

Uso del papel procedente de la fracción de rechazo como materia prima en biorrefinerías multiproducto

A. D. Moreno¹ C. Álvarez Vaquerizo¹, A. González Sáez¹, I. Ballesteros¹, R. Iglesias Esteban¹, R. Ledesma-Amaro² y M. J. Negro Álvarez¹

¹Unidad de Biocarburantes Avanzados y Bioproductos, departamento de Energía de CIEMAT

²Department of Bioengineering and Centre for Synthetic Biology, Imperial College London

Con un alto contenido en carbohidratos, el papel procedente de la fracción de rechazo presenta una alta capacidad para ser valorizado como recurso en el marco de las biorrefinerías sostenibles, evitando así su desecho en vertederos y fomentando la obtención de productos de base biológica de interés industrial.

PALABRAS CLAVE: Bioeconomía Circular; Papel de Rechazo; Carotenos; Aceites Microbianos; Levaduras Modificadas Genéticamente.

The cellulosic residue from the rejected fraction shows high potential as raw material for bioprocessing due to its high carbohydrate content. This will definitely reduce the amount of paper-based products ending up for landfilling, aiming at fostering the production of industrial-relevant biobased compounds.

KEYWORDS: Circular Bioeconomy; Non-Recycled Paper Fraction; Carotenoids; Microbial Oils; Genetically Modified Yeasts.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo e implementación de las denominadas biorrefinerías resulta clave para la transición hacia un modelo de economía circular sostenible, donde las corrientes residuales puedan aprovecharse como un recurso para la obtención de una amplia gama de productos de valor añadido, entre los que se incluyen los biocombustibles y otros productos biobasados con aplicaciones químicas, farmacéuticas, alimentarias o materiales.

Entre los diferentes residuos generados, la fracción de rechazo o resto es la parte de los residuos de origen doméstico que incluye todos los residuos que no se pueden reciclar. No obstante, esta fracción de rechazo también contie-

ne componentes que no se han separado correctamente en origen, y que podrían ser susceptibles de utilizarse como materia prima en el marco de las biorrefinerías, como es el caso del papel de rechazo.

El papel procedente de la fracción de rechazo presenta un elevado potencial como materia prima para bioprocesos, gracias a su alto contenido en carbohidratos (siendo la celulosa y los xilanos los mayoritarios), los cuales pueden transformarse en diferentes productos de interés a través de procesos de fermentación microbiana, una vez hidrolizados a sus correspondientes azúcares simples. Aunque las cantidades varían significativamente en función de la región, los residuos sólidos urbanos (RSU) presentan un contenido medio de papel y cartón del 10-39 % [1].

De esta fracción, una parte considerable termina en la fracción de rechazo, debido a problemas de contaminación o calidad que impiden su reciclaje. Asimismo, en torno al 30-40 % del papel y cartón generado no puede ser reciclado, clasificándose como rechazo. Con una producción global estimada de 400 millones de toneladas de papel y cartón al año, la cantidad de la fracción de papel de rechazo asciende hasta a los 120-160 millones de toneladas, lo que supone un problema de gestión añadido con consecuencias medioambientales graves. En el caso particular de Europa, en torno al 20-30 % del papel generado anualmente termina en fracciones no reciclables, con cifras que ascienden a los 23 millones de toneladas al año [2].

Una de las posibles alternativas que

ofrece la valorización de estos residuos mediante procesos biológicos es la obtención de aceites microbianos. El interés por la producción de aceites microbianos ha crecido considerablemente en los últimos años debido, entre otras ventajas, a la posibilidad para reemplazar los aceites vegetales empleados en sectores tan diversos como el alimentario (suplementos nutricionales o aditivos alimentarios), el energético (biocombustibles) o la industria farmacéutica (ácido araquidónico, ácido docosahexaenoico) y la de materiales (biopolímeros, bioplásticos).

Además, los microorganismos utilizados, entre los que principalmente se incluyen levaduras, microalgas o bacterias, presentan ciclos de crecimiento más rápido en comparación con los cultivos vegetales, permitiendo llevar a cabo los procesos de conversión bajo condiciones controladas, pudiendo utilizar una amplia variedad de fuentes de carbono incluidas en las diversas fuentes residuales, y evitando la necesidad de utilizar terrenos fértiles que pueden ser aprovechados para otros cultivos.

Es interesante además destacar que, las nuevas técnicas de edición genética para la modificación microbiana, están revolucionando los procesos de conversión, permitiendo aumentar la eficiencia de los procesos a la vez que facilitan la conversión integral de los residuos en el producto de interés, y/o mejorando los costes del proceso mediante la coproducción simultánea de compuestos de valor añadido.

En este sentido, levaduras como

Yarrowia lipolytica están siendo objeto de estudio y ofrecen un amplio rango de posibilidades para la edición y mejora genética, potenciando sus capacidades intrínsecas o incorporando nuevas funcionalidades que aumenten las posibilidades de escalado de los procesos a nivel industrial. Como ejemplo de estas levaduras modificadas podemos encontrar la cepa *Y. lipolytica* S114, que presenta un metabolismo celular dirigido a fomentar la acumulación de lípidos y β -caroteno intracelularmente [3].

Al igual que los aceites microbianos, la producción de carotenos ha experimentado un creciente interés en la actualidad debido a sus diferentes propiedades, como su capacidad antioxidante o su uso como pigmentos naturales, que les permite tener múltiples aplicaciones en la industria alimentaria (suplementos dietéticos), cosmética (colorantes y aditivos fotoprotectores) o farmacéutica (precursor de vitaminas, compuestos activos que modulan el sistema inmunológico) [4].

En el presente trabajo, la fracción de papel de rechazo se ha utilizado para la obtención de un medio azucarado para su aprovechamiento en un contexto de biorrefinería multiproducto utilizando la levadura *Y. lipolytica* S114, a fin de obtener de forma simultánea aceite microbiano y β -caroteno. Además, con el objetivo de mejorar los valores de productividad volumétrica y viabilidad celular, se ha evaluado la adición complementaria de nutrientes a los medios resultantes para favorecer el crecimiento y acortar los tiempos de proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIA PRIMA Y PRETRATAMIENTO

El residuo celulósico procedente de la fracción de rechazo se utilizó como materia prima en este estudio. Este residuo fue recogido por el gestor de residuos AMB del área metropolitana de Barcelona. Tras su recogida, los textiles incluidos en esta fracción se separaron para obtener un material rico en papel y cartón.

A continuación, los residuos se

» Tras una etapa de pretratamiento en condiciones ácidas, el contenido de carbohidratos del residuo celulósico de rechazo asciende a un 74,3 % del peso seco

transportaron al CIEMAT para su análisis composicional y pretratamiento. La composición inicial de la biomasa presentaba la siguiente relación (g/100 g residuo celulósico de rechazo): 53,9 ± 0,8 glucanos; 11,4 ± 0,2 xilanos; 2,2 ± 0,1 otros carbohidratos (galactanos, arabinanos y mananos); 0,4 ± 0,1 grupos acetilos; 12,6 ± 0,6 residuo ácido insoluble; 9,8 ± 0,1 cenizas (Figura 1).

Tras su caracterización, la materia prima se sometió a un proceso de pretratamiento en autoclave (120 °C, 40 min) bajo condiciones ácidas (< 1 % H₂SO₄) y a una relación sólido:líquido de 1:15. Previo a la etapa de hidrólisis enzimática, el residuo sólido resultante se recuperó y lavó mediante filtración a vacío, utilizando un embudo Büchner y una malla de nylon de 60 µm de tamaño de poro.

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

El residuo sólido pretratado se sometió a hidrólisis enzimática en un reactor Infors HT Terrafors de 12 L, diseñado específicamente para el trabajo a altas cargas de sólidos. La hidrólisis enzimática se llevó a cabo al 15 % (p/p) de concentración de sólidos, 50 °C, y pH 5 (tampón citrato 0,05 M), utilizando 20 mg/g de glucano de la preparación enzimática "Cellulase, enzyme blend" (220 mg proteína/mL; Merck, Alemania, antes conocida como Cellic CTec2 y distribuida por Novozymes).

El hidrolizado de papel resultante

se filtró y esterilizó utilizando un sistema Nalgene (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EE.UU.) con un tamaño de poro de 0,22 µm.

FERMENTACIÓN DEL HIDROLIZADO DEL PAPEL DE RECHAZO

El hidrolizado de papel resultante tras la hidrólisis enzimática del residuo pretratado se utilizó como medio de cultivo para el crecimiento de la levadura *Y. lipolytica* S114. Previo a la inoculación, la levadura se creció en medio YPD (10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona y 20 g/L de glucosa) para su activación. Las células se recogieron mediante centrifugación a 5000 g y se inocularon en el hidrolizado de papel con una densidad óptica final (DO_{600nm}) de 0,6.

El cultivo se llevó a cabo en biorreactores de 0,5 L de capacidad (*MiniBio Applikon® Biotechnology*, Delft, Países Bajos) con un volumen de trabajo inicial de 250 mL, a 30 °C y pH6 (control de pH con 2 M KOH y 2 M HCl) y un flujo de aireación constante. Para el control de espuma se utilizó el antiespumante Antifoam A (Merck, Darmstadt, Alemania) con una concentración inicial de 0,02 % (v/v).

Con el objetivo de fomentar las tasas de asimilación de azúcares y los valores de productividad volumétrica para acortar los tiempos de fermentación, se hizo un estudio comparativo de los procesos, con y sin adición de nutrientes externos. Para ello, se tuvo en cuenta

los nutrientes y concentraciones definidos por Verduyn y col. [5] en cuanto a trazas de metales y vitaminas.

MÉTODOS ANALÍTICOS

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].

Los azúcares (glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa y manosa) y los ácidos orgánicos (ácido acético y ácido fórmico) se identificaron y cuantificaron por HPLC/IR, según el protocolo descrito por Álvarez y col. [7].

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

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

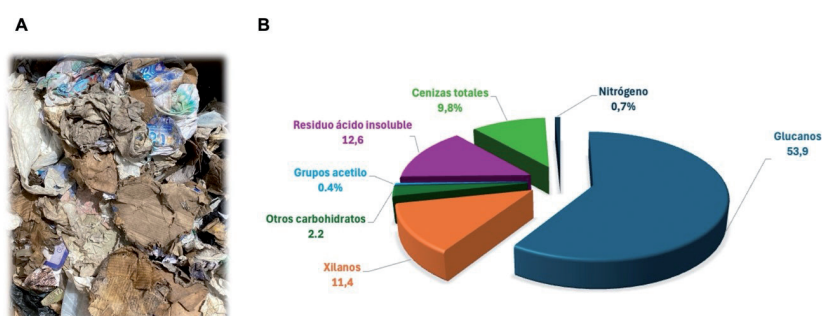
siendo la concentración de glucosa producida aquella resultante tras sustraer la cantidad de glucosa aportada por la preparación enzimática y/o el material pretratado, y la glucosa potencial la concentración máxima que se puede liberar, teniendo en cuenta el contenido de celulosa correspondiente.

El crecimiento celular se monitorizó por espectrofotometría mediante la determinación de la DO_{600nm}, mientras que la viabilidad celular, las células totales y las células viables se analizaron utilizando un sistema Vi-Cell XR (Beckman Coulter, Brea, CA, EE.UU.).

Tras completar el cultivo, las células se recogieron por centrifugación a 2000 g durante 10 min y se llevó a cabo la determinación del β-caroteno, los lípidos totales y el perfil de ácidos grasos o FAMES (ésteres metílicos de ácidos grasos) acumulados intracelularmente.

Por un lado, para la extracción del pigmento se llevó a cabo la ruptura celular en un homogenizador Fast-Prep 24TM (MP Biomedicals, LLC, CA, USA) (dos ciclos 30s, velocidad 6 m/s con 15 s de pausa), al resuspender las células contenidas en 1

FIGURA 1. (A) Fotografía de la fracción de papel de rechazo y (B) relación de los principales componentes químicos que la conforman



mL de cultivo (2.000 g, 2 min) en 1 mL de dodecano y en presencia de 500 mg de perlas de vidrio con un diámetro de 450-600 μm .

Tras la homogenización, el sobrenadante se recolectó por centrifugación (3000 g, 2 min) y se repitió el proceso hasta completar la extracción (pérdida de color del pellet celular). El β -caroteno se cuantificó por espectrofotometría a 453 nm utilizando una curva de concentraciones conocidas de este mismo compuesto.

Por otro lado, la determinación de los lípidos totales se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Sha [8], donde 70-80 mg de células previamente liofilizadas se someten a hidrólisis con 3,2 mL de ácido clorhídrico 4 M a 50 °C durante 2 h y a continuación se extraen los lípidos con 8 mL de una solución 2:1 (v/v) de cloroformo:metanol tras una incubación a 20 °C durante 3 h.

Los lípidos se obtuvieron tras recoger la fase orgánica y secarla bajo nitrógeno con un evaporador Turbo Vap LV (Zymark, Hopkinton, MA, USA). El proceso de extracción se repitió varias veces para maximizar la recuperación de lípidos. Por último, el perfil de ácidos grasos y contenido en FAMES se determinó por cromatografía de gases sobre las células liofilizadas, siguiendo el protocolo descrito por Van Wychen y col. [9], basado en un proceso de transesterificación de los ácidos grasos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RECUPERACIÓN DE AZÚCARES MEDIANTE PRETRATAMIENTO E HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA FRACCIÓN CELULÓSICA DE RECHAZO

Con el fin de valorizar la fracción celulósica de rechazo mediante el aprovechamiento por procesos biológicos de sus carbohidratos, este residuo se sometió de forma secuencial a un pretratamiento e hidrólisis enzimática para maximizar la recuperación de los azúcares simples.

Para evitar la degradación de azúcares durante el pretratamiento debido a las condiciones ácidas aplicadas, esta etapa se llevó a cabo a una temperatura relativamente baja (120 °C). La composición del residuo sólido obtenido tras este pretratamiento se recoge en la Tabla 1.

Como se puede observar, el contenido en carbohidratos asciende a un 74,3 % del peso seco de este residuo, destacando su potencial como materia prima en el marco de las biorrefinerías basadas en procesos de transformación microbiana, y en el caso particular de este estudio, para la obtención de aceite microbiano y productos de alto valor añadido, como el β -caroteno.

El residuo sólido pretratado se sometió posteriormente a una etapa de hidrólisis enzimática, permitiendo la recuperación del 54 % de los azúcares presentes y alcanzándose una concentración final de glucosa y xilosa de $66,0 \pm 3,8$ g/L y $10,5 \pm 1,6$ g/L, respectivamente.

Los bajos rendimientos de hidrólisis enzimática pueden atribuirse a la utilización de una dosis baja de enzima o a la dificultad que éstas tengan para acceder a los carbohidratos y realizar su acción hidrolítica. Hay que tener en cuenta, además, que la etapa de hidrólisis enzimática se llevó a cabo con una concentración de sólidos totales del 15 % (p/p).

Estudios previos han mostrado que el incremento en la concentración de sólidos totales mejora la concentración final de azúcares en los hidrolizados de papel resultantes [10]. Por el contrario, el aumento en la carga de sólidos totales conlleva una disminución de los rendimientos de sacarificación.

Este resultado pone de manifiesto la necesidad de optimización de estas etapas de pretratamiento e hidrólisis enzimática, con el fin de poder aumentar la recuperación de los azúcares contenidos en la fracción celulósica de rechazo y mejorar el rendimiento global de los procesos de conversión.

PRODUCCIÓN DE ACEITE MICROBIANO Y β -CAROTENO A PARTIR DEL HIDROLIZADO DE PAPEL DE RECHAZO

El hidrolizado rico en azúcares obtenido a partir del residuo de papel de rechazo se utilizó como medio de cultivo para la levadura *Y. lipolytica* S114, con el objetivo de producir aceite microbiano y β -caroteno.

TABLA 1.

COMPOSICIÓN DEL RESIDUO SÓLIDO OBTENIDO TRAS EL PRETRATAMIENTO DE LA FRACCIÓN CELULÓSICA DE RECHAZO

Componente	g / 100 g
Glucanos	$61,3 \pm 0,8$
Xilanos	$10,0 \pm 0,2$
Otros carbohidratos	$3,0 \pm 0,1$
Grupos acetilo	No detectado
Residuo Ácido Insoluble	$10,7 \pm 0,4$
Cenizas totales	$10,3 \pm 0,3$

Como se puede observar en la Figura 2A, *Y. lipolytica* S114 mostró un consumo constante de glucosa durante 96 h de cultivo, alcanzando una DO_{600nm} final de 40.

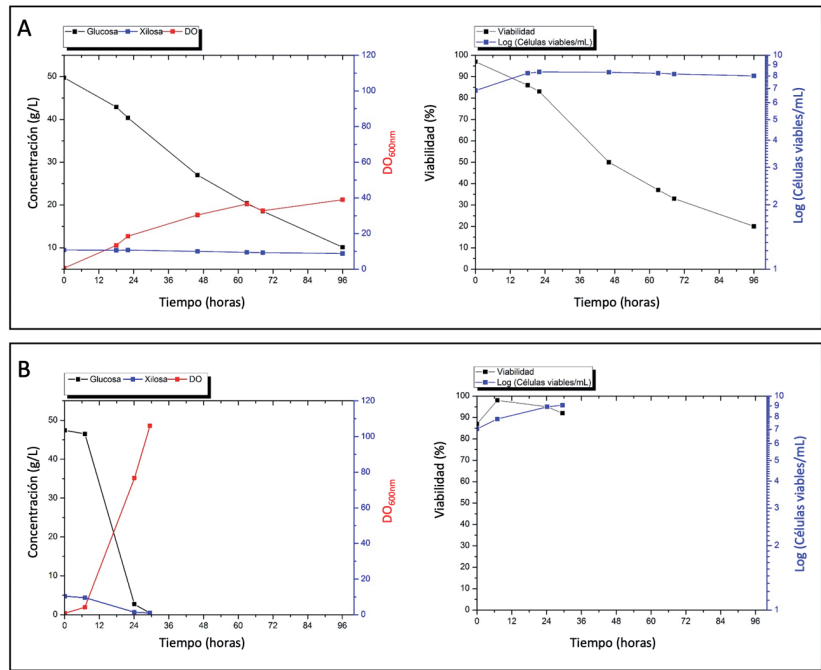
Sin embargo, no se pudo determinar consumo alguno del azúcar xilosa a lo largo del proceso, observándose además un descenso significativo de la viabilidad celular a partir de las 20 h desde la inoculación.

Este resultado se atribuye a las condiciones excesivamente limitantes en nutrientes del hidrolizado de papel, como muestra la Figura 2B, donde tras la adición de nutrientes se puede observar un consumo completo de los azúcares mayoritarios (glucosa y xilosa) tras 29 h desde la inoculación.

Además, se determinó una viabilidad superior al 90 %, lo que permitió aumentar a su vez los valores de DO_{600nm} en 2.5 veces, frente al cultivo sin la adición de nutrientes externos.

Además de observarse diferencias en el consumo de azúcares, la concentración de biomasa celular, la viabilidad y el tiempo de proceso, también se determinaron diferencias significativas en relación con el porcentaje de acumulación intracelular de lípidos y carotenos y el perfil de FAMES. A este respecto, la Tabla 2 muestra un descenso del contenido lipídico intracelular desde el 45,4 % hasta el 24,0 % tras la adición de

FIGURA 2. Consumo de azúcares, crecimiento celular, viabilidad y concentración de células viables durante el cultivo de *Y. lipolytica* S114 en hidrolizado de papel de rechazo (A) sin adición y (B) con adición externa de nutrientes



nutrientes al hidrolizado de papel.

Sin embargo, cabe destacar que la mayor concentración de biomasa celular alcanzada durante el cultivo (DO_{600nm} de 40 vs. 105), permitió obtener valores similares de lípidos totales (7,6 vs. 8,1 g/L, respectivamente). El perfil de FAMES también mostró diferencias importantes, como se observa en la Figura 3, destacándose las diferentes proporciones de ácido oleico, linoleico y esteárico.

Por otro lado, el contenido de carotenos intracelulares aumentó desde el 3,2 % al 5,5 % tras la adición de nutrientes (Tabla 2). Este incremento, sumado a la mayor densidad celular, permitió alcanzar una concentración total de carotenos de casi 4 veces superior (de 0,5 hasta 1,9 g/L).

CONCLUSIONES

Estudios anteriores han mostrado la

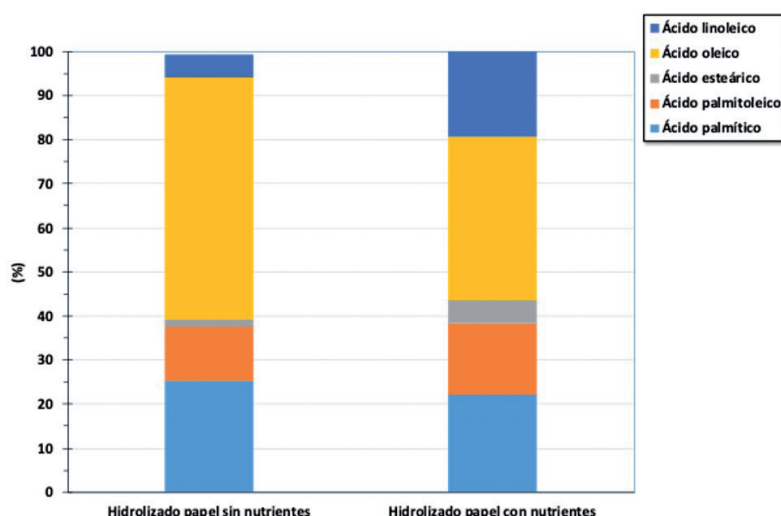
TABLA 2.

PARÁMETROS RELATIVOS A LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS Y CAROTENOS POR PARTE DE *Y. LIPOLYTICA* S114 TRAS SU CULTIVO EN HIDROLIZADO DE PAPEL DE RECHAZO CON Y SIN LA ADICIÓN EXTERNA DE NUTRIENTES

	Lípidos (g/L)	Lípidos (% p/p)	FAMES (% p/p)	$Y_{Lípidos}$ (g/g)*	Carotenos (g/L)	Carotenos (% p/p)
Sin nutrientes	7,6 ± 0,6	45,4 ± 2,1	25,4 ± 1,6	0,22 ± 0,02	0,5 ± 0,1	3,2 ± 0,3
Con nutrientes	8,1 ± 0,4	24,0 ± 1,0	13,4 ± 0,7	0,14 ± 0,03	1,9 ± 0,3	5,5 ± 0,5

*g lípidos / g azúcares consumidos

FIGURA 3. Perfil de FAMES obtenidos tras el cultivo de *Y. lipolytica* S114 en hidrolizado de papel de rechazo sin adición y con adición externa de nutrientes



necesidad de tener condiciones limitantes en nutrientes (por ej., nitrógeno, fosfatos, etc.) para fomentar la acumulación intracelular de lípidos y otros compuestos de interés en levaduras oleaginosas [11].

Esta aproximación, normalmente, conlleva la extensión del tiempo de proceso, penalizando los valores de productividad. El presente estudio demuestra que las nuevas cepas diseñadas mediante ingeniería genética permiten operar los procesos en condiciones favorables para el cultivo, lo que beneficia a los tiempos globales de proceso, facilita la asimilación de las fuentes de carbono presentes, y permite, de forma general, alcanzar valores similares o

superiores del producto de interés.

Todo esto, combinado con el uso de materias primas residuales como el papel procedente de la fracción de rechazo, suponen un punto de inflexión para poder alcanzar bioprocesos que garanticen tanto un menor impacto ambiental como la rentabilidad de los mismos, y permitan posicionar en el mercado los productos de interés a precios competitivos.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Área Metropolitana de Barcelona por el suministro de la materia prima utilizada en este trabajo y al Prof. Jean-Marc Nicaud (INRA, Francia) por compartir información genómica de la cepa *Y. lipolytica* S114. El estudio se enmarca en el proyecto BIOMIO (Proyecto PID2020-119403RB-C22) financiado por MICIU/AEI/10.13039/501100011033.

» El uso combinado de materias primas residuales y cepas microbianas modificadas genéticamente, fomenta el desarrollo de bioprocesos rentables con un menor impacto ambiental

Abreviaturas

RSU: Residuos Sólidos Urbanos
HPLC/IR: Cromatografía líquida de alta presión con detector de índice de refracción
DO_{600nm}: Densidad óptica a 600nm
FAME: Ésteres metílicos de ácidos grasos

Bibliografía

- [1] Hietala, M.; Varrio, K.; Berglund, L.; Soini, J.; Oksman, K., 2018. Potential of municipal solid wastepaper as raw material for production of cellulose nanofibers. *Waste Manag.*, 80, 319-326.
- [2] Balticfloc, 2020. The problem of waste paper in European countries. SIA "Balticfloc". Disponible en: (último acceso: 21 noviembre 2024).
- [3] Larroude, M.; Celinska, E.; Back, A.; Thomas, S.; Nicaud, J.-M.; Ledesma-Amaro, R., 2018. A synthetic biology approach to transform *Yarrowia lipolytica* into a competitive biotechnological producer of β -carotene. *Biotechnol. Bioeng.*, 115(2), 464-472.
- [4] Singh, R.V.; Sambyal, K., 2022. An overview of β -carotene production: Current status and future prospects. *Food Biosci.*, 47, 101717.
- [5] Verduyn, C.; Postma, E.; Scheffers, W.A.; Van Dijken, J.P., 1992. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: A continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast*, 8(7), 501-517.
- [6] Sluiter, J.B.; Ruiz, R.O.; Scarlata, C.J.; Amie D. Sluiter A.D.; Templeton, D.W., 2010. Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 1. Review and Description of Methods. *J. Agric. Food Chem.*, 58(16), 9043-9053.
- [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] Sha, Q., 2013. A comparative study on four oleaginous yeasts on their lipid accumulating capacity MSc. Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Suecia. Disponible en: <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:slu:epsilon-s-2401> (último acceso: 21 noviembre 2024).
- [9] Van Wyche, S.; Ramirez, K.; Laurens, L.M.L., 2015. Determination of total lipids as fatty acid methyl esters (FAME) by in situ transesterification. NREL/TP-5100-60958. Golden, CO, EE.UU.: National Renewable Energy Laboratory. Disponible en: <https://www.nrel.gov/docs/fy16osti/60958.pdf> (último acceso: 21 noviembre 2024).
- [10] Xiros, C.; Janssen, M.; Byström, R.; Børresen, B.T.; Cannella, D.; Jørgensen, H.; Koppam, 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.
- [11] Gallego-García, M.; Moreno, A.D.; González, A.; Negro, M.J., 2023. Efficient use of discarded vegetal residues as cost-effective feedstocks for microbial oil production. *Biotechnol. Biofuel Bioprod.*, 16, 21.