



Uso de residuos forestales municipales para la obtención de bioplásticos: la dosis de enzima como parámetro clave

A. D. Moreno García, C. Álvarez Vaquerizo, M. J. Negro Álvarez, J. M. Oliva Domínguez, R. Iglesias Esteban e I. Ballesteros Perdices
Unidad de Biocarburos Avanzados y Bioproductos, departamento de Energía de CIEMAT

Los plásticos derivados del petróleo han contribuido al desarrollo económico de nuestra sociedad. No obstante, la creciente concienciación pública sobre la sostenibilidad medioambiental supone un motor de transición para la integración de nuevos enfoques de producción de plásticos de origen biológico en un contexto de Bioeconomía circular.

PALABRAS CLAVE: Bioplásticos; Residuos de Poda Urbana; Biorrefinerías; Bacterias Lácticas.

Petroleum-based plastics have contributed to the economic development of our society. However, the growing public awareness of environmental sustainability is a transitional driver for the integration of new production approaches for bio-based plastics in a circular Bioeconomy context.

KEYWORDS: Bioplastics; Urban Pruning Waste; Biorefineries; Lactic Bacteria.

INTRODUCCIÓN

Gracias a propiedades como su bajo coste, su capacidad de reciclado, peso ligero y una larga vida útil, el uso del plástico se ha extendido de forma exponencial en las últimas décadas en todos los sectores, ejerciendo un impacto significativo en nuestra economía y sociedad actual. Con una continua tendencia al alza, en 2022 la cantidad de plásticos derivados del petróleo ascendió a 362 millones de toneladas, representando el 90% de la producción total [1].

Asimismo, el desarrollo de nuevas aplicaciones de estos polímeros y la modernización de las economías emergentes, hacen prever un continuo aumento en esta producción durante los próximos años. A pesar del esfuerzo reciente por aumentar el reciclaje de plásticos y disminuir la cantidad depositada en vertederos, las cifras relativas a estas cuestiones aún se sitúan en valores muy mejorables, destinándose solamente el 27 % de los plásticos a un proceso de reciclaje, mientras que otro 25 % aún termina en vertederos [2].

Ante los problemas de contaminación del aire y agua asociados a la generación de microplásticos por la persistencia de estos compuestos en el medioambiente, se necesita llevar a cabo una transición verde hacia la integración de nuevos productos de menor impacto medioambiental.

Como alternativa a los plásticos sintéticos, la obtención de plásticos biodegradables a través de procesos biotecnológicos representa una alternativa muy interesante para la integración de estos polímeros en la bioeconomía circular, ya que su producción consume un 65% menos de energía y reducen las emisiones de CO₂ y la huella de carbono en un 30-70 % y un 42 %, respectivamente [3].

A este respecto, la Comisión Europea, y a su vez España, han adoptado y desarrollado diversas políticas sobre el uso de bioplásticos para integrar estos productos en el mercado. No obstante, la producción actual de bioplásticos representa un porcentaje inferior al 1 % de la producción global. Entre los diferentes bioplásticos desarrollados, el ácido poliláctico (PLA) se sitúa entre los más prometedores debido a sus propiedades mecánicas, su buena procesabilidad y su menor impacto ambiental. Las principales aplicaciones de este polímero son la fabricación de envases, vasos desechables biodegradables, bolsas de té, platos, botellas y cubiertos desechables. Además, se están llevando a cabo numerosos estudios sobre la fabricación de dispositivos protésicos basados en PLA, suturas quirúrgicas y sistemas controlados de administración de fármacos en humanos, dadas las características biocompatibles del PLA [4]. El PLA es un polímero formado por unidades de ácido láctico (LA).

Entre las opciones para obtener este componente, la ruta de producción biotecnológica mediante la conversión microbiana de materias primas azucaradas ofrece ciertas ventajas frente a la síntesis química (por ej., la posibilidad de obtener ácido láctico con un alto grado en pureza óptica o la posibilidad de utilizar materias primas de carácter residual).

Durante el proceso de producción de LA, el coste de la materia prima supone uno de los factores que más influyen en el precio final. Además, los recursos más utilizados en estos procesos son las materias primas ricas

en almidón, entrando en competencia directa con el mercado alimentario. Resulta por tanto imperativo buscar materias primas alternativas de bajo coste y que no compitan con el sector de la alimentación.

Los residuos forestales municipales (RFM) generados durante las labores de poda y mantenimiento de jardines en las ciudades, ofrecen una opción de bajo coste con alto potencial para la obtención de bioplásticos debido a su alto contenido en azúcares estructurales. Los RFM se destinan, por lo general, como materia prima para la producción de compost o material bioestabilizado, que tiene un valor agregado bajo y un mercado muy pequeño. Por el contrario, el uso de los RFM como materia prima para la obtención de PLA podría suponer un impulso hacia la implementación de las conocidas como biorrefinerías urbanas bajo el marco de la bioeconomía circular.

Debido a su naturaleza lignocelulósica, los residuos RFM presentan una estructura muy compleja que dificulta el aprovechamiento de los azúcares contenidos en estos materiales. Los procesos de conversión de la biomasa lignocelulósica requieren de una etapa de pretratamiento e hidrólisis enzimática previo a los procesos fermentativos. El pretratamiento tiene como objetivo garantizar el acceso de las enzimas hidrolíticas a los carbohidratos para permitir la recuperación de los azúcares fermentables durante la etapa de hidrólisis enzimática posterior.

Para llevar a cabo una hidrólisis enzimática eficiente y maximizar los rendimientos de conversión, la optimización de parámetros como la dosis de enzima y la carga de sólidos que permitan obtener mayores concentraciones de azúcar resulta crucial [5].

El presente trabajo tiene como objetivo estudiar el proceso de hidrólisis enzimática a altas cargas de sólidos utilizando como materia prima el RFM pretratado mediante explosión por vapor a fin de optimizar la dosis de enzima requerida durante esta etapa (Figura 1). Para esta evaluación se han tenido en cuenta aspectos como la concentración de azúcares totales recuperados, los rendimientos de conversión, así como el tiempo de proceso requerido para alcanzar la concentración máxima de azúcar.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIA PRIMA Y PRETRATAMIENTO

Los residuos procedentes de la poda de parques y jardines de la ciudad de Madrid y recogidos por la planta de compostaje Migas Calientes (Madrid, España) se emplearon como materia prima en este trabajo. Tras su recogida, los RFM fueron triturados hasta un tamaño de partícula de <10 mm.

A continuación, se transportaron al CIEMAT para su análisis composicional y pretratamiento. La composición inicial de la biomasa presentaba la siguiente relación (g/100 g biomasa): 33,1 ± 0,5 glucanos; 12,8 ± 0,3 xilanos; 4,0 ± 0,5 otros carbohidratos (galactanos, arabinanos y mananos);

FIGURA 1. Esquema representativo para el procesamiento de los residuos forestales municipales (RFM) estudiado en el presente trabajo



» Los Residuos Forestales Municipales constituyen una materia prima muy prometedora para la obtención de bioplásticos en un marco de bioeconomía circular

4,7 ± 0,3 grupos acetilos; 26,5 ± 0,5 lignina; 2,4 ± 0,2 cenizas.

El pretratamiento de la materia prima se llevó a cabo mediante explosión por vapor en una planta piloto equipada con un reactor de 10 L. Teniendo en cuenta estudios preliminares, las condiciones seleccionadas para el pretratamiento por explosión por vapor fueron 200° C, 8 min de tiempo de residencia y 30 mg de H₂SO₄/g de RFM. Tras el pretratamiento, una parte del material se filtró a vacío para separar la fracción líquida de la fracción sólida con el objetivo de analizar la composición de ambas fracciones como se detalla en el apartado 2.3.

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL RESIDUO PRETRATADO

El material pretratado completo se sometió a hidrólisis enzimática utilizando un reactor Infors HT Terrafor de 12 L, diseñado específicamente para el trabajo a altas cargas de sólidos. La hidrólisis enzimática se llevó a cabo a 50° C, y pH 5 (tampón citrato) utilizando la preparación enzimática 'Cellulase, enzyme blend' (220 mg proteína/mL; Merck, Alemania, conocida también como Cellic CTec2 y anteriormente distribuida por Novozymes). Para optimizar la etapa de hidrólisis a altas cargas, se llevó a cabo un estudio de dosis-respuesta con un rango de dosis de enzima de 10 a 60 mg de proteína/g glucano.

Como control, para evaluar la efectividad del pretratamiento, una parte del material pretratado completo se filtró y se lavó para recuperar la fracción insoluble en agua. Esta fracción se diluyó al 5 % (p/p) de sólidos totales en matraces de 100 mL y se sometió a hidrólisis enzimática durante 72

h con 20 mg de proteína/g glucano de la preparación Cellic CTec 2, bajo condiciones de pH 5 (tampón citrato), 150 rpm y 50° C. A título comparativo, este sólido lavado también se sometió a hidrólisis enzimática a una concentración del 10 % y 20 % (p/p) utilizando el reactor y las condiciones antes mencionadas.

MÉTODOS ANALÍTICOS Y CÁLCULOS

La materia prima y la biomasa pretratada se sometieron a un análisis composicional, siguiendo los protocolos establecidos por el Laboratorio Nacional de Energías Renovables (NREL) de EE.UU [6]. El análisis composicional se realizó mediante un procedimiento de hidrólisis ácida en dos etapas. Por un lado, los carbohidratos y la lignina ácido insoluble se determinaron en la fracción líquida, mientras que el contenido en lignina ácido insoluble (asimilable a la lignina Klason) se analizó mediante gravimetría, determinando el residuo orgánico insoluble resultante del ataque ácido de la muestra (restando el contenido en cenizas ácido insoluble obtenido tras la calcinación a 575 °C de este residuo), y el contenido en cenizas se determinó tras un proceso de calcinación a 575 °C, respectivamente.

Los azúcares (glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa y manosa) y los ácidos orgánicos (ácido acético y ácido fórmico) se identificaron y cuantificaron por HPLC/IR mientras que los furanos (furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido furóico) y los compuestos fenólicos (vainillina, siringaldehído, coniferaldehído, ácido p-hidroxibenzoico) presentes en la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento se analizaron por HPLC/UV. Estos análisis cromatográficos se

han llevado a cabo según los protocolos descritos por Álvarez y col [7].

Los rendimientos de sacarificación se determinaron de acuerdo con la ecuación:

$$\text{Conversión}_{\text{glucanos}} (\%) = \frac{\text{Glucosa}_{\text{producida}} (\text{g/L})}{\text{Glucosa}_{\text{potencial}} (\text{g/L})} \times 100$$

siendo la concentración de glucosa producida aquella resultante tras sustraer la cantidad de glucosa aportada por la preparación enzimática y/o el material pretratado, y la glucosa potencial la concentración máxima que se puede liberar teniendo en cuenta el contenido de celulosa correspondiente. Los ensayos se realizaron por triplicado, representándose los valores medios obtenidos junto a sus valores respectivos de desviación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EFFECTO DEL PRETRATAMIENTO POR EXPLOSIÓN POR VAPOR EN LOS RESIDUOS DE PODA

El pretratamiento mediante explosión por vapor se ha aplicado a numerosos tipos de biomasa de naturaleza lignocelulósica, incluyendo herbáceas, maderas duras y blandas, residuos agrícolas, etc. [8]. El presente estudio utiliza como materia prima los residuos RFM procedentes de poda de jardines. A pesar de su naturaleza lignocelulósica, los RFM son una biomasa heterogénea, por lo que es importante evaluar el comportamiento de esta tecnología de pretratamiento en estos residuos.

En las condiciones de pretratamiento ensayadas (200° C, 8 min, 30 mg H₂SO₄/g biomasa), el residuo pretratado resultante presentó una cantidad de sólidos totales del 20,5 %, siendo un 12,1 % y un 8,4 % los sólidos insolubles y solubles, respectivamente. Tal y como se puede observar en la Tabla 1, tras el pretratamiento, el contenido relativo de glucanos y lignina en el residuo sólido pretratado incrementó del 33,1 % y 26,5 % al 46,4 % y 47,3 %, respectivamente.

Este resultado está motivado principalmente por la solubilización de los azúcares hemicelulósicos, los cuales se

TABLA 1.

ANÁLISIS COMPOSICIONAL DEL RESIDUO FORESTAL MUNICIPAL (RFM) PRETRATADO MEDIANTE EXPLOSIÓN POR VAPOR

Fracción sólida	
Componente	g / 100g
Glucanos	46,4 ± 0,6
Hemicelulosa	
Xilanos	2,4 ± 0,2
Galactanos	0,2 ± 0,1
Arabinanos	< 0,1
Mananos	< 0,1
Lignina	47,3 ± 0,7
Cenizas	1,6 ± 0,2
Fracción líquida	
Componente	g / L
Azúcares:	
Glucosa	12,4 ± 0,2
Xilosa	24,5 ± 0,4
Galactosa	5,7 ± 0,1
Arabinosa	3,5 ± 0,1
Manosa	2,4 ± 0,1
Ácidos orgánicos:	
Ácido acético	9,0 ± 0,5
Ácido fórmico	1,4 ± 0,3
Furanos:	
Furfural	3,5 ± 0,5
5-hidroximetilfurfural	1,3 ± 0,3
Ácido furoico	0,03 ± 0,01
Fenoles	
Vainillina	0,03 ± 0,01
Siringaldehído	0,07 ± 0,02
Ácido hidroxibenzoico	0,08 ± 0,01
Coniferaldehído	0,02 ± 0,01

recuperan en la fracción líquida, siendo la xilosa el azúcar más concentrado ($24,5 \pm 0,4$ g/L). La solubilización de las hemicelulósicas tras el pretratamiento mediante explosión por vapor se ha reportado con anterioridad en otras biomásas como las maderas duras y/o los residuos agrícolas (álamo, abedul, paja de cereal, rastrojo de maíz, etc.) [8].

Este resultado se debe principal-

mente al efecto químico de autohidrólisis que tiene lugar durante este pretratamiento. Al aumentar la temperatura, el agua aumenta su grado de disociación, disminuyendo ligeramente el pH y favoreciendo la hidrólisis de los grupos acetilo. Este efecto permite disminuir aún más dicho pH, fomentando la ruptura de los enlaces glucosídicos de las hemicelulosas.

Es importante destacar que las maderas blandas como las coníferas (pino, abetos, cipreses, enebros, etc.) presentan un contenido bajo en grupos acetilo, por lo que la adición de un catalizador ácido resulta imprescindible para garantizar la efectividad del proceso [9]. Dada su heterogeneidad, los residuos RFM procedentes de la poda de jardines de la ciudad de Ma-

» La optimización de la dosis enzima al trabajar con altas concentraciones de sólidos totales es fundamental para una recuperación eficiente de los azúcares estructurales

dríd pueden incluir una cierta cantidad de maderas blandas, haciendo necesaria la adición de un catalizador ácido durante el proceso de pretratamiento.

En este trabajo, la adición de 30 mg de H₂SO₄/g RFM ha mostrado ser muy efectiva, permitiendo reducir el contenido de hemicelulosas en la fracción soluble hasta un porcentaje inferior al 3 %.

Además de los azúcares, en la fracción líquida pretratada también se pudieron identificar ciertos ácidos orgánicos, derivados del furano y distintos compuestos fenólicos (Tabla 1). Estos compuestos surgen como resultado de la degradación de los componentes estructurales por efecto de las condiciones severas a las que se somete a la materia prima durante el pretratamiento y pueden ejercer un poder inhibitorio durante las etapas posteriores de hidrólisis y fermentación.

OPTIMIZACIÓN DE LA ETAPA DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN LOS RESIDUOS PRETRATADOS

La optimización de la dosis de enzima resulta fundamental para minimizar el impacto de este parámetro en los costes finales de proceso. A pesar de las mejoras incorporadas en las nuevas preparaciones celulolíticas, los costes de las enzimas aún se consideran una importante barrera para la utilización de la biomasa lignocelulósica [10].

En el presente trabajo, el RFM pretratado por explosión por vapor se ha sometido a hidrólisis enzimática variando la dosis de enzima en un rango entre 10 y 60 mg proteína/g glucano. Como se puede observar en la Figura 2A, la cantidad de azúcares totales tras el proceso de sacarificación aumenta en un 50 % tras aumentar la dosis de enzima de 10 a 60 mg proteína/g glucano.

Por otro lado, el porcentaje de conversión de glucanos se duplica, aumen-

tando del 40 % hasta valores superiores del 80 % del teórico. Hay que destacar que el aumento de la carga de enzima de 40 a 60 mg proteína/g glucano no produce un aumento significativo de la concentración final de azúcares (104 g/L vs. 108 g/L) ni de los rendimientos de conversión (83 % vs. 85 %).

Por otro lado, estos parámetros aumentaron de 90 g/L y 62 % a 104 g/L y 83 % al aumentar la dosis de enzima de 20 a 40 mg proteína/g glucano. De acuerdo con estos resultados, la dosis de enzima recomendada para trabajar bajo estas condiciones de proceso serían 40 mg proteína/g glucano.

Trabajar a altas cargas es crucial para garantizar concentraciones elevadas de azúcar en los hidrolizados resultantes y, en consecuencia, altas concentraciones del producto de interés [5]. El aumento en la concentración del material pretra-

tado resulta, sin embargo, en menores rendimientos de conversión. Al utilizar el RFM pretratado completo a altas cargas (aprox. 20 % p/p) y una dosis baja de enzima (10 mg proteína/g glucano), los rendimientos disminuyen hasta valores inferiores al 40 % (Figura 2B), justificando la necesidad de aumentar la dosis.

En condiciones estándar con una concentración de sólidos totales del 5 % (p/p), la hidrólisis enzimática del sólido insoluble pretratado reportó valores de conversión de glucosa cercanos al 90 %. Esto se puede viusalizar en la página siguiente (Tabla 2). Estos resultados son indicativos de la efectividad de las condiciones de pretratamiento seleccionadas. A su vez, al aumentar la concentración de los sólidos insolubles al 10 % (p/p) y al 20 % (p/p), los rendimientos disminuyeron hasta el 77,8 % y el 75,8 % utilizando la misma dosis de enzima (20 mg proteína/g glucano).

Estos rendimientos aumentaron hasta valores cercanos al 80 % y al 90 % al incrementar la dosis de enzima a 40 y 60 mg proteína/g glucano, respectivamente. Un aspecto importante que destacar son los mejores rendimientos de con-

FIGURA 2. Hidrólisis enzimática del residuo forestal municipal (RFM) con la enzima Cellic CTec2 a diferentes dosis. A) Contenido en azúcares totales y B) rendimiento de HE

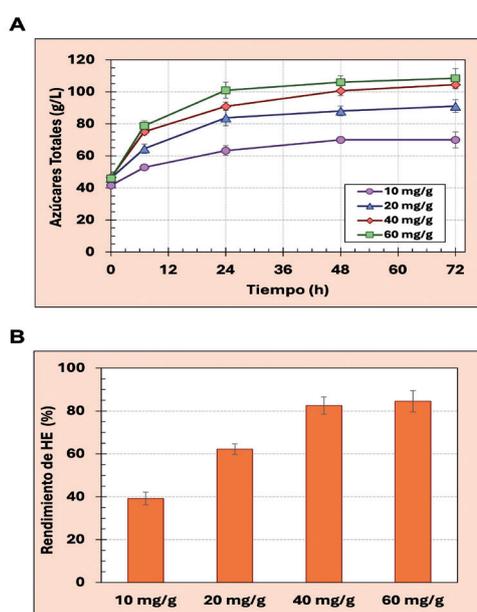


TABLA 2.

RENDIMIENTOS DE CONVERSIÓN DE LA FRACCIÓN DE SÓLIDOS INSOLUBLES A DIFERENTES CONCENTRACIONES Y DOSIS DE ENZIMA

Sólidos Totales	Rendimiento de HE
20 mg proteína / g glucano	
5 % (p/p) ^a	88,4 ± 3,5
10 % (p/p)	77,8 ± 2,8
20 % (p/p)	75,8 ± 2,1
40 mg proteína / g glucano	
10 % (p/p)	83,8 ± 2,4
20 % (p/p)	79,0 ± 3,2
60 mg proteína / g glucano	
10 % (p/p)	92,4 ± 4,0
20 % (p/p)	88,6 ± 2,1
^a Condiciones estándar "HE, hidrólisis enzimática"	

versión observados al utilizar los sólidos insolubles pretratados (obtenidos tras una etapa de lavado) con una dosis de enzima de 60 mg proteína/g glucano, motivados principalmente por la ausencia de los compuestos de degradación de la biomasa que se forman durante la etapa de pretratamiento.

La presencia de los compuestos de degradación en el RFM pretratado completo ejerce por tanto un poder inhibitorio de las actividades celulolíticas, afectando de forma directa en los rendimientos de conversión. Estos resultados ponen de manifiesto la complejidad de los hidrolizados pretratados, destacando el papel crucial que juega la dosis de enzima en función de la composición de los medios y la concentración en sólidos totales de los mismos.

DESARROLLO DE UNA BIORREFINERÍA URBANA A PARTIR DE LOS RESIDUOS DE PODA

Siguiendo un esquema de biorrefinería, y teniendo en cuenta la concentración de azúcares totales, los hidrolizados resultantes en este trabajo representan una opción muy prometedora para la obtención de bioplásticos, como puede ser el PLA,

a través de procesos fermentativos.

Asimismo, desde el punto de vista de la circularidad de los procesos, el residuo generado tras la etapa de hidrólisis y fermentación, el cual presenta un alto contenido en lignina y un porcentaje menor de carbohidratos, podría valorizarse a su vez en otros compuestos de valor agregado (nanopartículas con actividad antimicrobiana, carbón activado, etc.), contribuyendo de este modo en la economía global del proceso.

Los resultados experimentales evaluados en la actualidad y los datos generados se utilizarán para llevar a cabo un análisis tecno-económico y un análisis de ciclo de vida para evaluar los principales cuellos de botella de los procesos a nivel económico y medioambiental.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Planta de Compostaje de Migas Calientes del Ayuntamiento de Madrid por el suministro de la materia prima utilizada en este trabajo. El estudio se enmarca en el proyecto RESOPLA (TED2021-132024B-C22) financiado por MICIU/AEI/10.13039/501100011033 y por la Unión Europea NextGenerationEU/ PRTR.

Bibliografía

[1] Plastic Europe, 2023. Plastics – the fast Facts 2023. Disponible en: <https://plasticseurope.org/es/knowledge-hub/plastics-the-fast-facts-2023/> (último acceso: 10 octubre 2024)

[2] Plastic Europe, 2024. The Circular Economy for Plastics – A European Analysis 2024.

Disponible en: <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/the-circular-economy-for-plastics-a-european-analysis-2024/> (último acceso: 10 octubre 2024)

[3] Research and Markets, 2024. Bioplastics Market Report by Applications, Material Type, Countries and Company Analysis, 2024-2032. Disponible en: <https://www.researchandmarkets.com/reports/5521685/bioplastics-market-report-by-applications> (último acceso: 10 octubre 2024)

[4] Xiros, C.; Janssen, M.; Byström, R.; Børresen, B.T.; Cannella, D.; Jørgensen, H.; Koppram, R. and Larsson, C. L. Olsson, Tillman, A.-M.; Wännström, S., 2017. Toward a sustainable biorefinery using high-gravity technology. *Biofuel Bioprod. Bior.*, 11(1), 15-27.

[5] Cubas-Cano, E.; González-Fernández, C.; Ballesteros, M.; Tomás-Pejó, E. Biotechnological advances in lactic acid production by lactic acid bacteria: lignocellulose as novel substrate. *Biofuel Bioprod. Bior.*, 12(2), 290-303

[6] NREL, 2024. Biomass Compositional Analysis Laboratory Procedures. Disponible en: <https://www.nrel.gov/bioenergy/biomass-compositional-analysis.html> (último acceso: 10 octubre 2024)

[7] Álvarez, C.; González, A.; Ballesteros, I.; Gullón, B.; Negro, M.J., 2023. In vitro assessment of the prebiotic potential of xylooligosaccharides from barley straw. *Foods*, 12(1), 83.

[8] Ziegler-Devin, I.; Chrusciel, L.; Brosse, N., 2021. Steam explosion pretreatment of lignocellulosic biomass: A mini-review of theoretical and experimental approaches. *Front. Chem.*, 9, 705358.

[9] Caputo, F.; Tölgo, M.; Naidjonoka, P.; Krogh, K.B.R.M.; Novy, V.; Olsson, L., 2023. Investigating the role of AA9 LPMOs in enzymatic hydrolysis of differentially steam-pretreated spruce. *Biotechnol. Biofuels Bioprod.*, 16(1), 68.

[10] Zhao, Q.; Zhang, Z.; Liu, Z.; Liang, H.; Gao, L.; Zhao, J.; Liu, G.; Qu, Y., 2024. A closed-loop strategy for on-site production of saccharolytic enzymes for lignocellulose biorefinery using internal lignocellulosic hydrolysates. *Chem. Eng. J.* 480, 148272. 