

## PRETRATAMIENTO E HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA CASCARILLA DE ARROZ

Yasmin Castillo García<sup>1</sup>, Juan Juscamaita Morales<sup>1</sup>, Paola A. Jorge Montalvo<sup>2,3</sup>, Lizardo Visitación Figueroa<sup>2,3</sup>

### RESUMEN

El presente estudio evaluó la hidrólisis de la cascarilla de arroz, mediante el pretratamiento alcalino-peróxido, ácido-peróxido y silicato-peróxido, seguido de hidrólisis enzimática utilizando celulasas, con alto nivel de  $\beta$ -glucosidasas y hemicelulasas. Los pretratamientos fueron realizados variando las concentraciones del medio alcalino (0, 2, 4 y 6 % *p/v*), ácido (0, 5, 10 y 15 % *v/v*) y silicato (0, 5, 10 y 15 % *p/v*) en concentraciones variables de peróxido (0, 5, 10 y 15 % *v/v*). La hidrólisis enzimática fue realizada a 50 °C, pH de 5, 72 h, 0,3 mL de enzima por g de cascarilla y con una carga del 5 % *p/v*. La caracterización morfológica de la superficie de la cascarilla de arroz mediante el SEM presentó una mayor transformación en medio alcalino-peróxido. La concentración de azúcares reductores después del pretratamiento alcalino-peróxido (6 % *p/v* KOH – 15 % *v/v* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH de 11, 70 °C, 3 h y con una carga del 10 % *p/v*) y de una hidrólisis enzimática (50 °C, pH de 5, 72 h, 0,3 mL/g; con una carga del 5 % *p/v*) alcanzó una sacarificación de hasta 73,2 %. Los azúcares reductores liberados podrían ser fermentados en el proceso de obtención de etanol 2G.

**Palabras clave:** cascarilla de arroz; pretratamiento; hidrólisis enzimática.

## PRE-TREATMENT AND ENZYMATIC SACRIFICATION OF RICE HUSK

### ABSTRACT

The present study evaluated the hydrolysis of rice husk, by means of alkaline peroxide, acid peroxide and silicate peroxide pretreatment, followed by enzymatic hydrolysis using cellulases, with a high level of  $\beta$ -glucosidasas and hemicellulases. Pretreatments were performed by varying the concentrations of the alkaline medium (0, 2, 4 and 6 % *p/v*), acid (0, 5, 10 and 15 % *v/v*) and silicates (0, 5, 10 and 15 % *v/v*) in varying concentrations of

<sup>1</sup> Laboratorio de Biotecnología Ambiental - Unidad de Biorremediación – Facultad de Ciencias - Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima - Perú

<sup>2</sup> Centro de Investigación en Química, Toxicología y Biotecnología Ambiental CIQTOBIA – Facultad de Ciencias– Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima - Perú

<sup>3</sup> Centro Modelo de Tratamiento de Residuos CEMTRAR - Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima -Perú  
paolajom@lamolina.edu.pe

peroxide (0, 5, 10 and 15 % v/v). Enzymatic hydrolysis was performed at 50 °C, pH 5, 72 h, 0.3 mL of enzyme per g of husk, with a load of 5 % w/v. The morphological characterization of the surface of the rice husk by means of the SEM presented a greater transformation in alkaline-peroxide medium. The concentration of reducing sugars after the alkaline peroxide pretreatment (6 % KOH – 15 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH 11, 70 °C, 3 h and with a load 10 % p/v) and the enzymatic hydrolysis (50 °C, pH 5, 72 h, 0.3 mL/g, with a load of 5% w/v) reached a saccharification of up to 73.2 %. The released reducing sugars could be fermented in the process of obtaining 2G ethanol.

**Key words:** rice husk; pretreatment; enzymatic hydrolysis.

## INTRODUCCIÓN

En el Perú, la producción de arroz, según el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), ocupó un área sembrada y cosechada de 0,38 millones de hectáreas durante el 2014, estimando una generación aproximada de 0,34 millones de toneladas de cascarilla de arroz<sup>1</sup>.

La valorización de la cascarilla de arroz, residuo lignocelulósico, debe superar barreras naturales como la cercanía física y asociación química entre la lignina y los polisacáridos de la pared celular; así como el grado de cristalización de los polímeros de celulosa<sup>2,3,4</sup>, y para ello se debe realizar pretratamientos químicos, con al finalidad de exponer a la celulosa al ataque enzimático y posterior fermentación alcohólica para la obtención de la producción de etano de segunda generación<sup>5,6</sup>.

El pretratamiento alcalino-peróxido es aplicado para la remoción de la lignina por saponificación de los enlaces éster, logrando en algunos casos hasta un 50 % de remoción<sup>7,8</sup>. La inclusión del peróxido en medio alcalino favorece la delignificación por la oxidación con radicales hidroxilo y superóxidos<sup>9,10</sup>. El pretratamiento ácido permite la disolución de la hemicelulosa y redistribución de la lignina, aumentando la digestibilidad de la celulosa<sup>6</sup>. El efecto de altas temperaturas y elevada acidez pueden degradar las pentosas y hexosas formando furfural y 5-hidroximetilfurfural compuestos inhibidores de la hidrólisis enzimática y fermentación<sup>8,11</sup>. La aplicación del pretratamiento silicato-peróxido busca promover la formación de enlaces entre los grupos silicatos de la superficie rugosa y tricomas de la superficie de la cascarilla de arroz con los silicatos proporcionados por el pretratamiento generando huecos en la epidermis que expongan a la celulosa a un ataque enzimático posterior<sup>2</sup>.

Posterior al pretratamiento de la cascarilla de arroz, se realiza la hidrólisis enzimática, mediante una mezcla de enzimas que constan principalmente de celulasas, β-glucosidasas y hemicelulasas de tipo xilanasas<sup>12,13</sup>. Como una medida de la eficiencia de la hidrólisis, se utiliza el parámetro de la sacarificación, que relaciona el contenido de los azúcares reductores en el hidrolizado con el contenido de azúcares totales en la cascarilla de arroz<sup>12,14,15,16</sup>.

La presente investigación tuvo por objetivo evaluar el efecto de los pretratamientos químicos sobre la hidrólisis enzimática de la cascarilla de arroz.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Materiales

La cascarilla de arroz fue recolectada en la Asociación Peruana de Molineros de Arroz y Molino Sudamérica en mayo del 2017 Lambayeque - Perú. El material presentó un tamaño de 9,2 – 10,7 mm de largo por 2,1 – 3,8 mm de ancho, para evitar un gasto energético adicional se eliminó el proceso de molienda, otros autores reportan que al utilizar la cascarilla molida hasta 1,2 mm, se favorece notoriamente la liberación de azúcares totales<sup>17</sup>. Las muestras fueron conservadas al vacío en bolsas de 5 kg de capacidad y almacenadas en oscuridad hasta su análisis.

Los reactivos utilizados para los pretratamientos fueron: hidróxido de potasio (85 %, Merck, Alemania), ácido acético glacial (100 %, Merck, Alemania), peróxido de hidrógeno (50 %, Maquimsa S.A., Perú), silicato de potasio (23 % SiO<sub>2</sub>, Klaida, Perú). Para la hidrólisis enzimática se utilizó una mezcla de celulasas, con alto nivel de β-glucosidasas y hemicelulasas (Cellic<sup>®</sup> CTec2).

### Pretratamiento de la cascarilla de arroz

Se realizaron nueve pretratamientos alcalino-peróxido utilizando mezclas (1:1) de hidróxido de potasio al 2, 4 y 6 % *p/v* y peróxido de hidrógeno al 5, 10, 15 % *v/v*; nueve pretratamientos ácido-peróxido utilizando mezclas (1:1) de ácido acético glacial al 5, 10 y 15 % *v/v* y peróxido de hidrógeno al 5, 10 y 15 % *v/v*; y nueve pretratamientos silicato-peróxido utilizando mezclas (5:2) de silicato de potasio al 5, 10 y 15 % *p/v* y peróxido de hidrógeno al 5, 10, 15 % *v/v*, como se observa en tabla 1.

**Tabla 1.** Pretratamientos aplicados a la cascarilla de arroz.

Pretratamientos					
Alcalino-peróxido		Ácido-peróxido		Silicato-peróxido	
% KOH - % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		% CH <sub>3</sub> COOH - % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		% K <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> - % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
T1-Alc	0 – 0	T1-Ac	0 – 0	T1-S	0 – 0
T2-Alc	2 – 5	T2-Ac	5 – 5	T2-S	5 – 5
T3-Alc	4 – 5	T3-Ac	10 – 5	T3-S	10 – 5
T4-Alc	6 – 5	T4-Ac	15 – 5	T4-S	15 – 5
T5-Alc	2 – 10	T5-Ac	5 – 10	T5-S	5 – 10
T6-Alc	4 – 10	T6-Ac	10 – 10	T6-S	10 – 10
T7-Alc	6 – 10	T7-Ac	15 – 10	T7-S	15 – 10
T8-Alc	2 – 15	T8-Ac	5 – 15	T8-S	5 – 15
T9-Alc	4 – 15	T9-Ac	10 – 15	T9-S	10 – 15
T10-Alc	6 – 15	T10-Ac	15 – 15	T10-S	15 – 15

Se utilizó una carga de 10 % p/v de cascarilla de arroz en la solución deslignificante de cada pretratamiento, el tiempo de incubación fue de 3 h a 70 °C<sup>18</sup>. Se seleccionó un pretratamiento óptimo de cada solución deslignificante (alcalino-peróxido, ácido-peróxido, silicato-peróxido) en base a la mayor concentración de azúcares totales en el lixiviado, para su caracterización morfológica mediante SEM e hidrólisis enzimática.

### **Determinación de azúcares totales (AT)**

La determinación de AT se realizó en el lixiviado de las muestras como una medida indirecta de la eficiencia de cada pretratamiento. Se utilizó el método de DuBois, que se basa en la deshidratación de los azúcares al reaccionar con el ácido sulfúrico formando derivados de furfural. La formación del complejo coloreado se encuentra entre amarillo y naranja y presenta una absorbancia máxima a 490 nm<sup>19</sup>. Para la cuantificación se utilizó un espectrofotómetro modelo Evolution 300 UV-Vis Thermo Fisher Scientific.

### **Caracterización morfológica de la cascarilla de arroz pretratada**

Las muestras de los pretratamientos óptimos y una muestra no pretratada fueron observadas por la parte interna y externa de su superficie utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM). Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio electrónico modelo Q250 Analytical. Para el análisis las muestras fueron secadas y cubiertas con una película de oro, se utilizó una aceleración de voltaje de 20 kV. Las imágenes fueron obtenidas a 35 y 260 magnificaciones.

### **Hidrólisis enzimática (HE)**

La cascarilla de arroz pretratada fue hidrolizada enzimáticamente con diferentes relaciones enzima/sustrato: 0,1; 0,2 y 0,3 mL de enzima por gramo de sustrato, similar a lo reportado por Salcedo *et al.*<sup>20</sup>; utilizando una carga de 5 % p/v, 50 mM de buffer acetato de sodio, pH de 5, a 50° C por 72 horas y agitación de 150 rpm. Se trabajó con una mezcla de enzimas: celulasas, con alto nivel de  $\beta$ -glucosidasas y hemicelulasas (Cellic® CTec2). Este mezcla de enzimas posee un alto rendimiento de conversión, efectiva a altas concentraciones de sólidos, tolerante a inhibidores, compatible con múltiples materias primas y pretratamientos, posee una alta concentración y estabilidad<sup>13</sup>. Al finalizar, se almacenó el hidrolizado enzimático a 4 °C para determinar la cantidad de azúcares reductores así como el porcentaje de sacarificación.

### **Determinación de azúcares reductores (AR) y sacarificación**

La determinación de AR fue realizada utilizando el método del DNS, el método se basa en la reacción redox que ocurre entre los azúcares reductores y el ácido 3,5-dinitrosalicílico, la cual produce una coloración naranja y presenta una absorbancia máxima a 540 nm<sup>21,22</sup>. Para la cuantificación se utilizó un espectrofotómetro modelo Evolution 300 UV-Vis Thermo Fisher Scientific.

La sacarificación es un parámetro importante para evaluar la capacidad de un sustrato para formar azúcares reductores. Este parámetro relaciona el contenido de azúcares reductores en el hidrolizado enzimáticos y la concentración potencial de azúcar del sustrato con o sin pretratamiento, se determina mediante la ecuación (1)<sup>7,15,23</sup>.

$$\% \text{Sacarificación} = \frac{\text{Conc. de azúcares reductores en el hidrolizado enzimático}}{\text{Conc. potencial de azúcar del sustrato}} \times 100 \quad (1)$$

La concentración potencial de azúcares en la cascarilla de arroz se basó en la determinación del contenido de celulosa y hemicelulosa, obtenida por diferencia entre la masa total y el contenido de lignina, humedad y cenizas, conforme a lo establecido por el reporte técnico de la National Renewable Energy Laboratory OF United States NREL/TP-510-42618.

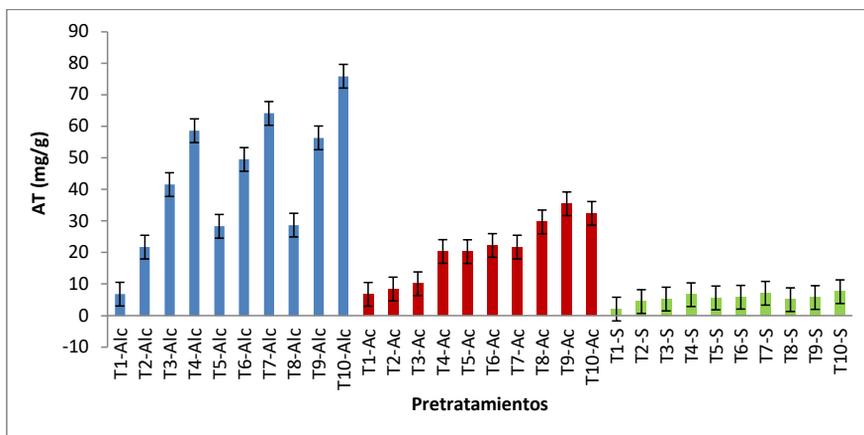
**Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se procesaron usando el software estadístico xlstat versión 2018.1. Se realizaron pruebas estadísticas de ANOVA y el LSD-Fisher.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Pretratamiento de la cascarilla de arroz**

Los resultados óptimos para cada pretratamiento fueron: T10-Alc, T9-Ac y T10-S. El análisis estadístico del ANOVA y el LSD-Fisher presentan diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en cada caso. En la figura 1 se muestra la comparación de AT en mg/g.



**Figura 1.** Azúcares totales (mg/g) en el lixiviado de la cascarilla de arroz sometida a pretratamientos.

El pretratamiento es la etapa más importante, pues tiene un impacto en el rendimiento y eficiencia de la hidrólisis enzimática. En esta etapa se eliminan algunos componentes constitutivos de la cascarilla como la lignina que dificulta la actividad enzimática y disminuye la cristalinidad de las fibras de celulosa; también se remueve la hemicelulosa de los residuos lignocelulósicos<sup>5,6</sup>.

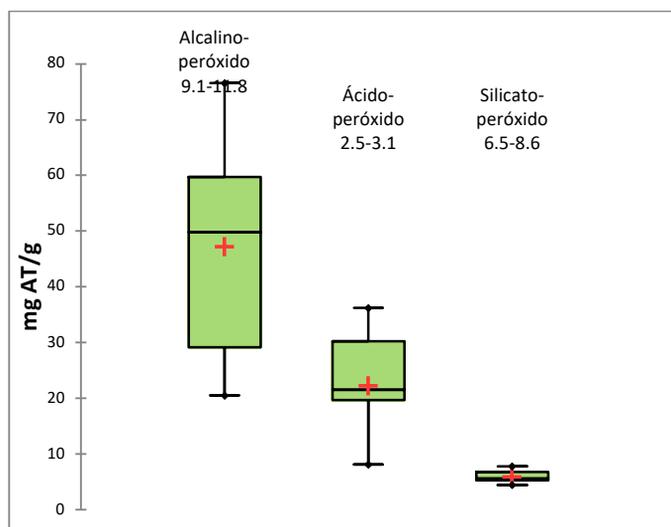
El pretratamiento T10-Alc ( $H_2O_2$  15 % v/v, pH de 11, 70 °C y 3 h de incubación para 10% de sustrato) de la cascarilla de arroz presentó el mejor resultado liberando hasta 75,9 mg/g de azúcares totales, este resultado es mayor al encontrado para el tratamiento alcalino 60 mg/g ( $H_2O_2$  0% v/v, pH de 11,5, 35 °C y 24 horas de incubación para 15 % de sustrato) e hidrólisis enzimática (pH de 5, 45 °C, 72 h, 0,4 mL/g) y menor que el tratamiento con alcalino-peróxido 249 mg/g ( $H_2O_2$  7,5 % v/v, pH de 11,5, 35 °C, 24 horas de incubación para 15 % de sustrato) e hidrólisis enzimática (pH de 5, 45 °C, 72 h, 0,4 mL/g) reportado por Saha y Cotta<sup>17</sup>. A tiempos cortos de pretratamiento, temperaturas altas de incubación mejoran el rendimiento de los azúcares liberados similar a lo reportado por Saha y Cotta<sup>17</sup> cuando evalúa a las temperaturas de 25 y 35 °C obteniendo un resultado de 149 y 211 mg/g, respectivamente. El incremento de la dosis de álcali mejora la liberación de azúcares totales desde 28,7 (T8-Alc) hasta 75,9 mg/g (T10-Alc) similar a lo reportado por Saha y Cotta<sup>25</sup>, que logra un incremento hasta del 83 %, cuando utiliza piedra caliza como álcali. Asimismo, se reporta que mediante el pretratamiento alcalino se mejora la digestibilidad de la celulosa y una menor degradabilidad de azúcares en relación al pretratamiento ácido<sup>25,26</sup>. Mediante el pretratamiento alcalino se produce la saponificación de los enlaces éster de la lignina, provocando la hidrólisis de la lignina, hemicelulosa y celulosa<sup>8</sup> evita la fragmentación de los polímeros de hemicelulosa, remueve lignina y hemicelulosa aumentando la accesibilidad de las enzimas a la celulosa<sup>6,8,27</sup>, sin degradar tanto los azúcares<sup>27</sup>, es por ello que es más eficiente que los otros pretratamientos. Aunque este pretratamiento presenta como desventaja que algunas bases se conviertan en sales y estas se incorporan en la biomasa<sup>27</sup>. Se reporta que el pretratamiento alcalino-peróxido es más eficaz para mejorar la digestibilidad de los residuos en la hidrólisis enzimática, es decir, se obtiene mayor solubilidad de lignina y hemicelulosa, y una mayor conversión a pH de 11,5; en comparación del pretratamiento alcalino<sup>26,28</sup>.

El pretratamiento T9-Ac ( $H_2O_2$  15 % v/v, pH de 2,6, 70 °C y 3 h de incubación para 10% de sustrato) liberó hasta 35,5 mg/g de azúcares totales, este resultado es mayor a 15 mg/g ( $H_2O_2$  0% v/v, pH menor a 2, 121 °C, 15 min de incubación para 15 % de sustrato) reportado por Saha et al.<sup>11</sup>, pero inferior a 65 mg/g determinado por Wi et al.<sup>29</sup> al utilizar ácido sulfúrico ( $H_2O_2$  0% v/v, pH menor a 2, 80 °C, 120 min de incubación para 10 % de sustrato) e hidrólisis enzimática (pH de 5, 37 °C, 72 horas de incubación, actividad de la celulasa y xilanasas de 79 kFPU/mL y 592 IU/mL). El pretratamiento con ácido depende de la temperatura, tiempo, concentración y tipo de ácido utilizado para la obtención de azúcares fermentables<sup>6,27</sup>. Este pretratamiento no resulta efectivo para la eliminación de la lignina, siendo tóxico, corrosivo y peligroso, requiriendo de procesos resistentes a la corrosión, lo que provoca un encarecimiento de costes<sup>26,28</sup>. Se reporta que durante el pretratamiento ácido caliente, generalmente las hemicelulosas se hidrolizan<sup>8,26</sup> y los azúcares libres resultantes pueden degradarse a furfural provenientes de pentosas y a 5-hidroxi-metilfurfural provenientes de hexosas<sup>8</sup>. Estos compuestos son inhibidores de los microorganismos, y su producción significa la pérdida de azúcares fermentables<sup>8,26</sup>. Estudios realizados por Wi *et al.*<sup>29</sup> en paja de arroz (relación de 1:1 de  $H_2O_2$  y  $CH_3COOH$ , 80 °C y 2 h de incubación, para 10 % de sustrato) e hidrólisis enzimática (pH de 5, 37 °C, 72 h, actividad de la celulasa y xilanasas de 79 kFPU/mL y 592 IU/mL) lograron mejores resultados de hasta 110 mg/g de azúcares totales, debido a que el pretratamiento con ácido acético y peróxido de hidrógeno es más eficiente para eliminar

lignina antes de la hidrólisis enzimática<sup>8,29</sup>, además no requiere de elevadas temperaturas, es menos corrosivo como los ácidos fuertes y disminuye la generación de inhibidores en el proceso de la fermentación.

El pretratamiento T10-S ( $H_2O_2$  15% v/v, pH neutro, 70 °C y 3 h de incubación para 10% de sustrato) liberó hasta 7,6 mg/g de azúcares totales, este resultado es menor a cualquiera de los pretratamientos probados alcalino-peróxido o ácido-peróxido, también es menor a 15,0 mg/g reportado por Wi *et al.*<sup>29</sup> cuando solo se aplica una molienda como pretratamiento, sin la aplicación de otros reactivos, e hidrólisis enzimática (pH de 5, 37 °C, 72h, actividad de la celulasa y xilanasas de 79 kFPU/mL y 592 IU/mL).

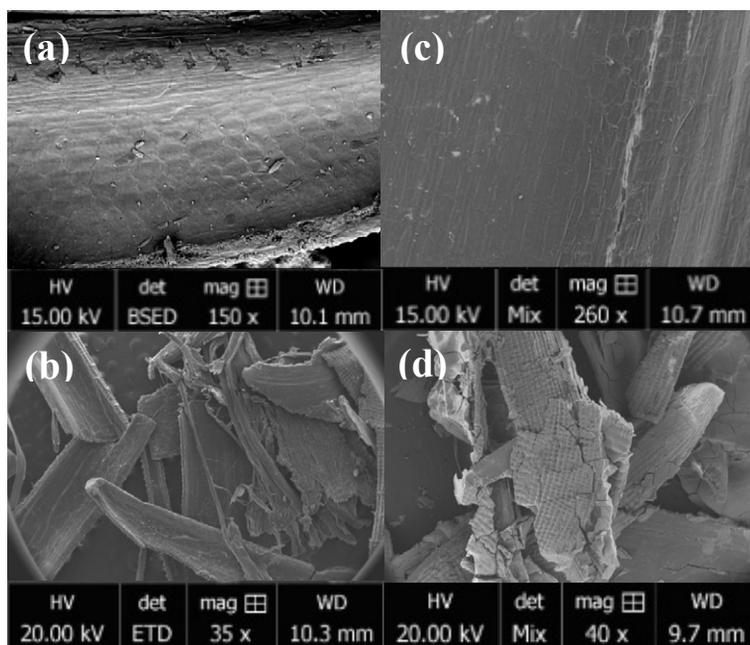
En la figura 2 se observa el rango de valores de pH encontrados en los lixiviados de los pretratamientos de la cascarilla de arroz, estos fueron; alcalino-peróxido: 9,1-11,8, ácido-peróxido: 2,5-3,1 y silicato-peróxido: 6,6-8,6. Los valores de pH hallados en el pretratamiento alcalino-peróxido se asemejan a los valores reportados, en donde se indica que la eficiencia de la deslignificación está en relación a los valores de pH, valores de 11,5-11,6 son más efectivos y valores menores a 10 son insignificantes y valores de más de 12,5 no muestran efecto sobre la digestibilidad enzimática<sup>17,26,30</sup>. El control del valor de pH entre 4 y 7 puede mejorar la susceptibilidad de la celulosa a las enzimas, disminuye la cristalinidad de la celulosa, disminuye la asociación de la celulosa con la lignina y evita la formación de la degradación de los monosacáridos a furfural y hidroxi metil furfural que interfieren en el proceso de hidrólisis enzimática y en el proceso fermentativo<sup>31</sup>.



**Figura 2.** Relación entre de azúcares totales en el lixiviado en mg/g y pH según los pretratamientos.

### Caracterización morfológica de la cascarilla de arroz

El análisis por microscopía de barrido electrónico de la epidermis interna de la cascarilla de arroz sin pretatratamiento presentó una superficie lisa, cerosa y brillante, acorde con lo planteado por Zou y Yang<sup>2</sup>, donde la lignina y la hemicelulosa mantienen unidas a las fibras de celulosa (figura 3a); el pretratamiento con T10-Alc presentó una superficie muy rasgada con parcial desintegración de la fibra debido a la remoción de la lignina y la hemicelulosa similar a lo reportado por Brígida *et al.*<sup>24</sup> (figura 3b), el pretratamiento con T9-Ac presentó una superficie rasgada, donde se ha removido la capa cerosa de ácidos grasos y se observa la formación de fosas donde se ha removido la pared celular (figura 3c), en el pretratamiento T10-S se observó que el silicato proveniente de la solución del pretratamiento forma una película sobre la superficie de la cascarilla de arroz que evita el ataque del peróxido sobre la fibra (figura 3d).

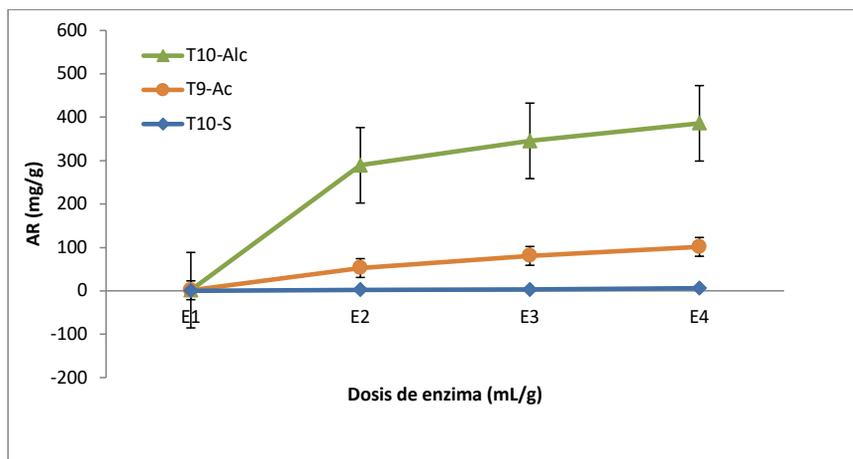


**Figura 3.** Microscopía de barrido electrónico (SEM) de la cascarilla de arroz, sin pretratamiento (a), con pretratamiento T10-Alc(b), T9-Ac(c) y T10-S(d).

### Hidrólisis enzimática

Los sustratos obtenidos de los pretratamiento seleccionados, T10-Alc, T9-Ac y T10-S fueron hidrolizados enzimáticamente con 0, 0,1, 0,2 y 0,3 mL de enzima Cellic Ctec2 por gramo de cascarilla de arroz, utilizando buffer acetato de sodio 50 mM, pH de 5, 50° C y 72 h de hidrólisis. En la figura 4 se observa que la mayor concentración de azúcares reductores a las 72 h de hidrólisis, se logra cuando se trabajó con la cascarilla proveniente del pretratamiento T10-Alc (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15 % v/v, pH de 11, 70 °C y 3 h de incubación para 10 % de sustrato).

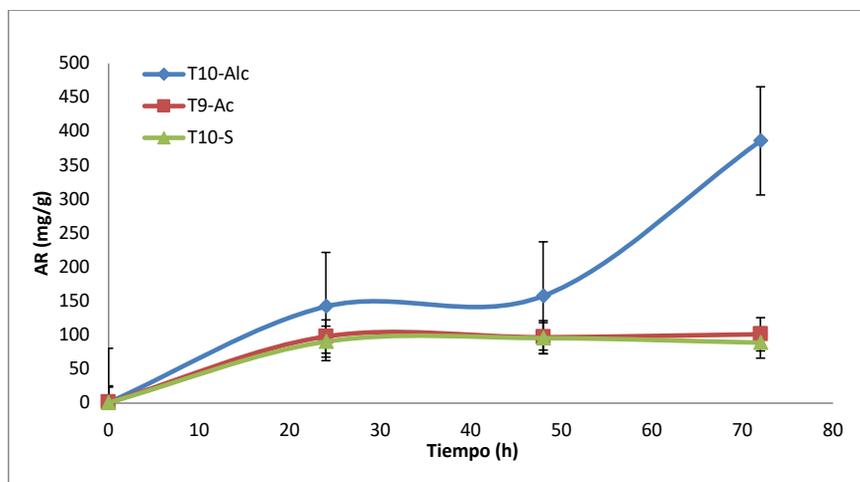
Mediante las comparaciones múltiples de LSD-Fisher se analizó los tratamientos enzimáticos que provenían de los pretratamientos T10-Alc, T9-Ac y T10-S, presentando diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) solo para el pretratamiento alcalino-peróxido en relación a los otros tratamientos.



**Figura 4.** Azúcares reductores (mg/g) en la hidrólisis enzimática (dosis de enzima E1: 0, E2: 0,1, E3: 0,2 y E4: 0,3 mL/g Ctec2, 50 mM de buffer acetato de sodio, pH de 5, 50 °C por 72 h, carga 5 % p/v) de los pretratamientos T10-Alc ( $H_2O_2$  15 % v/v, pH de 11, 70 °C por 3 h, carga 10 % p/v), T9-Ac ( $H_2O_2$  15 % v/v, pH de 2,6, 70 °C por 3 h, carga 10 % p/v) y T10-S ( $H_2O_2$  15 % v/v, pH 7,5, 70 °C por 3 h, carga 10 % p/v).

La concentración de azúcares reductores en mg/g proveniente del pretratamiento T10-Alc (6 % KOH – 15 %  $H_2O_2$ , 70°C, 3 h y carga del 10 % p/v) e hidrólisis enzimática (pH de 5, 50 °C por 72 h, 0,3 mL/g, con una carga 5% p/v) alcanza valores de 399,9 mg/g, este valor es superior a 60 mg/g cuando se trabajó con pretratamiento alcalino (0% v/v  $H_2O_2$ , pH de 11,5, 35 °C por 24 h) e hidrólisis enzimática (pH de 5, 45 °C por 72 h, 0,4 mL/g, con una carga 5 % p/v) y de 260 mg/g de azúcares reductores cuando se trabajó con pretratamiento peróxido alcalino (7,5 % v/v  $H_2O_2$ , pH de 11,5, 35 °C por 24 h) e hidrólisis enzimática (pH de 5, 45 °C por 72 h, 0,4 mL/g, con una carga 5 % p/v) reportado por Saha y Cotta<sup>17</sup>. Se observa que en presencia del peróxido y alta temperatura en el pretratamiento se obtiene mayor cantidad de azúcares reductores, estas relaciones también lo reporta Saha y Cotta<sup>30</sup>.

En la figura 5 se observa mayor concentración de azúcares reductores a mayor tiempo de incubación de hidrólisis enzimática para el pretratamiento T10-Alc, semejante resultado reportó Saha y Cotta<sup>30</sup> al obtener un máximo rendimiento de azúcares, trabajando bajo las condiciones mencionadas anteriormente y con una dosis de 0,12 mL/g de enzima, variando los tiempos de incubación de 3 h a 120 h, obteniendo 190 mg/g y 353 mg/g de AR, respectivamente; aún así, estos valores reportados no llegan a superar el valor hallado en el presente trabajo de 399,88 mg/g, teniendo como desventaja el largo tiempo de incubación pero eficientes al usar una menor concentración de enzima.



**Figura 5.** Promedio de azúcares reductores y el tiempo de incubación en la hidrólisis enzimática (pH de 5, 45 °C, 0,3 mL/g Ctec2 con una carga 5 % p/v) con los pretratamientos T10-Alc, T9-Ac y T10-S.

### Porcentaje de sacarificación

Para obtener el porcentaje de sacarificación se aplicó la Ec. (1), que relaciona el contenido de azúcares reductores en el hidrolizado enzimáticos y la concentración potencial de azúcar del sustrato con o sin pretratamiento. El contenido potencial de azúcares (celulosa y hemicelulosa) en la cascarilla de arroz fue de 54,75 % valor similar a lo reportado por Yu *et al.*<sup>23</sup>, este valor se obtuvo de la diferencia entre la masa total y el contenido de lignina 18,02 %, la humedad 8,78 % y cenizas 18,45 %, como se observa en la tabla 2.

**Tabla 2.** Composición química de la cascarilla de arroz.

Componente	Contenido (%)
Lignina	18,02 ± 0,87
Humedad	8,78 ± 0,41
Cenizas	18,45 ± 0,38
Celulosa+ Hemicelulosa	54,75 ± 0,01

Nota: Resultados ± desviación estándar para dos muestras por triplicado

Los mejores resultados encontrados fue para el pretratamiento T10-Alc (6% KOH - 15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 70°C, 3 h y carga del 10 % p/v) e hidrólisis enzimática (pH de 5, 50 °C por 72 h, 0,3 mL/g, con una carga 5 % p/v) que alcanzó una sacarificación de 73,2 %, este resultado es similar a 73 % reportado por Saha y Cotta<sup>17</sup> (7,50 % v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH de 11,5, 35 °C; 24 h, con carga de 15 % p/v), e hidrólisis enzimática (pH de 5, 45 °C, 72 h, 0,12 mL/g y carga de 10 %

p/v), utilizando una mezcla de enzimas celulasa,  $\beta$ -glucosidasa y xylanasa, cuando se utiliza cascarilla de arroz como sustrato.

## CONCLUSIONES

El pretratamiento alcalino-peróxido, tiene mayor efecto en el acceso de las enzimas celulasas,  $\beta$ -glucosidasas y xilanasas en la cascarilla de arroz facilitando la sacarificación de la celulosa y hemicelulosa, en azúcares reductores que podrían ser fermentados en el proceso de obtención de etanol 2G. Sin embargo, el uso de diversos medios puede tener un impacto en el gasto energético del proceso.

## AGRADECIMIENTO

Se agradece al Programa Nacional de Innovación Agraria – PNIA, Fondo Concursable Investigación Estratégica Priorizada del concurso N° 2-IE-PNIA-2016, patrocinadores del Proyecto Producción de etanol de 2da. generación G-2 a partir de residuos agroindustriales de caña, arroz y maíz, por su apoyo en el desarrollo de la presente investigación. Laboratorio de Biotecnología Ambiental - Unidad de Biorremediación, Centro Modelo de Tratamiento de Residuos CEMTRAR y el Centro de Investigación en Química, Toxicología y Biotecnología Ambiental CIQTOBIA de la Universidad Nacional Agraria La Molina UNALM, por el apoyo brindado.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SIEA. Producción Agrícola y Ganadera 2015. [Internet] Lima: Ministerio de Agricultura y Riego; 2015. [consultado 12 jul 2019]. Disponible en: <http://siea.minagri.gob.pe/siea/?q=noticias/anuario-de-la-producci%C3%B3n-agr%C3%ADcola-y-ganadera-2015>
2. Patel MM, Bhatt RM. Optimisation of the Alkaline Peroxide Pretreatment for the Delignification of Rice Straw and its Applications. *J Chem Tech Biotechnol.* 1992; 53(3):253–263.
3. Dagnino EP, Felissia F, Chamorro E, Area M. Obtención de biotanol a partir de la celulosa presente en cascarilla de arroz y aserrín de algarrobo. *Av Energ Renov Medio Ambiente.* 2014;18: 06.01-06.07
4. González-Rentería SM, Soto-Cruz NO, Rutiaga-Quiñones OM, Medrano-Roldán H, Rutiaga-Quiñones JG, López-Miranda J. Optimización del proceso de hidrólisis enzimática de una mezcla de pajas de frijol de cuatro variedades (Pinto villa, Pinto saltillo, Pinto mestizo y Flor de mayo). *Rev Mex Ing Química.* 2011; 10(1):17–28.
5. Zou Y, Yang T. Chapter 9 - Rice Husk, Rice Husk Ash and Their Applications. En: Cheong L-Z, Xu X, editores. *Rice Bran and Rice Bran Oil* [Internet]. AOCS Press; 2019. p. 207-246. [citado 7 de julio de 2019]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128128282000093>

6. Naveda R, Jorge P, Flores L, Visitación L. Remoción de lignina en el pretratamiento de cascarilla de arroz por explosión con vapor. *Rev Soc Quím Perú*. 2019; 85(3): 352-361.
7. Gould JM. Alkaline Peroxide Delignification of Agricultural Residues to Enhance Enzymatic Saccharification. *Biotechnol Bioeng*. 1984; 26:46–52.
8. Karp SG, Woiciechowski AL, Soccol VT, Soccol R. Pretreatment Strategies for Delignification of Sugarcane Bagasse: A Review. *Braz Arch Biol Technol* 2013; 56(4):679–689.
9. Gould JM. Studies on the Mechanism of Alkaline Peroxide Delignification of Agricultural Residues. *Biotechnol Bioeng*. 1985; 27(3):225-231.
10. Dutra ED, Santos FA, Ribeiro B, Alencar A, Libanio A, Reis S. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of lignocellulosic biomass: status and perspectives. *Biomass Convers Biorefinery*. 2017; 8(1):225–234.
11. Saha BC, Iten LB, Cotta MA, Wu YV. Dilute Acid Pretreatment, Enzymatic Saccharification, and Fermentation of Rice Hulls to Ethanol. *Biotechnol Prog*. 2005; 21:816–822.
12. Qi B, Chen X, Shen F, Su Y, Wan Y. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Wheat Straw Pretreated by Alkaline Peroxide Using Response Surface Methodology. *Ind Eng Chem Res*. 2009; 48:7346–7353.
13. Novozymes. Cellic® CTec2 and HTec2 - Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic materials. [Internet]. Novozymes [Consultado 20 jul 2019]. Disponible en: [https://www.yumpu.com/en/document/read/45797213/cellicar-ctec2-and-htec2-enzymes-for-hydrolysis-of-lignocellulosic-](https://www.yumpu.com/en/document/read/45797213/cellicar-ctec2-and-htec2-enzymes-for-hydrolysis-of-lignocellulosic)
14. Tewari HK, Marwaha SS. Evaluation of Acids and Cellulase Enzyme for the Effective Hydrolysis of Agricultural Lignocellulosic Residues. *J Chem Tech Biotechnol*. 1988; 41(4):261–275.
15. Sharma A, Khare SK, Gupta MN. Hydrolysis of rice hull by crosslinked *Aspergillus niger* cellulase. *Bioresour Technol*. 2001; 78(3):281–284.
16. Yamashita Y, Shono M, Sasaki C, Nakamura Y. Alkaline peroxide pretreatment for efficient enzymatic saccharification of bamboo. *Carbohydr Polym*. 2010; 79(4):914–920.
17. Saha BC, Cotta MA. Enzymatic saccharification and fermentation of alkaline peroxide pretreated rice hulls to ethanol. *Enzyme Microb Technol*. 2007; 41(4):528–532.
18. Song Y, Wi SG, Kim HM, Bae H. Cellulosic bioethanol production from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) using hydrogen peroxide-acetic acid (HPAC) pretreatment. *Bioresour Technol*. 2016; 214:30-36.
19. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem*. 1956; 28(3):350–356.
20. Salcedo JG, López JE, Flórez LM. Evaluación de enzimas para la hidrólisis de residuos (hojas y cogollo) de la cosecha de caña de azúcar. *DYNA*. 2011; 78:182–190.
21. Bello Gil D, Carrera Bocourt E, Díaz Maqueira Y. Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. *ICIDCA Sobre los Deriv la Caña Azúcar*. 2006; 40(2):45–50.
22. Fajardo Castillo E, Sarmiento Forero S. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. [Tesis de pregrado]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2007.

23. Yu J, Zhang J, He J, Liu Z, Yu Z. Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. *Bioresour Technol.* 2009;100(2):903–908.
24. Brígida AIS, Calado VMA, Gonçalves LRB, Coelho MAZ. Effect of chemical treatments on properties of green coconut fiber. *Carbohydr Polym.* 2010; 79(4):832–838.
25. Saha BC, Cotta MA. Enzymatic hydrolysis and fermentation of lime pretreated wheat straw to ethanol. *J Chem Technol Biotechnol.* 2007; 82:913–919.
26. Talebnia F, Karakashev D, Angelidaki I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment , hydrolysis and fermentation. *Bioresour Technol.* 2010; 101(13):4744–4753.
27. Morales de la Rosa S. Hidrólisis ácida de celulosa y biomasa lignocelulósica asistida con líquidos iónicos. [Tesis doctoral]. Madrid:Universidad Autónoma de Madrid; 2015.
28. Carvalheiro F, Duarte LC, Gírio FM. Hemicellulose biorefineries : a review on biomass pretreatments. *J Sci Ind Res.* 2008; 67:849–864.
29. Wi SG, Cho EJ, Lee DS, Lee SJ, Lee YJ, Bae HJ. Lignocellulose conversion for biofuel: a new pretreatment greatly improves downstream biocatalytic hydrolysis of various lignocellulosic materials. *Biotechnol Biofuels.* 2015; 8:1–11.
30. Saha BC, Cotta MA. Ethanol Production from Alkaline Peroxide Pretreated Enzymatically Saccharified Wheat Straw. *Biotechnol Prog.* 2006; 22(2):449–53.
31. Yang B, Wyman CE. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuel Bioprod Biorefin.* 2008; 2(1):26–40.