

Obtención de un edulcorante funcional (celobiosa) a partir de *Gossypium hirsutum*, para uso de personas con hiperglicemia

Obtaining a functional sweetener (cellobiose) from *Gossypium hirsutum*, for use by people with hyperglycemia

Geanina Machuca Loja
Universidad Estatal de Milagro
geanijacqueline@gmail.com
ORCID: 0000-0002-6798-9074

Humberto Ayala Armijos
Universidad Técnica de Machala
jayala@utmachala.edu.ec
ORCID: 0000-0003-0148-4433

Joaquín Sigüenza Toledo
Universidad Técnica de Machala
jsiguenza@utmachala.edu.ec
ORCID: 0000-0003-4115-8878;

Carolina Beltran Balarezo
Universidad Técnica de Machala
cbeltran@utmachala.edu.ec
ORCID: 0000-0003-3525-1021 .

Gabriela Armijos Cabrera
Universidad Técnica de Machala
gvarmijos@utmachala.edu.ec
ORCID: 0000-0001-8391-3048

Revista de Biotecnología Vol.1 N°1

Versión electrónica

<https://investigacion.utmachala.edu.ec/revistas/index.php/biotecnologia>

RESUMEN

La estructura cristalina y amorfa de la celulosa en el algodón es el principal obstáculo para la extracción de azúcares prebióticos mediante procesos enzimáticos. El objetivo de esta investigación fue reducir la cristalinidad de la celulosa del algodón (125 μ m) aplicando pretratamientos hidrotermos y alcalinos e incrementando la producción de azúcares. Para incrementar la producción de azúcares fermentables, se preparó una solución al 4% de algodón molido y se sometió a un pretratamiento hidrotermal a 121°C por lapsos de tiempo (15, 30 y 45 minutos) y otro alcalino agregando hidróxido de sodio en tres concentraciones diferentes (0.5, 1 y 1.5%) y se agitó a 120 rpm por una hora, luego se ajustó a pH 4.8 y se adiciono 30 FPU de β -glucosidasa y se mantuvo agitado a 120 rpm por 144 horas. En los hidrolizados donde se aplicó pretratamiento hidrotérmico a 121°C por 45 minutos se logró 34.62 $\pm$ 0.14% de hidrólisis de celulosa a celobiosa y 5.14% $\pm$ 0.03% de hidrólisis de celulosa a glucosa al cabo de 24 horas de proceso, y en los hidrolizados donde fue pretratada con hidróxido de sodio al 0,5%, la celulosa se hidrolizó a celobiosa en 10.5 $\pm$ 0,04% y de celulosa a glucosa en 36,63 $\pm$ 0,27%, y luego de 48 horas de proceso. Los experimentos pretratados hidrotérmicamente a 121 °C durante 45 minutos alcanzaron un mayor porcentaje de hidrolisis parcial de la celulosa y los pretratados con 1,5 % de NaOH alcanzaron un mayor porcentaje de hidrolisis total de la celulosa del algodón. Por lo tanto, la aplicación de pretratamiento hidrotermal a la celulosa del algodón (125 μ m) aumenta en un 32.30% la hidrólisis parcial de la celulosa y el pretratamiento alcalino en un 6.07% de hidrólisis parcial con respecto al testigo, si existe diferencia significativa entre los dos pretratamientos aplicados para la producción de celobiosa.

Palabras clave: Algodón, celobiosa, hidrotermal, β -glucosidasa, celulosa.

ABSTRACT

The crystalline and amorphous structure of cellulose in cotton is the main obstacle to the extraction of prebiotic sugars by enzymatic processes. The objective of this research was to reduce the crystallinity of cotton cellulose (125 μ m) by applying hydrothermal and alkaline pretreatments and increasing the production of sugars. To increase the production of fermentable sugars, a 4% solution of ground cotton was prepared and subjected to a hydrothermal pretreatment at 121°C for periods of time (15, 30 and 45 minutes) and another alkaline by adding sodium hydroxide in three different concentrations (0.5, 1 and 1.5%) and was stirred at 120 rpm for one hour, then adjusted to pH 4.8 and 30 FPU of β -glucosidase was added and kept stirred at 120 rpm for 144 hours. In the hydrolysates where hydrothermal pretreatment was applied at 121°C for 45 minutes, 34.62 $\pm$ 0.14% of cellulose hydrolysis to cellobiose and 5.14% $\pm$ 0.03% of cellulose to glucose hydrolysis was achieved after 24 hours of the process, and in the hydrolyzed where it was pretreated

with 0.5% sodium hydroxide, the cellulose was hydrolyzed to cellobiose in $10.5 \pm 0.04\%$ and from cellulose to glucose in $36.63 \pm 0.27\%$, and after 48 hours of processing. The experiments pretreated hydrothermally at 121°C for 45 minutes reached a higher percentage of partial hydrolysis of the cellulose and those pretreated with 1.5% NaOH reached a higher percentage of total hydrolysis of the cotton cellulose. Therefore, the application of hydrothermal pretreatment to cotton cellulose ($125\ \mu\text{m}$) increases the partial hydrolysis of the cellulose by 32.30% and the alkaline pretreatment by 6.07% of partial hydrolysis with respect to the control, if there is a significant difference between the two pretreatments applied for cellobiose production.

Keywords: Cotton, cellobiose, hydrothermal, β -glucosidase, cellulose.

INTRODUCCIÓN

El algodón es una de las fibras naturales más aclamadas del género *Gossypium* compuesta por celulosa con unidades estructurales de 1,4-d-glucopiranosas, su composición es: celulosa 94%, proteínas 1.3%, pectina 0.9%, sales minerales 1.2%, ácidos orgánicos 0.8% y otros 1.8% (Hauser, 2015).

Las unidades de anhidroglucosa están unidas como beta-celobiosa; por lo tanto, la anhidro-beta-celobiosa es la unidad repetitiva de la cadena polimérica. El número de unidades repetidas unidas para formar el polímero de celulosa se denomina "grado de polimerización" (Adler et al., 2022).

La conversión enzimática de biomasa celulósica rica en celulosa a celobiosa gana atención debido a las aplicaciones prebióticas emergentes como alimentos funcionales (Chen et al., 2021).

La celobiosa es un edulcorante funcional sin calorías y un potencial aditivo saludable para alimentos y piensos. Este disacárido consta de dos moléculas de glucosa unidas por un enlace β -(1-4)-glucosídico, se diferencia de la maltosa por su configuración en el enlace glucosídico que puede ser α o β (Parisutham et al., 2017).

Los celo-oligacaridos (COS) son oligómeros con un grado de polimerización (GP) entre 3 y 10 y consisten en unidades de glucosilo conectadas por enlaces β -(1-4)-glucosídicos. El disacárido celobiosa y el COS con un GP de 3 a 6 son solubles en agua, pero no pueden ser digeridos por humanos (Ávila et al., 2021).

Los procesos para la síntesis enzimática de celobiosa a partir de celulosa requiere de pretratamientos alcalinos usando hidróxido de sodio para ablandar e inchar la molécula de celulosa, luego se debe ajustar el pH a 4.8 para la adición de las enzimas celulasas y mantener la temperatura a 50°C con agitación de 900 rpm y de esta manera ocurra la despolimerización incompleta de celulosa a celobiosa (Siccama et al., 2022). Las exoglucanasas hidrolizan los extremos de la cadena reductora o no reductora para producir celobiosa (Méndez-Líter et al., 2017).

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la obtención de celobiosa a partir de la celulosa presente en el algodón mediante hidrólisis enzimática utilizando β -glucosidasa producida por *Trichoderma reesei* ATCC 2692.

METODOLOGÍA

Materiales

El algodón objeto de estudio fueron recogidas en el cantón Huaquillas, parroquia Chacras, provincia de El Oro, Ecuador, se secaron y trituro hasta un tamaño de partícula de $\leq 125 \mu\text{m}$. Para la hidrólisis enzimática se utilizó enzima comercial Celluclast® 1.5L (188 FPU) de Sigma-Aldrich (Alemania), hidróxido de sodio de Sigma-Aldrich (St Louis, USA), celobiosa (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg - Alemania).

Métodos

Composición química del algodón

La determinación de celulosa presente en el algodón fue realizada según la metodología del Laboratorio Nacional de Energía Renovable (NREL) (Sluiter et al., 2012), las cenizas por termo gravimetría (Eliche et al., 2017) utilizando el espectrómetro Bruker-AXS modelo S4 Pioneer.

Cristalinidad de la celulosa del algodón

La cristalinidad relativa de la celulosa del algodón cruda y molida ($\leq 125 \mu\text{m}$), fueron analizadas por difracción de rayos. El análisis se realizó en un Espectrómetro de fluorescencia de rayos X (XRF) Bruker - AXS, modelo S4 Pioneer. La intensidad de difracción de la radiación Cu K α (longitud de onda de 0.154 nm, bajo condiciones de 40 kV y 40 mA) se midió con un rango de exploración entre 5° y 50° (2 θ) (Lou et al., 2013).

La cristalinidad relativa se la cálculo empleando la siguiente ecuación (Oliveira et al., 2017).

$$RC (\%) = \frac{Ac}{Ac - Aa} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde Ac es el área cristalina y Aa es el área amorfa en el área de los difractogramas de rayos X.

Pretratamiento de la celulosa del algodón

Para aumentar la superficie de contacto, reducir la cristalinidad relativa y disminuir la hidrorrepelencia de la celulosa del algodón, se trituro a tamaño de partícula de $\leq 125 \mu\text{m}$. Luego para ablandar a la celulosa, se preparó una solución de celulosa de algodón al 3% (m/v) y se aplicó dos pretratamientos:

hidrótermico a 121°C por tres lapsos de tiempo (15, 30 y 45 minutos) e hidróxido de sodio en tres concentraciones diferentes (0.5, 1 y 1.5%) y se agito a 300 rpm durante una hora (Huang et al., 2018).

Cuantificación de celobiosa

Para cuantificar la celobiosa, resultantes de la hidrólisis enzimática parcial de la celulosa del algodón previamente pretratadas hidrotermicamente a 121°C por tres lapsos de tiempo diferentes (15, 30 y 45 minutos) y alcalino con NaOH en tres concentraciones diferentes (0.5, 1 y 1.5%), se tomaron muestras en un tubo eppendorf de 1.5 mL y centrifugaron a 10000 rpm por 5 minutos, luego filtraron utilizando un filtro jeringa de 0.22 µm y se almacenaron en viales para el análisis por HPLC. A continuación, se analizaron los patrones de calibración y las muestras con un HPLC (Agilent 1100, Alemania) equipado con un detector de índice de refracción (G-1362A XR RI). Se empleó una columna SUPERCOGEL C-610H. La temperatura de la columna se fijó a 50°C, para la fase móvil se utilizó H₂SO₄ a concentración 5 mM a un caudal de 0,6 mL / min y un tiempo de corrida de 35 minutos (Sluiter et al., 2012).

Hidrólisis enzimática parcial de la celulosa

Después del pretratamiento hidrótermico y alcalino, la hidrólisis enzimática parcial de la celulosa de algodón (125 µm) se llevó a cabo en viales de 120 mL para lo cual se prepara una solución de celulosa al 4% (p/v), se ajustó el pH (4.8) en las muestras pretratadas con álcalis se añadió ácido clorhídrico al 20% (v/v), luego se adiciono la enzima Celluclast 1.5L (β- glucosidasa) a 30 FPU/g carbohidratos y se colocaron en un agitador orbital a 50°C y 300 rpm durante 72 horas (Kumar et al., 2019). Se tomaron muestras cada 24 horas, se centrifugaron durante 5 minutos a 10000 rpm usando una mini centrífuga ELMI-Sky Line y se filtraron en filtro de jeringa de 0.22 µm (Millipore, Bedford, MA). La producción de celobiosa se cuantifico por HPLC.

El rendimiento porcentual de celobiosa se lo calculo mediante la fórmula que a continuación se detalla (Resch et al., 2015).

$$\% \text{ de conversión} = \frac{\left(\frac{\text{mg azúcar}}{\text{ml}} \right) \times 1.4 \text{ ml} \times H}{\left(\frac{\text{mg polisacáridos}}{\text{g biomasa}} \right) \times 0.014 \text{ g biomasa}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde

H = factor de hidrólisis específico para cada combinación polisacárido/azúcar

mg/ml de azúcar es de análisis de HPLC

g de polisacárido / g de biomasa proviene del análisis de composición.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición proximal del algodón

Conocer la composición química del algodón es un requisito esencial para saber la cantidad de celulosa disponible para hidrolizarse a celobiosa y glucosa. A continuación, en la tabla 1 se muestra la composición proximal de esta biomasa.

Tabla 1. Análisis composicional y próximo del algodón

Componentes	%	±
Celulosa	93,03	0,31
Pectina	1,04	0,43
Proteínas	1,5	0,308
Cenizas	1,41	0,46
Humedad	3,02	0,161

La celulosa del algodón es el principal componente hidrolizable, por lo cual se dispone de 93% para la obtención celobiosa. Investigaciones similares sobre la caracterización del algodón reportan concentraciones 73% de celulosa, proteína 1.3% y pectina 1,2% en base seca (Rashid & Dutta, 2020).

Cristalinidad relativa del algodón

La fracción cristalina de la celulosa es la mayor resistencia que tiene este compuesto al hidrólisis enzimática. Los difractogramas de rayos X por altura de pico realizados al algodón crudo y molido (125 μm) se muestran en la Fig. 1. El algodón crudo mostro picos a $2\theta = 22.2^\circ$ y 16.7° y el algodón molido mostro los picos a $2\theta = 21.9^\circ$ y 17.4° , ángulos de difracción característicos de este tipo de biomasa. El algodón crudo presento 27% más de cristalinidad relativa que el algodón molido ($\leq 125 \mu\text{m}$). La literatura reporta que a tamaños de partícula $\leq 250 \mu\text{m}$, la cristalinidad de la biomasa se reduce alrededor del 50% y la liberación de celobiosa y glucosa aumenta entre el 24 - 36% (Rashid & Dutta, 2020).

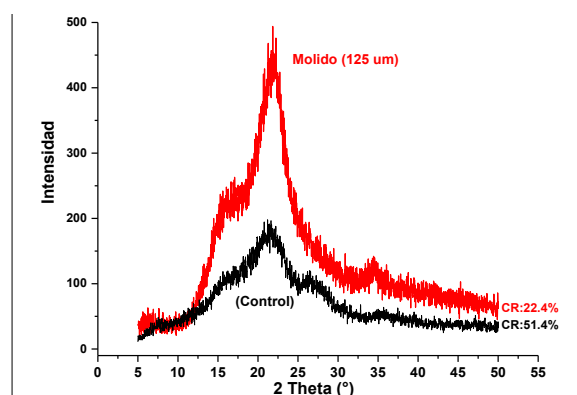


Figura. 1. Porcentaje de cristalinidad relativa: (A) algodón crudo y (B) molida (125 μm)

La cristalinidad relativa del algodón molido (125 μm) disminuyó con respecto al algodón crudo en un 29% y se eliminó la hidrorrepelencia del algodón crudo. Investigaciones realizadas con este material indican que al reducir el tamaño de partícula ($< 400 \mu\text{m}$), se reduce la cristalinidad de la celulosa y aumentan los porcentajes hidrólisis (Lopes et al., 2022).

Hidrólisis enzimática del algodón

Hidrólisis parcial de celulosa

La hidrólisis completa de la celulosa es uno de los principales obstáculos de la tecnología de la biomasa, cuando este homopolisacárido forma parte de matrices complejas, gran parte de él se hidroliza a celodextrinas (celobiosa). La celobiosa es un disacárido que se obtiene de la hidrólisis parcial de la celulosa utilizando β -glucosidasas. A continuación, en la figura 2 se muestran las concentraciones de celobiosa y glucosa obtenidos de la hidrólisis del algodón molido (125 μm).

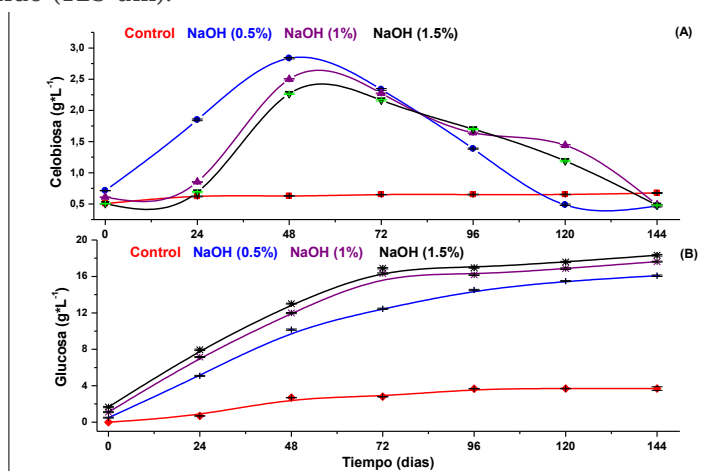


Figura 2. Formación de celobiosa y glucosa durante la hidrólisis enzimática del algodón

La aplicación de hidróxido de sodio (0.5%) como pretratamiento de ablandamiento de la celulosa produjo a las 48 horas de hidrólisis enzimática mayor concentración de celobiosa y menor cantidad de glucosa, y a mayor concentración de hidróxido de sodio (1.5%) menor cantidad de celobiosa y mayor concentración de glucosa, lo cual indica que el pretratamiento alcalino favorece la hidrólisis enzimática de celulosa a glucosa. El 10,14% de la celulosa se hidrolizó parcialmente a celobiosa y el 46,63% a glucosa, obteniéndose un 56,77% de hidrólisis total de la celulosa presente en el algodón.

Estudios de hidrólisis enzimática de fibra de coco reportan 72 g/L de glucosa utilizando una carga enzimática de 20 FPU de Cellic Ctec 2 (Wu, Hildebrand, Kasuga, Xiong, & Fan, 2013; Lebaz, Cockx, Spérandio, Liné, & Morchain, 2016), y 78,9 % de hidrólisis de celulosa a glucosa (Nogueira et al., 2021).

En las muestras donde se aplicó pretratamiento hidrótermico, se logró obtener mayores concentraciones de celobiosa, lo cual indica que solo se logró hinchar la celulosa mas no romperla. A continuación, en la figura 3 se muestran las concentraciones de celobiosa y glucosas obtenidos en las muestras pretratadas hidrotérmicamente.

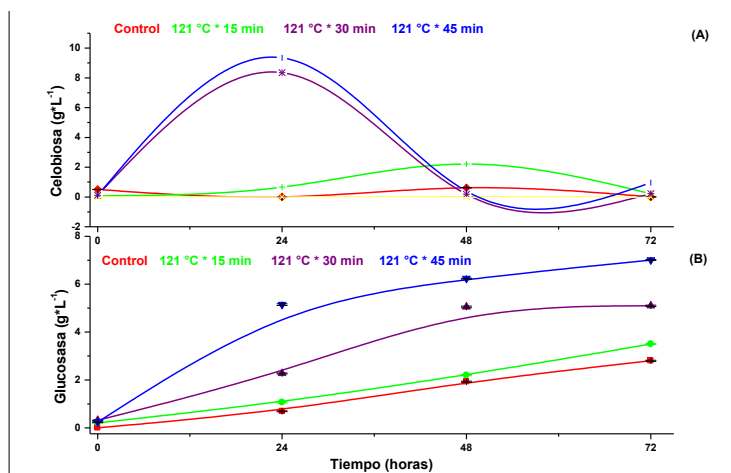


Figura 3. Formación de celobiosa y glucosa durante la hidrólisis enzimática del algodón pretratado hidrotérmicamente

La aplicación de temperatura (121°C * 45 min) como pretratamiento de ablandamiento de la celulosa produjo a las 24 horas de hidrólisis enzimática mayor concentración de celobiosa y menor cantidad de glucosa, y a menor tiempo de pretratamiento hidrótermico (121°C * 15 min), menor cantidad de celobiosa y menor concentración de glucosa, lo cual indica que el pretratamiento hidrotérmico favorece la hidrólisis enzimática de celulosa a celobiosa. El 34.62% de la celulosa se hidrolizo parcialmente a celobiosa y el 18.42% a glucosa, obteniéndose un 51,89% de hidrólisis total de la celulosa presente en el algodón. Estudios sobre biomasa lignocelulosica utilizando beta glucosidasa es posible obtener porcentajes de hidrolisis significativos de celobiosa (Parisutham et al., 2017)

Porcentajes de hidrolisis del algodón a celobiosa y glucosa

La hidrólisis total de la celulosa ha sido una característica clave de la despolimerización de biomasa celulósica, debido a la recalcitrancia y cristalinidad de la celulosa, lo cual limita el uso de enzimas hidrolíticas (celodextrinasa y celobiohidrolasa y β -glucosidasa). A continuación, en la figura 4 se muestran los porcentajes de hidrólisis parcial de la celulosa para obtener celobiosa y glucosa a partir del algodón molido (125 μ m).

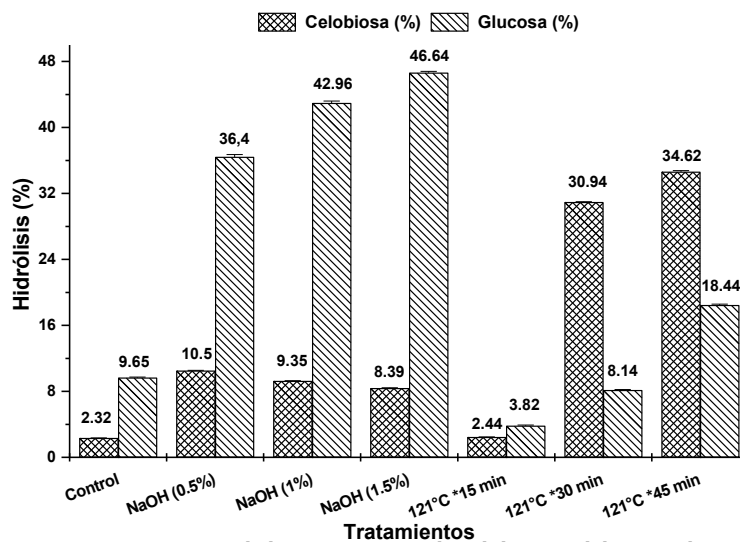


Figura 4. Porcentajes de bioconversiones de celulosa a celobiosa y glucosa

La bioconversión de celulosa a celobiosa en los pretratamientos hidroter-micos ($121^{\circ}\text{C} \times 45 \text{ min}$) fue 34,62% en 24 horas de hidrólisis enzimática y la conversión de celulosa a glucosa fue de 18.64%, mientras que en las muestras pretratadas con hidróxido de sodio al 0.5%, la concentración de celobiosa fue 10.5% en 48 horas de hidrólisis enzimática, lo cual indica que a mayor concentración de álcalis mayor hidrólisis total de la celulosa. Estudios de hidrólisis enzimática de algodón blanco molido aplicando Celluclast y Cellic® CTec2 han logrado convertir un 32% de celulosa a celobiosa (Austad, 2018).

CONCLUSIONES

La caracterización química del algodón nos indica que disponemos de un 93% celulosa para ser utilizada como sustrato para la enzima β - glucosidasa. El análisis de difracción de rayos X demostró que la reducción de tamaño de partícula ($\leq 125 \mu\text{m}$), ayuda a reducir hasta un 43.57% de cristalinidad relativa del algodón molido con respecto al algodón crudo.

La aplicación del pretratamiento hidrótermico (121°C por 45 minutos) al algodón molido a tamaño de partícula de $125 \mu\text{m}$, favorece la hidrólisis parcial de la celulosa, y se logra obtener un 34.62% de celobiosa, mientras que la aplicación de hidróxido de sodio a concentración de 0.5% se logra obtener un 10.5% de celobiosa, lo cual indica que la mayor parte de la celulosa se hidroliza totalmente a glucosa, lo que indica a mayor concentración de hidróxido de sodio, menor concentración de celobiosa y mayor concentración de glucosa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler, A., Kumaniaev, I., Karacic, A., Baddigam, K. R., Hanes, R. J., Subbotina, E., Bartling, A. W., Huertas-Alonso, A. J., Moreno, A., Håkansson, H., Mathew, A. P., Beckham, G. T., & Samec, J. S. M. (2022). Lignin-first biorefining of Nordic poplar to produce cellulose fibers could displace cotton production on agricultural lands. *Joule*, 6(8), 1845-1858. <https://doi.org/10.1016/j.joule.2022.06.021>
- Austad, A. (2018). Enzymatic Conversion of Cotton Textiles. *Master's thesis, Norwegian University of Life Sciences, Ås*.
- Ávila, P. F., Silva, M. F., Martins, M., & Goldbeck, R. (2021). Cello-oligosaccharides production from lignocellulosic biomass and their emerging prebiotic applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(5), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03041-2>
- Chen, P., Shrotri, A., & Fukuoka, A. (2021). Synthesis of cello-oligosaccharides by depolymerization of cellulose: A review. *Applied Catalysis A: General*, 621(April), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2021.118177>
- Eliche, D., Felipe, M. A., Lopez, J. A., & Infantes, A. (2017). Characterization and evaluation of rice husk ash and wood ash in sustainable clay matrix bricks. *Ceramics International*, 43(1), 463-475. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.09.181>
- Huang, G., Peng, W., Yang, S., & Yang, C. (2018). Delignification kinetic modeling of NH₄OH-KOH-AQ pulping for bagasse. *Industrial Crops and Products*, 123(April), 740-745. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.040>
- Kumar, A., Park, G. D., Patel, S. K. S., Kondaveeti, S., Otari, S., Anwar, M. Z., Kalia, V. C., Singh, Y., Kim, S. C., Cho, B. K., Sohn, J. H., Kim, D. R., Kang, Y. C., & Lee, J. K. (2019). SiO₂ microparticles with carbon nanotube-derived mesopores as an efficient support for enzyme immobilization. *Chemical Engineering Journal*, 359(October 2018), 1252-1264. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.11.052>
- Lopes, C. da S., Rigoli, I. C., Rovere, C. A. D., Rocha, C. L. F. d., & Souza, C. A. C. d. (2022). Electrodeposition and the properties of a Zn-Cotton nanocrystal composite coating. *Journal of Materials Research and Technology*, 17, 852-864. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2022.01.016>
- Lou, H., Wang, M., Lai, H., Lin, X., Zhou, M., Yang, D., & Qiu, X. (2013). Reducing non-productive adsorption of cellulase and enhancing enzymatic hydrolysis of lignocelluloses by noncovalent modification of lignin with lignosulfonate. *Bioresource Technology*, 146, 478-484. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.115>
- Méndez-Líter, J. A., Gil-Muñoz, J., Nieto-Domínguez, M., Barriuso, J., De Eugenio, L. I., & Martínez, M. J. (2017). A novel, highly efficient β -glucosidase with a cellulose-binding domain: Characterization and properties of native and recombinant proteins. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0946-2>

- Nogueira, C. da C., Padilha, C. E. de A., & Santos, E. S. dos. (2021). Boosting second-generation ethanol titers from green coconut fiber by using high-concentration polyethylene glycol. *Industrial Crops and Products*, 166(January), 113494. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113494>
- Oliveira, J. P. de, Bruni, G. P., Lima, K. O., Halal, S. L. M. El, Rosa, G. S. da, Dias, A. R. G., & Zavareze, E. da R. (2017). Cellulose fibers extracted from rice and oat husks and their application in hydrogel. *Food Chemistry*, 221, 153-160. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.048>
- Parisutham, V., Chandran, S. P., Mukhopadhyay, A., Lee, S. K., & Keasling, J. D. (2017). Intracellular cellobiose metabolism and its applications in lignocellulose-based biorefineries. *Bioresource Technology*, 239, 496-506. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.001>
- Proto, M., Supino, S., & Malandrino, O. (2000). Cotton: A flow cycle to exploit. *Industrial Crops and Products*, 11(2-3), 173-178. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(99\)00060-6](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(99)00060-6)
- Rashid, S., & Dutta, H. (2020). Characterization of nanocellulose extracted from short, medium and long grain rice husks. *Industrial Crops and Products*, 154(May), 112627. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112627>
- Resch, M. G., Baker, J. O., & Nrel, S. R. D. (2015). Low Solids Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass Low Solids Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP). *Nrel, February*.
- Siccama, J. W., Oudejans, R., Zhang, L., Kabel, M. A., & Schutyser, M. A. I. (2022). Steering the formation of cellobiose and oligosaccharides during enzymatic hydrolysis of asparagus fibre. *Lwt*, 160(November 2021), 113273. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113273>
- Sluiter, a., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. (2012). NREL/TP-510-42618 analytical procedure - Determination of structural carbohydrates and lignin in Biomass. *Laboratory Analytical Procedure (LAP), April 2008*, 17. <https://doi.org/NREL/TP-510-42618>
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. (2012). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP) (NREL/TP-510-42618). *National Renewable Energy Laboratory (NREL)*, April 2008, 17. <https://doi.org/NREL/TP-510-42618>
- Wu, W., Hildebrand, A., Kasuga, T., Xiong, X., & Fan, Z. (2013). Enzyme and Microbial Technology Direct cellobiose production from cellulose using sextuple beta -glucosidase gene deletion *Neurospora crassa* mutants. *Enzyme and Microbial Technology*, 52(3), 184-189. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2012.12.010>

