷⁷. Además, estos valores de pH altos modifican la matriz de la membrana hacia un estado más expandido, lo que se atribuye a una mayor repulsión electrostática intramembrana ⁷⁸. Por otro lado, se espera que a bajos niveles de pH exista una mayor retención de azúcares y XOS ⁷⁷, tal y como se observó en los resultados a pH 4 y 5,5 en este trabajo.

Filtración por membranas

El hidrolizado obtenido luego de 75 min de procesamiento hidrotérmal fue sometido a un proceso de filtración por membranas de 3 etapas, y la Figura 31 muestra los resultados correspondientes a cada etapa de ultrafiltración (UF) y nanofiltración (NF). Como se observa, 40% del total de contenido de XOS (X₂-X₄) se encontró en el permeado luego del proceso de UF (10 kDa) a pH 7. Dos procesos de diafiltración fueron realizadas para recuperar los XOS contenidos en el retentado, resultando en una recuperación global de aproximadamente 80% del total de XOS en el permeado durante el proceso de UF, por otro lado, considerando solo la primera DF, se obtuvo una recuperación global del 67%. El resultado obtenido en la primera UF es 25% inferior que el obtenido en la recuperación de XOS en el permeado del proceso de UF (10 kDa) del extracto de cáscara de arroz tratado hidrotérmicamente ⁷⁹ y 4% inferior que el obtenido en el permeado del proceso de UF (10 kDa) del extracto de tallo de quinua tratado de la misma manera ⁷⁷. Esta diferencia puede atribuirse a la composición de extractivos y compuestos fenólicos presente en cada uno de los materiales, lo que podría afectar el proceso de filtrado; debido a ello la diafiltración resulta ser una buena estrategia en estos casos. Otras técnicas que buscan eliminar los compuestos fenólicos presentes en el extracto, con el propósito de mejorar el proceso de filtración, son la aplicación de carbón activado o la polimerización enzimática ¹⁴. En esta etapa se utilizó una membrana de 10 kDa para UF que, considerando el

peso molecular de los XOS, como X_2 , X_3 y X_4 , resulta amplia; el cambio a pH 7 mejora el flujo a través de la membrana, reteniendo mayormente compuestos fenólicos y pigmentos, favoreciendo el paso de moléculas sin carga como los azúcares ^{77,78,80}. Cabe resaltar que el retentado presentaba un color más oscuro en comparación con el permeado.

El permeado obtenido del proceso de UF, incluyendo solo la primera DF realizada (recuperación del 67% del total de XOS en el permeado), fue ajustado a pH 4 y sometido a un proceso de NF. En el proceso de NF (500 Da), aproximadamente el 87% del total de XOS fue retenido en el retentado, mientras que solo el 13% del total de XOS pasó a través de la membrana. A pH 4, la repulsión electrostática entre la membrana y compuestos como los pigmentos se habrían debilitado, dando lugar a una elevada adsorción hidrófoba de pigmentos en la membrana, afectando el flujo y el paso de moléculas no cargadas ⁸⁰.

El retentado obtenido del proceso de NF (500 Da) a pH 4, fue sometido a otro proceso de NF (150-300 Da) bajo el mismo pH 4 y también ajustado a pH 7. A pH 4, aproximadamente el 89% del total de XOS fue retenido en el retentado, mientras que solo el 11% del total de XOS pasó a través de la membrana. A pH 7, aproximadamente el 67% del total de XOS fue retenido en el retentado, mientras que solo el 33% del total de XOS pasó a través de la membrana.

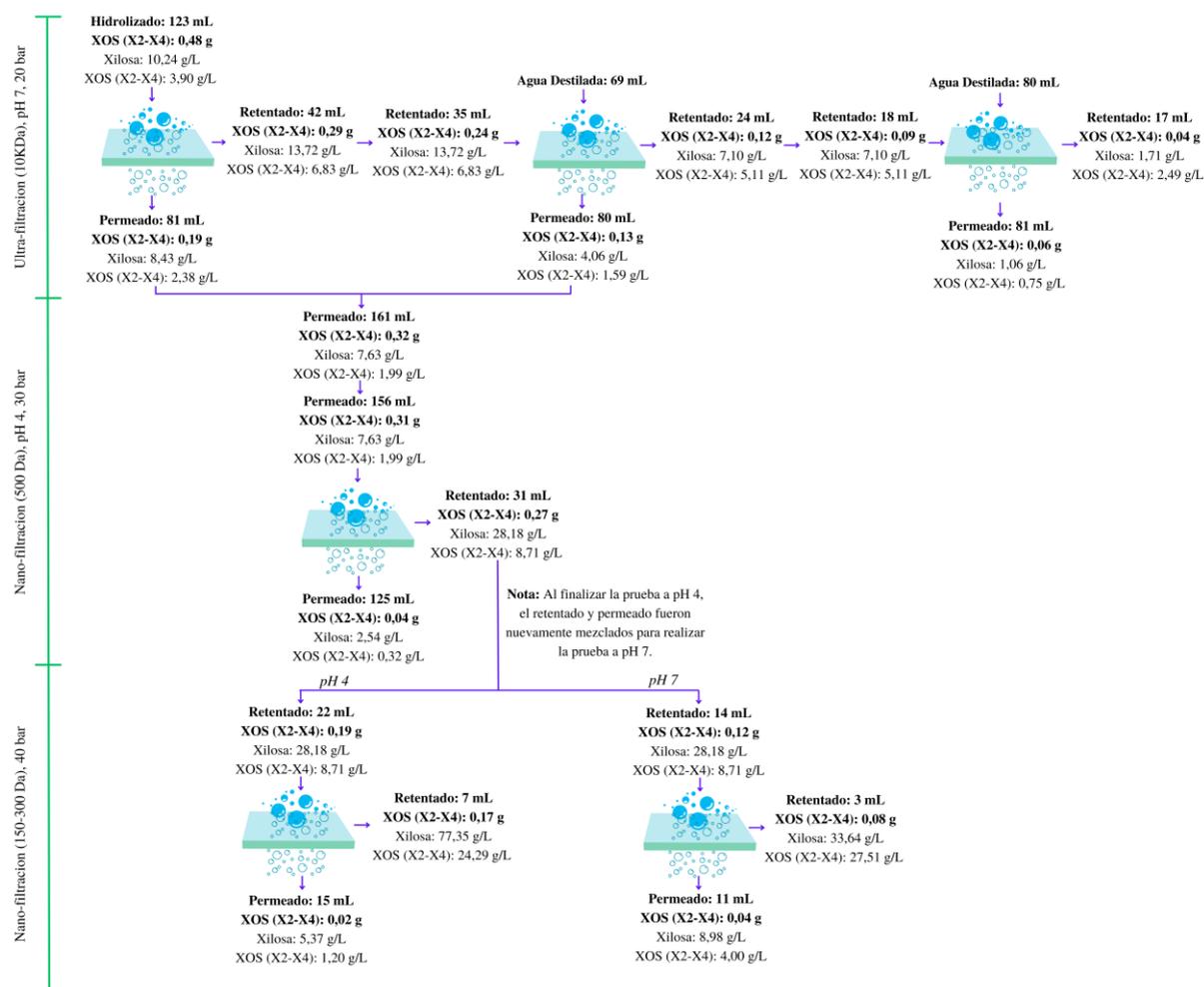


Figura 31. Concentración del extracto obtenido en reactores Parr no agitados. Nota: *autoría propia.*

Para cada etapa de filtración por membranas, los flujos de volumen se muestran en la Figura 32. En la primera etapa, los flujos de trabajo promedio en el proceso de UF (10 kDa) a pH 7, junto con los dos procesos de DF fueron de 0,90, 1,63 y 2,07 ml/min, obtenidos en 100, 56 y 44 minutos, respectivamente. En la segunda etapa, el flujo de trabajo promedio en el proceso de NF (500 Da) a pH 4 fue de 0,42 ml/min, obtenido en 318 minutos. En la tercera y última etapa, los flujos de trabajo promedio en el proceso de NF (150-300 Da) a pH 4 y pH 7 fueron de 0,12 y 0,39 ml/min, obtenidos en 215 y 45 minutos, respectivamente.

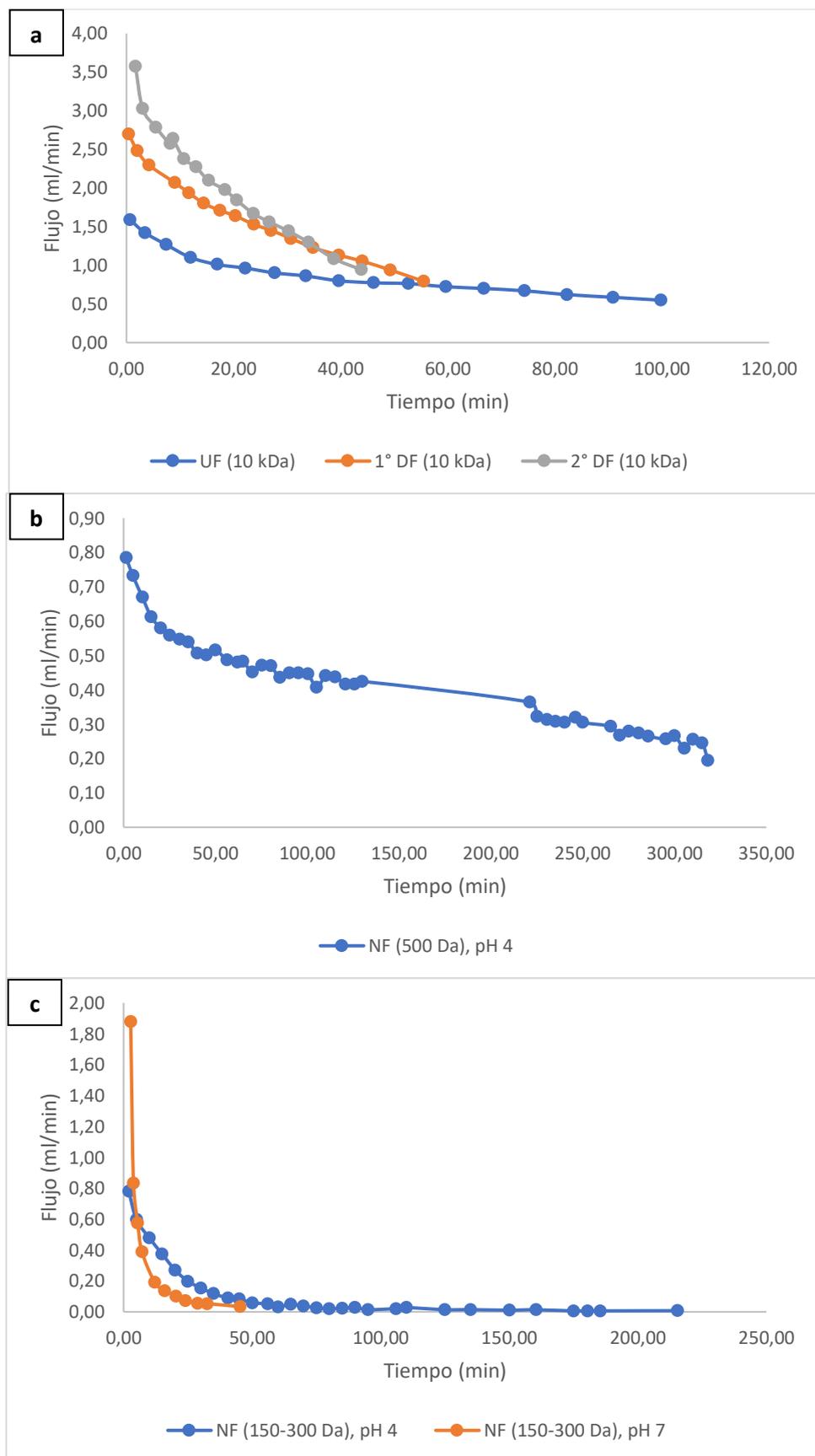


Figura 32. Flujo de volumen de la primera (a), segunda (b) y tercera (c) etapa de filtración por membranas poliméricas. Nota: autoría propia.

Concentración de extracto obtenido de reactor Parr agitado

Retención de compuestos fenólicos

El hidrolizado obtenido luego de 30 min de procesamiento hidrotermal en el reactor Parr agitado, que contenía 2,72 g/L de compuestos fenólicos totales y 2,56 g/L de XOS (X2-X4), fue distribuido equitativamente en dos partes, donde una se sometió a retención de compuestos fenólicos utilizando cartuchos de columna C18 y la otra se mantuvo sin modificaciones (Figura 33). Como se observa, aproximadamente el 85% del total de compuestos fenólicos totales fueron removidos luego de utilizar los cartuchos de columna C18, sin embargo, también se retuvo aproximadamente el 47% del total de XOS (X₂-X₄).

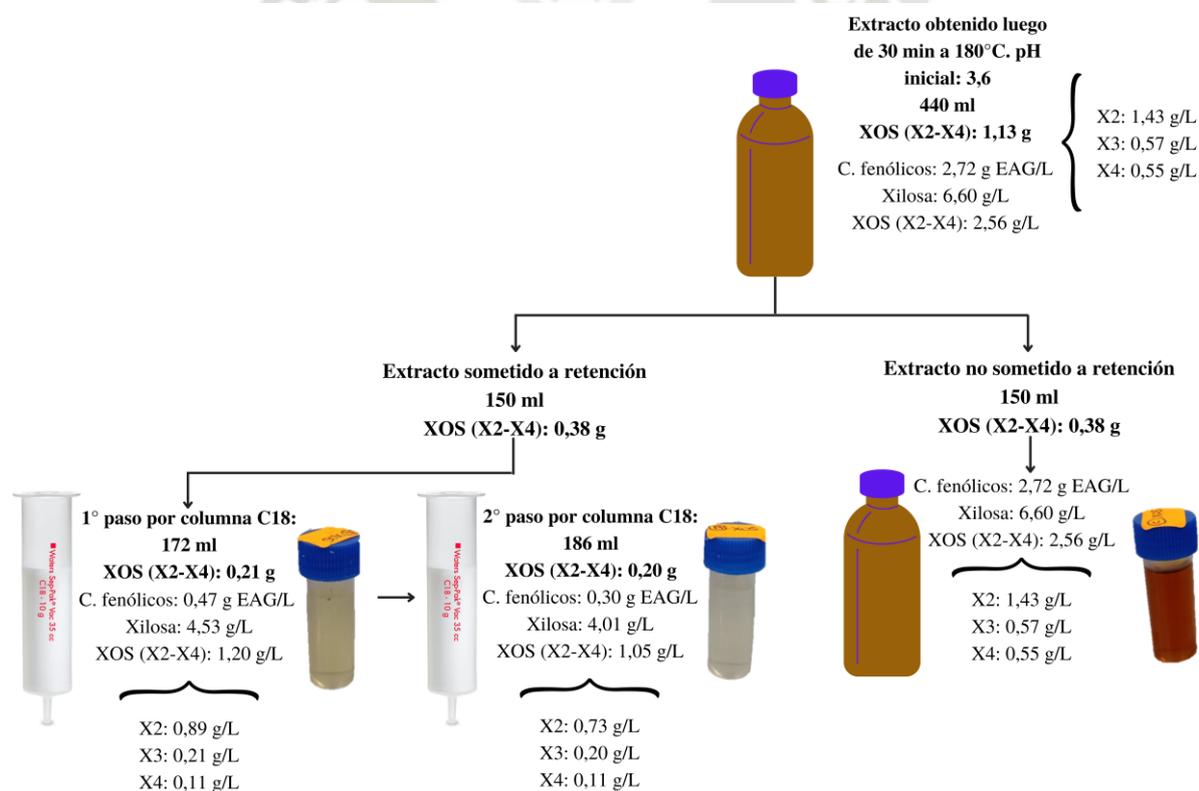


Figura 33. Etapa inicial para la concentración del extracto obtenido del reactor Parr de 2 L.
 Nota: autoría propia.

Filtración por membranas de extracto sometido a retención de compuestos fenólicos

El hidrolizado obtenido luego de 30 min de procesamiento hidrotermal y sometido a retención de compuestos fenólicos con un doble paso a través de columnas C18 fue llevado a un proceso de filtración por membranas de 2 etapas y la Figura 34 muestra los resultados correspondientes a cada etapa de NF. Como se observa, 22% del total de contenido de XOS (X_2 - X_4) se encontró en el permeado luego del proceso de NF (600-800 Da) a pH 7. Un proceso de DF fue realizado para recuperar los XOS contenidos en el retentado, resultando en una recuperación global de aproximadamente 46% del total de XOS en el permeado durante el primer proceso de NF. En esta etapa se utilizó una membrana de 600-800 Da para NF que, considerando el peso molecular de los XOS, como X_2 , X_3 y X_4 , aún resulta grande; sin embargo, el cambio a pH 7 no tuvo el efecto observado con las membranas de UF de 10 kDa, donde se mejoraba el flujo a través de la membrana, que favorecía el paso de moléculas sin carga, como los azúcares, a la fracción de permeado.

El permeado obtenido del proceso de NF, incluyendo la DF realizada, fue ajustado a pH 3,73 y sometido a otro proceso de NF. En el segundo proceso de NF (150 Da), aproximadamente el 94% del total de XOS fue retenido en el retentado, mientras que solo el 6% del total de XOS pasó a través de la membrana de NF (150 Da). El cambio a pH 3,73 tuvo el efecto esperado al observarse una mayor cantidad de azúcares retenidos en el retentado.

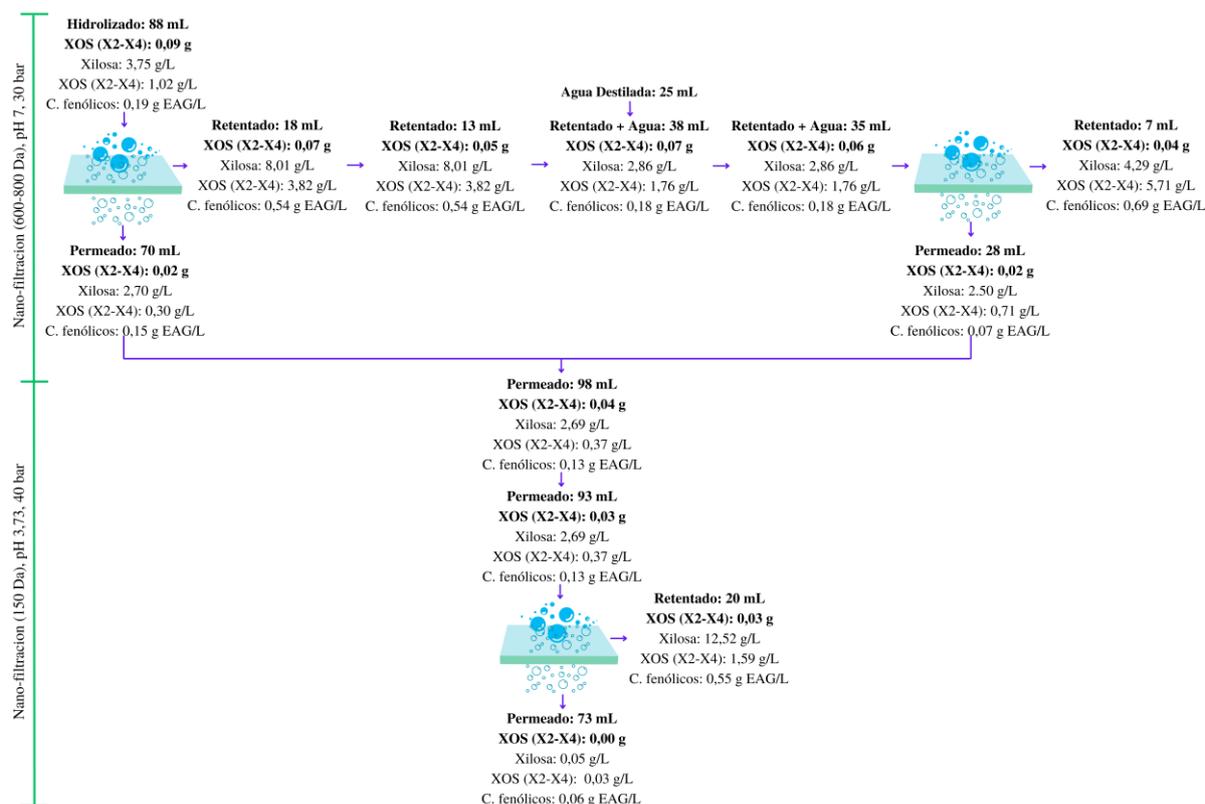


Figura 34. Filtración por membranas del extracto sometido a retención de compuestos fenólicos, por duplicado (a) y (b). Nota: autoría propia.

Para cada etapa de filtración por membranas, los flujos de volumen se muestran en la Figura 35. En la primera etapa, los flujos de trabajo promedio en el proceso de NF (600-800 Da) a pH 7, junto con el proceso de DF fueron de 2,16 y 1,40 ml/min, obtenidos en 37 y 24 minutos, respectivamente. En la segunda etapa y última etapa, el flujo de trabajo promedio en el proceso de NF (150 Da) a pH 3,73 fue de 1,02 ml/min, obtenido en 72 minutos.

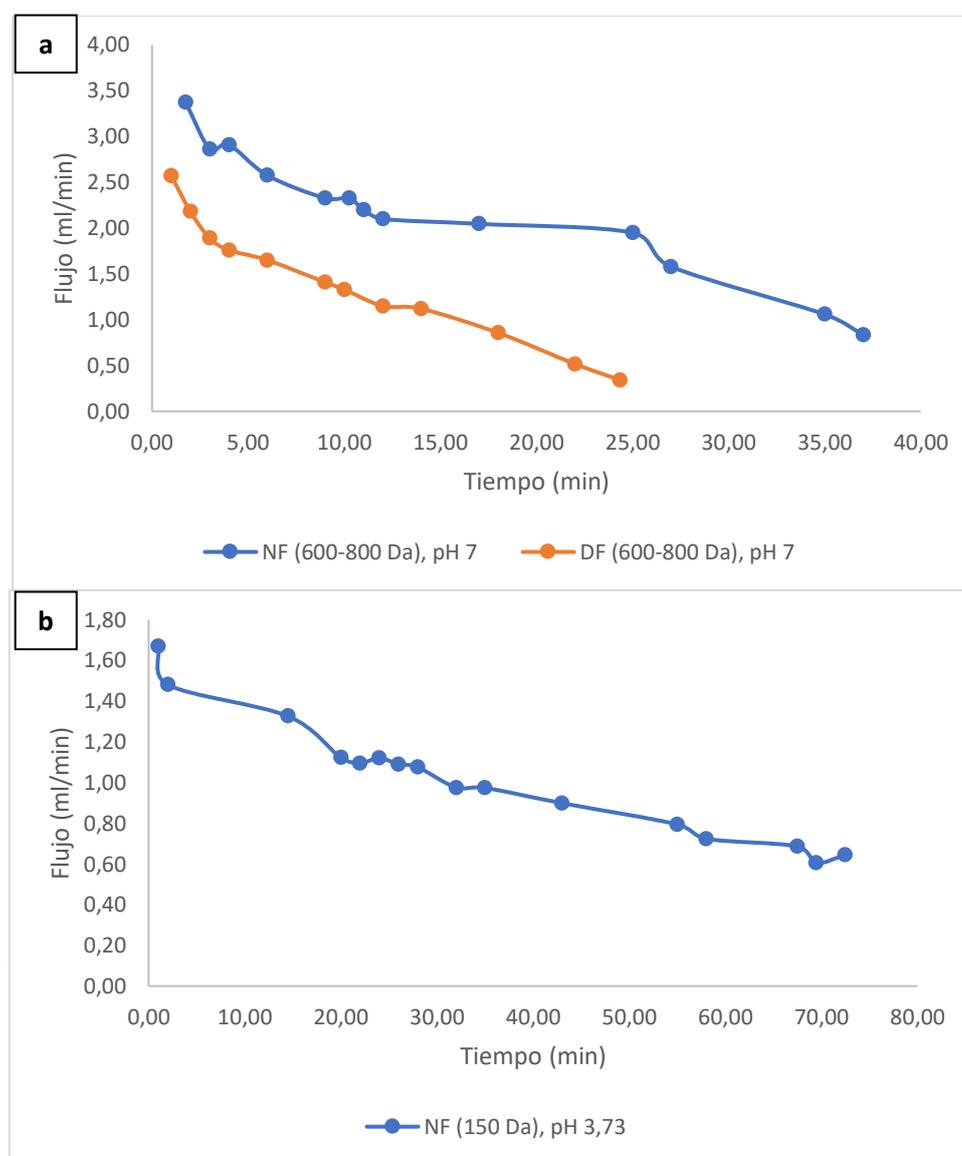


Figura 35. Flujos de volumen de la primera (a) y segunda (b) etapa de filtración por membranas poliméricas. Nota: autoría propia.

Filtración por membranas de extracto no sometido a retención de compuestos fenólicos

El hidrolizado obtenido luego de 30 min de procesamiento hidrotermal, sin someterse a procesos previos de retención de compuestos fenólicos con cartuchos de columna C18, fue llevado a un proceso de NF (600-800 Da) a pH 7, tal y como se trabajó con el extracto sometido a retención de compuestos fenólicos, sin embargo, esta NF resultó siendo demasiado lenta, como puede observarse en la Figura 36, teniendo un flujo de trabajo promedio de 0,15 ml/min, obtenido en 61 min.

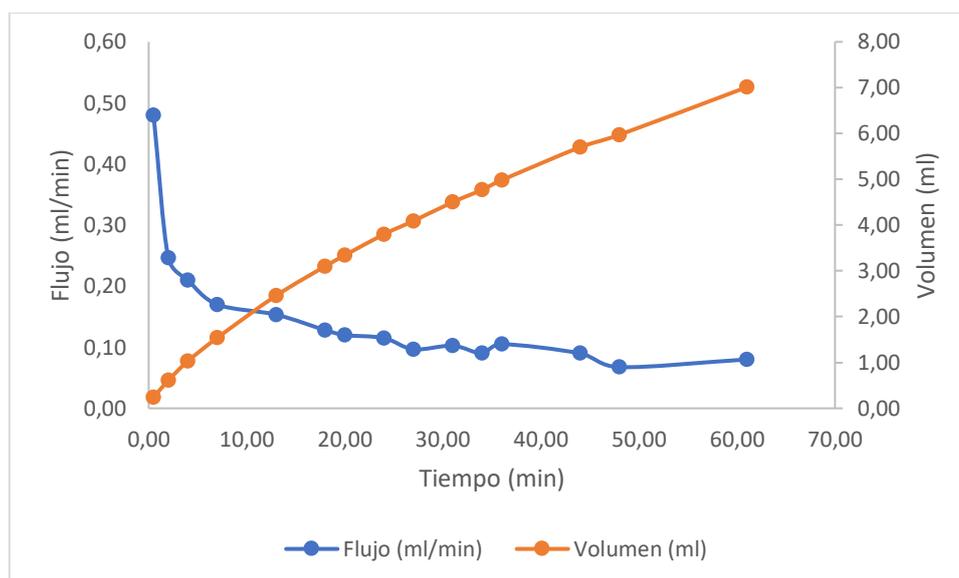


Figura 36. Proceso de NF (600-800 Da) a pH 7 del extracto no sometido a retención de compuestos fenólicos. Nota: autoría propia.

Por la razón previamente mencionada, el hidrolizado obtenido luego de 30 min de procesamiento hidrotérmico fue sometido a un proceso de filtración por membranas de 4 etapas y la Figura 37 muestra los resultados correspondientes a cada etapa de UF y NF. Como se observa, 53% del total de contenido de XOS (X_2 - X_4) se encontró en el permeado luego del proceso de UF (10 kDa) a pH 7. Un proceso de DF fue realizado para recuperar los XOS contenidos en el retentado, resultando en una recuperación global de aproximadamente 69% del total de XOS en el permeado, durante este primer proceso de UF. El resultado se asemeja con la UF (10 kDa) a pH 7 aplicada al hidrolizado obtenido luego de 75 min en reactores de 25 ml sin agitación, donde luego de la primera DF se obtuvo un porcentaje de recuperación global de aproximadamente 67% del total de XOS en el permeado.

El permeado obtenido del primer proceso de UF, incluyendo la DF realizada, fue sometido a otro proceso de UF (1000 Da). Como se observa, aproximadamente el 25% del total de XOS (X_2 - X_4) se encontró en el permeado luego del proceso de UF (1000 Da) a pH 7. Un proceso de DF fue realizado para recuperar los XOS contenidos en el retentado, resultando en una

recuperación global de aproximadamente 38% del total de XOS en el permeado, durante este segundo proceso de UF.

El permeado obtenido del proceso de UF (1000 Da), incluyendo la DF realizada, fue sometido a un primer proceso de NF (600-800 Da). Como se observa, aproximadamente el 34% del total de XOS (X_2 - X_4) se encontró en el permeado luego del proceso de NF (600-800 Da) a pH 7. Un proceso de DF fue realizado para recuperar los XOS contenidos en el retentado, resultando en una recuperación global de aproximadamente 78% del total de XOS en el permeado, durante este primer proceso de NF.

El permeado obtenido del primer proceso de NF, incluyendo la DF realizada, fue ajustado a pH 3,78 y sometido a otro proceso de NF (150 Da). En el segundo proceso de NF (150 Da), aproximadamente el 94% del total de XOS fue retenido en el retentado, mientras que solo el 6% del total de XOS pasó a través de la membrana.

Para cada etapa de filtración por membranas, los flujos de volumen se muestran en la Figura 38. En la primera etapa, los flujos de trabajo promedio en el proceso de UF (10 kDa) a pH 7, junto con el proceso de DF fueron de 1,08 y 0,59 ml/min, obtenidos en 48 y 26 minutos, respectivamente. En la segunda etapa, los flujos de trabajo promedio en el proceso de UF (1000 Da) a pH 7, junto con el proceso de DF fueron de 2,22 y 0,96 ml/min, obtenidos en 22 y 10 minutos, respectivamente. En la tercera etapa, los flujos de trabajo promedio en el proceso de NF (600-800 Da) a pH 7, junto con el proceso de DF fueron de 2,88 y 0,99 ml/min, obtenidos en 14 y 7 minutos, respectivamente. En la cuarta y última etapa, el flujo de trabajo promedio en el proceso de NF (150 Da) a pH 3,78 fue de 0,52 ml/min, obtenido en 66 minutos.

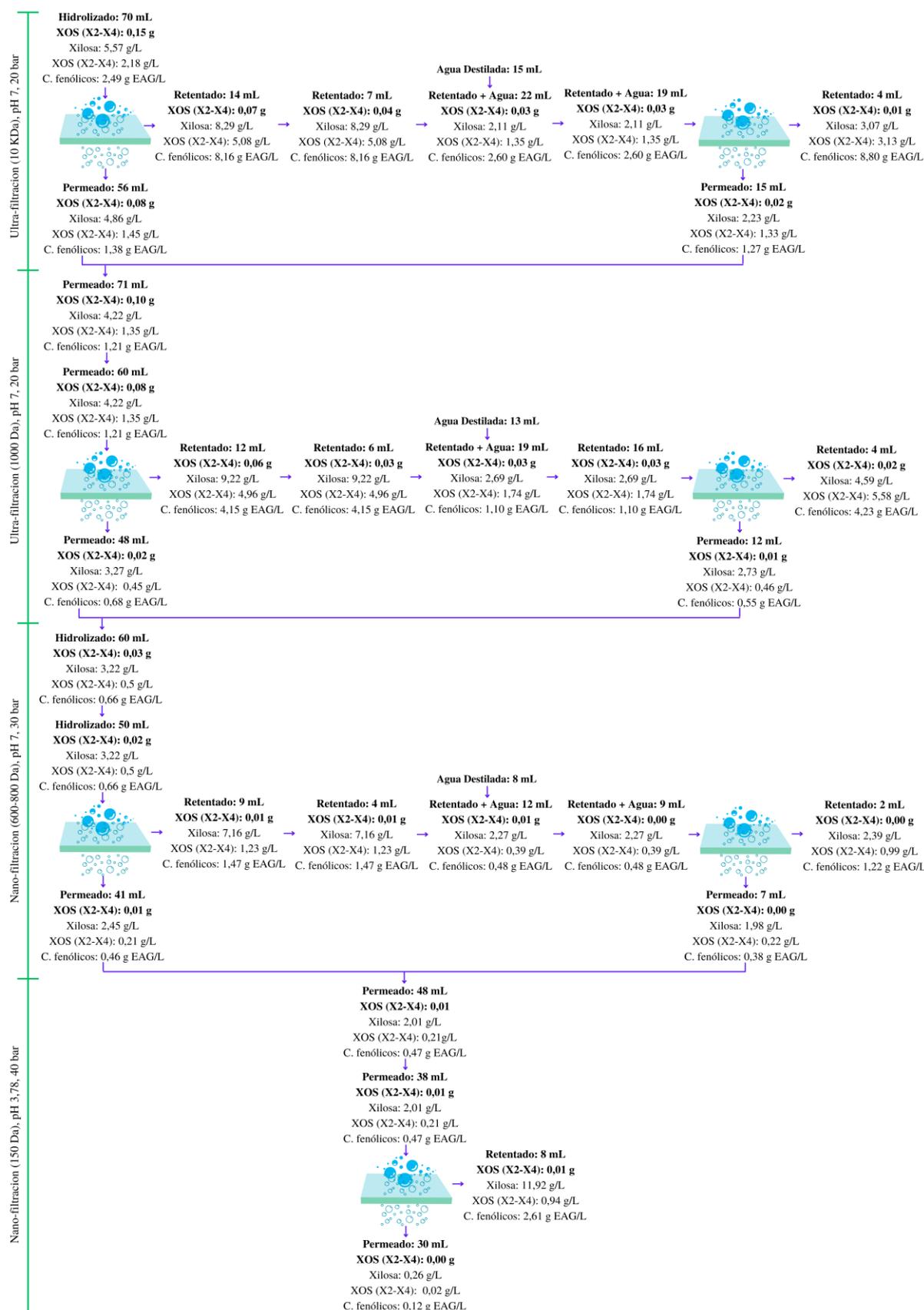


Figura 37. Primera filtración por membranas del extracto no sometido a retención de compuestos fenólicos. Nota: autoría propia.

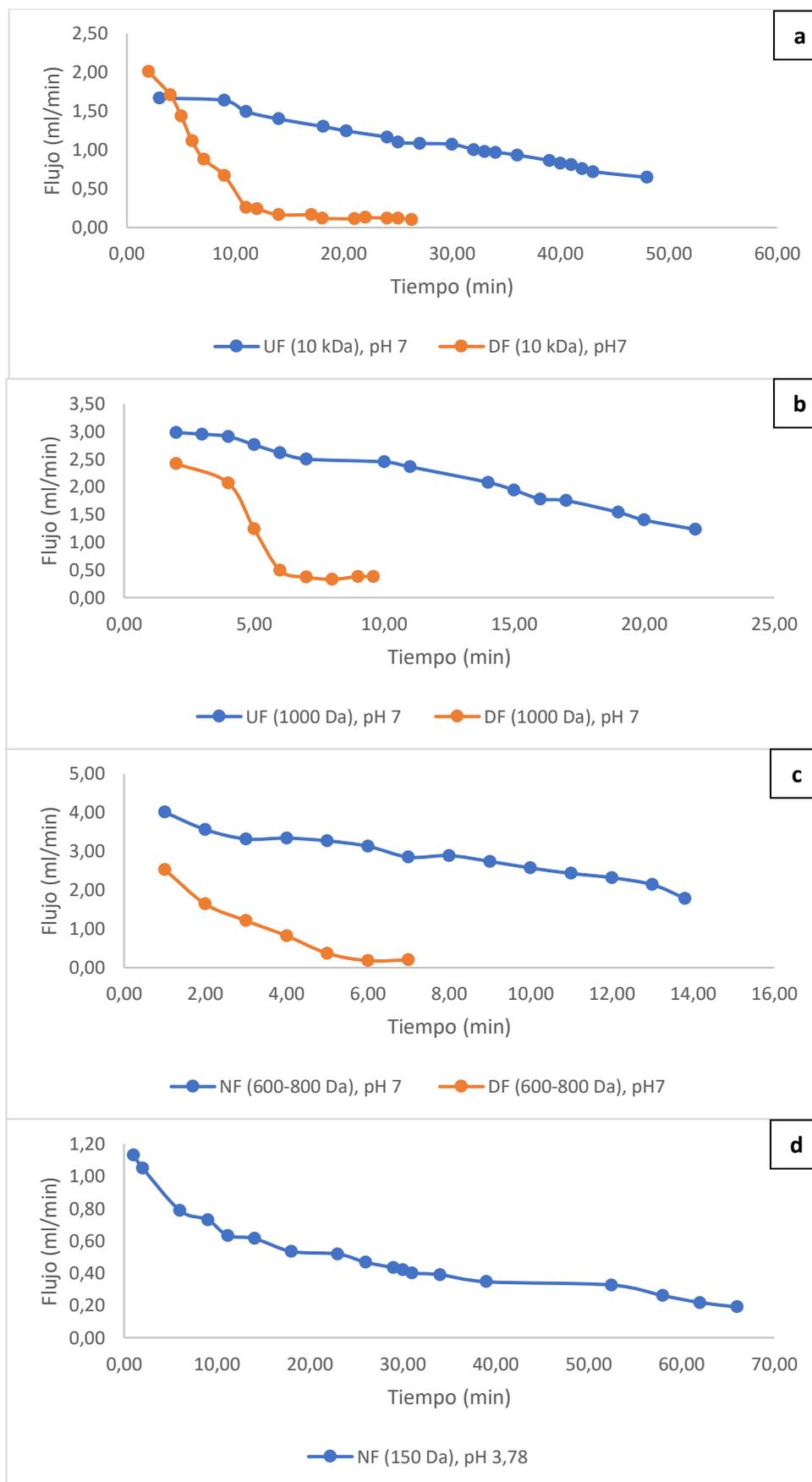


Figura 38. Flujos de volumen de la primera (a), segunda (b), tercera (c) y cuarta (d) etapa de filtración por membranas poliméricas. Nota: autoría propia.

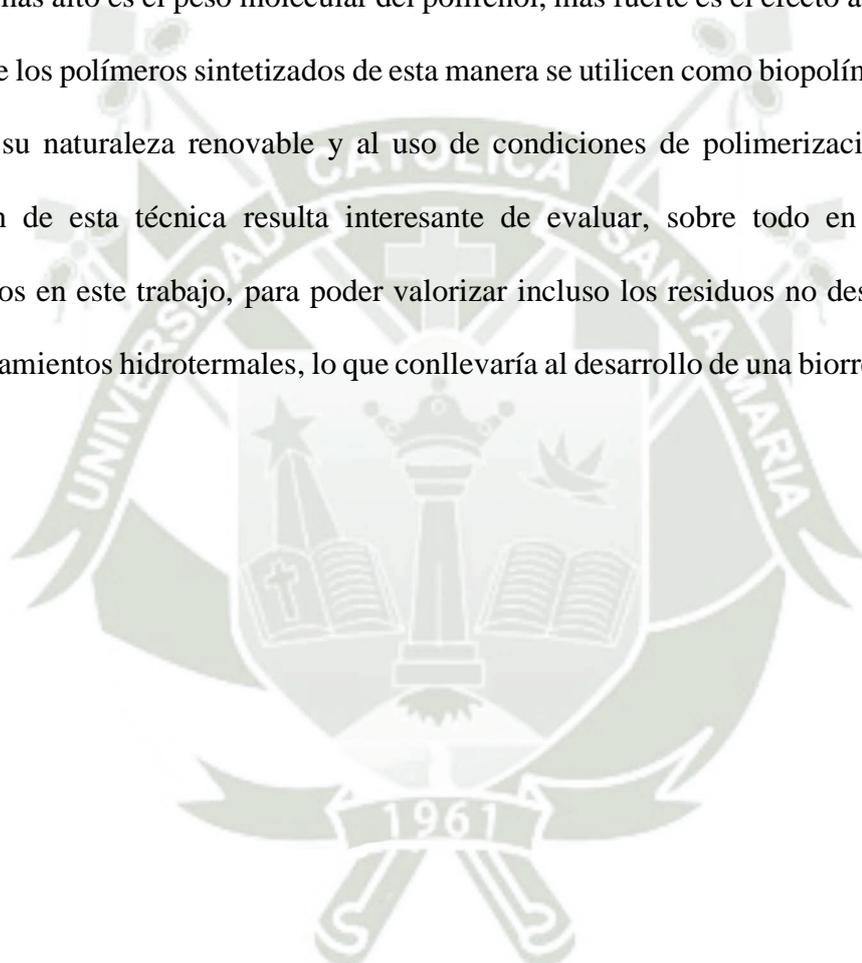
Como se ha podido observar en el proceso de filtración por membranas del extracto obtenido luego de 30 min de procesamiento hidrotérmico en el reactor Parr agitado, la retención previa de compuestos fenólicos permitió el uso de menos recursos para la concentración de XOS (X₂-X₄), necesitándose solo 2 etapas de NF (con membranas MWCO de 600-800 Da y 150 Da), lo que contrasta con las 4 etapas requeridas (2 UF con membranas de 10 kDa y 1 kDa y 2 NF con membranas de 600-800 Da y 150 Da) en el caso del extracto no sometido a este preproceso. El uso de cartuchos C18 permitió la retención de aproximadamente 85% de compuestos fenólicos. Estos compuestos fenólicos, resultantes del proceso de tratamiento hidrotérmico previo, entre otros compuestos inhibitorios sugieren una barrera para la actividad prebiótica de los XOS. La mayoría de los inhibidores derivados de la biomasa lignocelulósica se forman durante el tratamiento previo, cuando las hemicelulosas y/o lignina se solubilizan y degradan, además los extractivos y la celulosa que son afectadas, sin intención, en los procesos de tratamiento también son otras fuentes ¹². El procesamiento hidrotérmico, el cual tiene como mayor efecto la solubilización de hemicelulosas sin una completa hidrólisis, tiene como subproductos ácido acético y pequeñas cantidades de aldehídos furánicos ¹². Por todo ello, se considera importante la producción de XOS de gran pureza, para evitar inhibidores indeseados de su actividad prebiótica. Entre las técnicas de purificación de XOS se encuentra el uso combinado de membranas de UF y NF y/o el uso de membranas de UF con diferentes valores de corte de peso molecular (MWCO) ¹⁵.

En el trabajo presentado por Geetha & Gunasekaran (2017) ⁸¹ se sometió un hidrolizado enzimático de salvado de trigo a un sistema de UF, con una membrana MWCO de 10 kDa, para poder separar los polisacáridos de alto peso molecular y compuestos no sacáridos, luego de ello, el permeado que contenía los oligosacáridos deseados se procesó a través de una segunda membrana de UF MWCO de 3 kDa para poder obtener en el permeado final altas concentraciones de XOS con grado de polimerización de 2-5 y menores concentraciones de

XOS de alto peso molecular y xilosa. En el permeado final luego de utilizar la membrana de 10 kDa se recuperó en total 72% de XOS y luego de utilizar la membrana de 3 kDa se recuperó en total 44% de XOS ⁸¹.

En el trabajo realizado por Kim et al. (2022) ¹⁴, en la etapa de producción de XOS de bajo peso molecular a escala piloto, se sometió a tratamiento hidrotermal los residuos agrícolas de palma de aceite, específicamente del racimo de fruto vacío, para luego someter el hidrolizado de hemicelulosa a una concentración empleando una membrana de ósmosis inversa (OI), para reducir la escala de la etapa de hidrólisis enzimática. La composición de los hidrolizados de hemicelulosa antes y después de la concentración por OI se incrementó por un factor de 10. Este proceso de concentración puede permitir que el permeado sea reutilizado como agua de proceso, reduciendo así la cantidad de agua residual generada. Luego de la concentración empleando una membrana de OI, el porcentaje de recuperación de $X_1 - \geq X_6$ fue de aproximadamente 90% ¹⁴. Considerar una etapa de hidrólisis enzimática, empleando una xilanasa para la producción de XOS con bajos grados de polimerización (X_2 y X_3), puede incrementar el contenido total de X_2 y X_3 como en el caso reportado por Kim et al. (2022) ¹⁴ donde se consiguió incrementar este contenido hasta un 69,3%, 2,8 veces más que antes del proceso de hidrólisis enzimática. Como ya se ha mencionado anteriormente, existen diversas técnicas de purificación de XOS en las que se encuentra la polimerización enzimática, la cual puede también combinarse con procesos de filtración por membranas, para poder disminuir la cantidad de compuestos residuales no deseados, como los compuestos fenólicos. Cuando se habla de una polimerización enzimática lo que se busca es polimerizar los compuestos fenólicos y precipitarlos mediante reacciones catalizadas por una peroxidasa. La polimerización enzimática resulta interesante para poder obtener polímeros fenólicos a partir de los diversos compuestos fenólicos generados durante el tratamiento hidrotermal de la biomasa. Estos compuestos fenólicos forman radicales fenoxi por medio de la peroxidasa en

presencia de peróxido de hidrógeno, posteriormente sufren una reacción en cadena con las demás sustancias fenólicas, dando lugar a la precipitación de polímeros fenólicos de color marrón rojizo ¹⁴. Estos polímeros fenólicos pueden ser utilizados en varios campos debido a sus propiedades fisicoquímicas deseables, que incluyen una alta biocompatibilidad y respeto al medio ambiente ⁸², además pueden ser utilizados como materiales antioxidantes ya que mientras más alto es el peso molecular del polifenol, más fuerte es el efecto antioxidante ⁸³. Se espera que los polímeros sintetizados de esta manera se utilicen como biopolímeros sostenibles, debido a su naturaleza renovable y al uso de condiciones de polimerización suaves ¹⁴. La aplicación de esta técnica resulta interesante de evaluar, sobre todo en casos como los presentados en este trabajo, para poder valorizar incluso los residuos no deseados generados de los tratamientos hidrotermales, lo que conllevaría al desarrollo de una biorrefinería eficiente.



CONCLUSIONES

1. Se determinó el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de los residuos de cebolla y maíz. Las hojas de cebolla se componían de 26,40% de celulosa, 5,05% de hemicelulosa y 5,37% de lignina y las pancas de maíz de 34,06% de celulosa, 31,70% de hemicelulosa y 4,65% de lignina.
2. Se evaluaron diferentes temperaturas y tiempos para poder determinar las mejores condiciones de tratamiento hidrotérmico. Para todos los casos, la mejor temperatura fue 180°C. En reactores no agitados, en 50 min se obtuvo 0,9 g de XOS por 100 g de hojas de cebolla y en 75 min se obtuvo 4,8 g de XOS por 100 g de pancas de maíz. En el reactor agitado, en 30 min, se obtuvo 3,1 g de XOS por 100 g de pancas de maíz. Las pancas de maíz resultaron más aprovechables para la producción de XOS a comparación de las hojas de cebolla.
3. Se evaluó el potencial de membranas de UF y NF para la purificación y concentración de XOS, de los hidrolizados de pancas de maíz. Valores de pH 4 y 5,5 favorecían la concentración de XOS en los retentados, con un menor flujo de trabajo; por otro lado, a pH 7 un mayor porcentaje de XOS pasaba hacia el permeado, con un mayor flujo de trabajo. Todos los hidrolizados fueron sometidos a operaciones combinadas de UF y NF, obteniendo en los retentados finales porcentajes de recuperación de XOS de 67% (pH 7) y de 89-94% (pH cercano a 4). Además, se evaluó la capacidad de retención de compuestos fenólicos de columnas C18, las cuales lograron retener 85% de estos compuestos. Sin embargo, también retuvieron 47% del total de XOS.
4. Se realizó la cuantificación de xilosa y XOS obtenidos, en las diferentes etapas de hidrólisis hidrotérmica y filtración por membranas mediante HPLC, esto permitió el cálculo tanto de las concentraciones obtenidas y los porcentajes de recuperación de XOS (X_2 - X_4) en cada proceso realizado.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda tener en cuenta el empleo de una hidrólisis enzimática, luego del tratamiento hidrotermal empleado, para la mayor liberación de moléculas más pequeñas como la xilobiosa y la xilotriosa.
2. Se recomienda optimizar el tratamiento hidrotermal empleado para el tratamiento de biomasa lignocelulósica considerando los distintos productos que puedan obtenerse de las otras fracciones valorizables que componen este tipo de biomasa, para el aprovechamiento de residuos en un contexto de biorrefinería.
3. Se recomienda tener en consideración otros parámetros en el desarrollo del tratamiento hidrotermal como pH, ya que podrían influir en la formación de subproductos no deseados.
4. Se recomienda considerar la polimerización enzimática para el aprovechamiento de compuestos fenólicos (subproducto no deseado) y volverlos un subproducto de interés para la obtención de polímeros fenólicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jaime L, Mollá E, Fernández A, Martín-Cabrejas MA, López-Andréu J, Esteban RM. Structural Carbohydrate Differences and Potential Source of Dietary Fiber of Onion (*Allium cepa* L.) Tissues. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2001 [cited 2022 Dec 28];50(1):122–8. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf010797t>
2. Benítez V, Mollá E, Martín-Cabrejas MA, Aguilera Y, Esteban RM. Physicochemical properties and in vitro antidiabetic potential of fibre concentrates from onion by-products. *J Funct Foods*. 2017 Sep 1;36:34–42.
3. Khan MFS, Akbar M, Xu Z, Wang H. A review on the role of pretreatment technologies in the hydrolysis of lignocellulosic biomass of corn stover. *Biomass Bioenergy*. 2021 Dec 1;155:106276.
4. García J, Sánchez A, Jáuregui E, Torres A, Del Castillo A, Gonzales J, et al. Perú: Panorama Económico Departamental [Internet]. 2019 Nov [cited 2022 Dec 28]. Available from: <https://www.inei.gov.pe/media/MenuRecursivo/boletines/panoramanov.pdf>
5. Unidad de Inteligencia Comercial. Mercado y Tendencia del Maíz Blanco Gigante del Cusco [Internet]. 2021 [cited 2023 Jan 3]. Available from: https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/3431977/Maiz_Gigante_Cusco_Estudio_uic.pdf?v=1658272788
6. Ávila PF, Franco Cairo JPL, Damasio A, Forte MBS, Goldbeck R. Xylooligosaccharides production from a sugarcane biomass mixture: Effects of commercial enzyme combinations on bagasse/straw hydrolysis pretreated using different strategies. *Food Research International*. 2020 Feb 1;128:108702.
7. Esteban J, Yustos P, Ladero M. Catalytic Processes from Biomass-Derived Hexoses and Pentoses: A Recent Literature Overview. *Catalysts* 2018, Vol 8, Page 637 [Internet]. 2018 Dec 7 [cited 2023 Jan 5];8(12):637. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4344/8/12/637/htm>
8. Reddy JP, Rhim JW. Extraction and Characterization of Cellulose Microfibers from Agricultural Wastes of Onion and Garlic. <https://doi.org/10.1080/154404782014945227> [Internet]. 2018 Jul 4 [cited 2023 Jan 5];15(4):465–73. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15440478.2014.945227>
9. Mori T, Tsuboi Y, Ishida N, Nishikubo N, Demura T, Kikuchi J. Multidimensional High-Resolution Magic Angle Spinning and Solution-State NMR Characterization of ¹³C-labeled Plant Metabolites and Lignocellulose. *Scientific Reports* 2015 5:1 [Internet]. 2015 Jul 6 [cited 2023 Jan 5];5(1):1–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep11848>
10. Chen Z, Li P, Ji Q, Xing Y, Ma X, Xia Y. All-polysaccharide composite films based on calcium alginate reinforced synergistically by multidimensional cellulose and hemicellulose fractionated from corn husks. *Mater Today Commun*. 2023 Mar 1;34:105090.

11. Louis ACF, Venkatachalam S. Energy efficient process for valorization of corn cob as a source for nanocrystalline cellulose and hemicellulose production. *Int J Biol Macromol*. 2020 Nov 15;163:260–9.
12. Jönsson LJ, Martín C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresour Technol*. 2016 Jan 1;199:103–12.
13. Cano ME, García-Martin A, Morales PC, Wojtusik M, Santos VE, Kovensky J, et al. Production of Oligosaccharides from Agrofood Wastes. *Fermentation* 2020, Vol 6, Page 31 [Internet]. 2020 Mar 8 [cited 2023 Jan 5];6(1):31. Available from: <https://www.mdpi.com/2311-5637/6/1/31/htm>
14. Kim D, Yu JH, Hong KS, Jung CD, Kim H, Kim J, et al. Green production of low-molecular-weight xylooligosaccharides from oil palm empty fruit bunch via integrated enzymatic polymerization and membrane separation for purification. *Sep Purif Technol*. 2022 Jul 15;293:121084.
15. Oliveira MG de, Forte MBS, Franco TT. A serial membrane-based process for fractionation of xylooligosaccharides from sugarcane straw hydrolysate. *Sep Purif Technol*. 2021 Dec 1;278:119285.
16. Akpınar O, Ak O, Kavas A, Bakir U, Yılmaz L. Enzymatic Production of Xylooligosaccharides from Cotton Stalks. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2007 Jul 11 [cited 2023 Mar 14];55(14):5544–51. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf063580d>
17. Singh RD, Nadar CG, Muir J, Arora A. Green and clean process to obtain low degree of polymerisation xylooligosaccharides from almond shell. *J Clean Prod*. 2019 Dec 20;241:118237.
18. Pinelo M, Jonsson G, Meyer AS. Membrane technology for purification of enzymatically produced oligosaccharides: Molecular and operational features affecting performance. *Sep Purif Technol*. 2009 Nov 19;70(1):1–11.
19. Teshika JD, Zakariyyah AM, Zaynab T, Zengin G, Rengasamy KRR, Pandian SK, et al. Traditional and modern uses of onion bulb (*Allium cepa* L.): a systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2019 [cited 2023 Mar 17];59(sup1):S39–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30040448/>
20. Vojvodić Cebin A, Šeremet D, Mandura A, Martinić A, Komes D. Onion Solid Waste as a Potential Source of Functional Food Ingredients. *Engineering Power : Bulletin of the Croatian Academy of Engineering*. 2020 Oct 8;15(3):7–13.
21. Griffiths G, Trueman L, Crowther T, Thomas B, Smith B. Onions--a global benefit to health. *Phytother Res* [Internet]. 2002 Nov [cited 2023 Mar 17];16(7):603–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12410539/>
22. Jaldo Alvaro DM. Un análisis de la producción y comercio internacional de cebolla: situación y perspectivas de la cadena de valor en Argentina. XLVIII Reunión Anual de la Asociación Argentina de Economía Agraria AAEA Talca, Chile 17 al 19 de octubre

- de 2017 [Internet]. 2017 [cited 2023 Mar 17]; Available from: <http://repositorio.inta.gob.ar:80/handle/20.500.12123/1819>
23. MINAGRI-DGPA/DEEIA. Requerimientos Agroclimáticos del cultivo de cebolla. Lima; 2019 Jun.
 24. Dietary Molecular Diagnostics SL. Valorization of European onion waste by-products into dietary fibre-based formula with hypocholesterolemic, hypoglycemic, and antioxidant effects. CORDIS Resultados de investigaciones de la UE. 2018.
 25. Quevedo S. Manual técnico: maíz Blanco Urubamba (Blanco Gigante Cusco) [Internet]. Instituto Nacional de Innovación Agraria. Lima: Instituto Nacional de Innovación Agraria - INIA; 2013 Jun [cited 2023 Mar 19]. Available from: <https://repositorio.inia.gob.pe/handle/20.500.12955/87>
 26. Boggione MJ, Allasia MB, Aguilar CN, Farruggia B. Valorization of corn cob for the obtention and purification of endoglucanase produced by SSF. *Process Biochemistry*. 2020 Jan 1;88:106–12.
 27. Zoppi G, Tito E, Bianco I, Pipitone G, Pirone R, Bensaid S. Life cycle assessment of the biofuel production from lignocellulosic biomass in a hydrothermal liquefaction – aqueous phase reforming integrated biorefinery. *Renew Energy*. 2023 Apr 1;206:375–85.
 28. 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. <https://doi.org/10.1080/8755912920211926478> [Internet]. 2021 [cited 2023 Mar 25]; Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/87559129.2021.1926478>
 29. Poletto P, Pereira GN, Monteiro CRM, Pereira MAF, Bordignon SE, de Oliveira D. Xylooligosaccharides: Transforming the lignocellulosic biomasses into valuable 5-carbon sugar prebiotics. *Process Biochemistry*. 2020 Apr 1;91:352–63.
 30. Santibáñez L, Henríquez C, Corro-Tejeda R, Bernal S, Armijo B, Salazar O. Xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass: A comprehensive review. *Carbohydr Polym*. 2021 Jan 1;251:117118.
 31. Cho EJ, Trinh LTP, Song Y, Lee YG, Bae HJ. Bioconversion of biomass waste into high value chemicals. *Bioresour Technol*. 2020 Feb 1;298:122386.
 32. Mahmood N, Yuan Z, Schmidt J, Xu C. Depolymerization of lignins and their applications for the preparation of polyols and rigid polyurethane foams: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2016 Jul 1;60:317–29.
 33. de Freitas C, Carmona E, Brienzo M. Xylooligosaccharides production process from lignocellulosic biomass and bioactive effects. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. 2019 Apr 1;18:100184.
 34. Liang T, Wang L. Thermal Treatment of Poplar Hemicelluloses at 180 to 220 °C under Nitrogen Atmosphere. *Bioresources*. 2016 Dec 19;12:1128–35.

35. Peng F, Peng P, Xu F, Sun RC. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnol Adv.* 2012 Jul 1;30(4):879–903.
36. Kumar V, Bahuguna A, Ramalingam S, Kim M. Developing a sustainable bioprocess for the cleaner production of xylooligosaccharides: An approach towards lignocellulosic waste management. *J Clean Prod.* 2021 Sep 20;316:128332.
37. Scapini T, dos Santos MSN, Bonatto C, Wancura JHC, Mulinari J, Camargo AF, et al. Hydrothermal pretreatment of lignocellulosic biomass for hemicellulose recovery. *Bioresour Technol.* 2021 Dec 1;342:126033.
38. Ruiz HA, Conrad M, Sun SN, Sanchez A, Rocha GJM, Romaní A, et al. Engineering aspects of hydrothermal pretreatment: From batch to continuous operation, scale-up and pilot reactor under biorefinery concept. *Bioresour Technol.* 2020 Mar 1;299:122685.
39. Cocero MJ, Cabeza Á, Abad N, Adamovic T, Vaquerizo L, Martínez CM, et al. Understanding biomass fractionation in subcritical & supercritical water. *J Supercrit Fluids.* 2018 Mar 1;133:550–65.
40. Cabeza A, Piqueras CM, Sobrón F, García-Serna J. Modeling of biomass fractionation in a lab-scale biorefinery: Solubilization of hemicellulose and cellulose from holm oak wood using subcritical water. *Bioresour Technol.* 2016 Jan 1;200:90–102.
41. Akizuki M, Fujii T, Hayashi R, Oshima Y. Effects of water on reactions for waste treatment, organic synthesis, and bio-refinery in sub- and supercritical water. *J Biosci Bioeng.* 2014 Jan 1;117(1):10–8.
42. Okolie JA, Nanda S, Dalai AK, Kozinski JA. Optimization and modeling of process parameters during hydrothermal gasification of biomass model compounds to generate hydrogen-rich gas products. *Int J Hydrogen Energy.* 2020 Jul 17;45(36):18275–88.
43. Naidu DS, Hlangothi SP, John MJ. Bio-based products from xylan: A review. *Carbohydr Polym.* 2018 Jan 1;179:28–41.
44. 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 Processing Technology.* 2017 Jun 1;160:196–206.
45. de Freitas C, Carmona E, Brienzo M. Xylooligosaccharides production process from lignocellulosic biomass and bioactive effects. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre.* 2019 Apr 1;18:100184.
46. Sluiter A, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D. Determination of Extractives in Biomass - Laboratory Analytical Procedure (LAP). 2008 Jan.
47. Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, et al. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass - Laboratory Analytical Procedure (LAP). 2012 Aug.
48. Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D. Determination of Ash in Biomass - Laboratory Analytical Procedure (LAP). 2008 Jan.

49. Ghosh D, Tanner J, Lavoie JM, Garnier G, Patti AF. An integrated approach for hemicellulose extraction from forest residue. *Bioresources* [Internet]. 2021 [cited 2023 Nov 4];16(2):2524–47. Available from: <https://research.monash.edu/en/publications/an-integrated-approach-for-hemicellulose-extraction-from-forest-r>
50. Puișel AC, Suditu GD, Danu M, Ailiesei GL, Nechita MT. An Experimental Study on the Hot Alkali Extraction of Xylan-Based Hemicelluloses from Wheat Straw and Corn Stalks and Optimization Methods. *Polymers (Basel)* [Internet]. 2022 May 1 [cited 2023 Nov 4];14(9). Available from: [/pmc/articles/PMC9102963/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39102963/)
51. El-Hadidy EM, Mossa MEA, Habashy HN. Effect of freezing on the pungency and antioxidants activity in leaves and bulbs of green onion in Giza 6 and Photon varieties. *Annals of Agricultural Sciences*. 2014 Jun 1;59(1):33–9.
52. Bhadwal S, Kumari N, Kumari M, Badhan K, Gomra S, Manhas N, et al. Prepared compost from food waste effectively increased onion production under sub-tropical conditions. *Discover Sustainability* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2023 Sep 13];3(1):1–11. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s43621-022-00111-9>
53. Salam A, Venditti R, Pawlak J, El-Tahlawy K, Ayoub A. Extraction and utilization of hemicelluloses for new biomaterial applications. 4th International Conference on Pulping, Papermaking and Biotechnology [Internet]. 2012 Nov [cited 2023 Sep 10]; Available from: https://www.researchgate.net/publication/279726051_EXTRACTION_AND_UTILIZATION_OF_HEMICELLULOSES_FOR_NEW_BIOMATERIAL_APPLICATIONS
54. Kundu P, Kumar S, Ahluwalia V, Kansal SK, Elumalai S. Extraction of arabinoxylan from corncob through modified alkaline method to improve xylooligosaccharides synthesis. *Bioresour Technol Rep*. 2018 Sep 1;3:51–8.
55. Oriez V, Peydecastaing J, Pontalier PY. Lignocellulosic Biomass Mild Alkaline Fractionation and Resulting Extract Purification Processes: Conditions, Yields, and Purities. *Clean Technologies 2020*, Vol 2, Pages 91-115 [Internet]. 2020 Feb 14 [cited 2023 Oct 10];2(1):91–115. Available from: <https://www.mdpi.com/2571-8797/2/1/7/htm>
56. Monteiro CRM, Rodrigues LGG, Cesca K, Poletto P. Evaluation of hydrothermal sugarcane bagasse treatment for the production of xylooligosaccharides in different pressures. *J Food Process Eng*. 2022 Feb 1;45(2).
57. Datta D, Pamanji D, Das B. Isolation of Nanocellulosic Fibrils from *Allium cepa* L. Skin Biowaste Food Residues: Extraction and Characterization. *Journal of The Institution of Engineers (India): Series E*. 2023 Jun 1;104(1):141–51.
58. Blue D, Fortela DL, Holmes W, LeBoeuf S, Subramaniam R, Hernandez R, et al. Alkali pretreatment of industrial mixed vegetable waste for fermentable sugar production. *Biomass Convers Biorefin*. 2023 Apr 1;13(6):5367–77.

59. Kupski L, Telles AC, Gonçalves LM, Nora NS, Furlong EB. Recovery of functional compounds from lignocellulosic material: An innovative enzymatic approach. *Food Biosci.* 2018 Apr 1;22:26–31.
60. Vijayalaxmi S, Jayalakshmi SK, Sreeramulu K. Polyphenols from different agricultural residues: extraction, identification and their antioxidant properties. *J Food Sci Technol* [Internet]. 2015 Apr 15 [cited 2023 Oct 11];52(5):2761–9. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-014-1295-9>
61. Michelin M, Teixeira JA. Liquid hot water pretreatment of multi feedstocks and enzymatic hydrolysis of solids obtained thereof. *Bioresour Technol.* 2016 Sep 1;216:862–9.
62. Jantip S, Suwanruji P. Preparation and Properties of Microcrystalline Cellulose from Corn Residues. *Adv Mat Res.* 2011 Sep;332–334:1781–4.
63. Barl B, Biliaderis CG, Murray ED, Macgregor AW. Combined chemical and enzymic treatments of corn husk lignocellulosics. *J Sci Food Agric* [Internet]. 1991 Jan 1 [cited 2023 Sep 9];56(2):195–214. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jsfa.2740560209>
64. Barl B, Biliaderis CG, Murray ED. Effect of Chemical Pretreatments on the Thermal Degradation of Corn Husk Lignocellulosics. *J Agric Food Chem* [Internet]. 1986 [cited 2023 Sep 9];34(6):1019–24. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf00072a022>
65. Cong L, Li Z, Guanqun Z, Jianguo X, Long Z. Characterization and components separation of corn stover by alkali and hydrogen peroxide treatments. *Polish Journal of Chemical Technology.* 2015 Jun 1;17(2):89–95.
66. Sobri NSA, Harun S, Ishak NS, Jahim JM, Mohammad AW. Enhancement of high xylan recovery from black liquor of alkaline pretreated oil palm frond and its physicochemical properties. *Bioresources.* 2019 Jan 1;14(3):5400–21.
67. de Mattos NR, Colodette JL, de Oliveira CR. Alkaline extraction and carboxymethylation of xylans from corn fiber. *Cellulose* [Internet]. 2019 Feb 15 [cited 2023 Nov 4];26(3):2177–89. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10570-018-02236-5>
68. Tian Z, Chen J, Ji X, Wang Q, Yang G, Fatehi P. Dilute sulfuric acid hydrolysis of *Pennisetum* (sp.) Hemicellulose. *Bioresources.* 2017 May 1;12(2):2609–17.
69. Sun SN, Yuan TQ, Li MF, Cao XF, Xu F, Liu QY. Structural characterization of hemicelluloses from bamboo culms (*neosinocalamusaffinis*). *Cellulose Chemistry and Technology.* 2012 Apr;46(3–4):165–76.
70. Kabel MA, Carneiro F, Garrote G, Avgerinos E, Koukios E, Parajó JC, et al. Hydrothermally treated xylan rich by-products yield different classes of xylo-oligosaccharides. *Carbohydr Polym.* 2002 Oct 1;50(1):47–56.

71. Vázquez MJ, Garrote G, Alonso JL, Domínguez H, Parajó JC. Refining of autohydrolysis liquors for manufacturing xylooligosaccharides: evaluation of operational strategies. *Bioresour Technol.* 2005 May 1;96(8):889–96.
72. Vegas R, Alonso JL, Domínguez H, Parajó JC. Processing of Rice Husk Autohydrolysis Liquors for Obtaining Food Ingredients. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2004 Dec 1 [cited 2023 Sep 25];52(24):7311–7. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf049142t>
73. Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol.* 2005 Apr 1;96(6):673–86.
74. Carvalheiro F, Esteves MP, Parajó JC, Pereira H, Gírio FM. Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. *Bioresour Technol.* 2004 Jan 1;91(1):93–100.
75. Ho AL, Carvalheiro F, Duarte LC, Roseiro LB, Charalampopoulos D, Rastall RA. Production and purification of xylooligosaccharides from oil palm empty fruit bunch fibre by a non-isothermal process. *Bioresour Technol.* 2014 Jan 1;152:526–9.
76. Yan F, Tian S, Du K, Xue X, Gao P, Chen Z. Preparation and nutritional properties of xylooligosaccharide from agricultural and forestry byproducts: A comprehensive review. *Front Nutr.* 2022 Sep 13;9:977548.
77. Rosas Vega FE, Sanchez Muñoz S, Severo Gonçalves I, Terán Hilares F, Rocha Balbino T, Soares Forte MB, et al. Carbohydrates valorization of Quinoa (*Chenopodium quinoa*) stalk in xylooligosaccharides and carotenoids as emergent biomolecules. *Ind Crops Prod.* 2023 Apr 1;194:116274.
78. 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 Memb Sci.* 2006 Sep 1;280(1–2):311–20.
79. Corrales Centeno A, Sanchez Muñoz S, Severo Gonçalves I, Sanchez Vera FP, Soares Forte MB, da Silva SS, et al. Valorization of rice husk by hydrothermal processing to obtain valuable bioproducts: Xylooligosaccharides and *Monascus* biopigment. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications.* 2023 Dec 1;6:100358.
80. Guo S, Luo J, Wu Y, Qi B, Chen X, Wan Y. Decoloration of sugarcane molasses by tight ultrafiltration: Filtration behavior and fouling control. *Sep Purif Technol.* 2018 Oct 2;204:66–74.
81. Geetha K, Gunasekaran P. Purification of endoxylanase from *Bacillus pumilus* B20 for production of prebiotic xylooligosaccharide syrup; An in vitro study. *Iran J Biotechnol.* 2017 Sep 1;15(4):232–40.
82. Zavada SR, Battsengel T, Scott TF. Radical-Mediated Enzymatic Polymerizations. *International Journal of Molecular Sciences* 2016, Vol 17, Page 195 [Internet]. 2016 Feb 2 [cited 2023 Sep 24];17(2):195. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/17/2/195/htm>

83. Su J, Fu J, Wang Q, Silva C, Cavaco-Paulo A. Laccase: a green catalyst for the biosynthesis of poly-phenols. *Crit Rev Biotechnol* [Internet]. 2018 Feb 17 [cited 2023 Sep 24];38(2):294–307. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07388551.2017.1354353>

