



Universidad
de Alcalá

Programa de Doctorado en Biología Funcional y Biotecnología

**PRODUCCIÓN DE ACEITE MICROBIANO MEDIANTE
LEVADURAS OLEAGINOSAS, A PARTIR DE
CARBOHIDRATOS PROCEDENTES DE RESIDUOS
VEGETALES, PARA SU APLICACIÓN COMO
BIOCOMBUSTIBLE**

Tesis Doctoral presentada por

MARÍA GALLEGO GARCÍA

2024



Programa de Doctorado en Biología Funcional y Biotecnología

**PRODUCCIÓN DE ACEITE MICROBIANO MEDIANTE LEVADURAS
OLEAGINOSAS, A PARTIR DE CARBOHIDRATOS PROCEDENTES DE
RESIDUOS VEGETALES, PARA SU APLICACIÓN COMO
BIOCOMBUSTIBLE**

Tesis Doctoral presentada por

MARÍA GALLEGO GARCÍA

Directores:

Dra. MARÍA JOSÉ NEGRO ÁLVAREZ

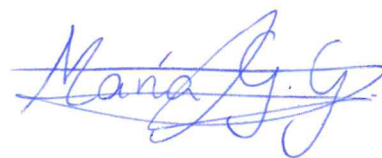
Dr. ANTONIO DAVID MORENO GARCÍA

Alcalá de Henares, Julio 2024

A solid blue horizontal bar spanning the width of the page at the bottom.

Memoria presentada por María Gallego García para optar al grado de Doctor por la Universidad de Alcalá de Henares bajo la dirección de los Doctores María José Negro Álvarez y Antonio David Moreno García.

Madrid, Julio de 2024.



Fdo.: María Gallego García
(CIEMAT)



Fdo.: Dra. María José Negro Álvarez
Investigadora Científica
Unidad Biocarburantes Avanzados y
Bioproductos (CIEMAT)



Fdo.: Antonio David Moreno García
Científico Titular
Unidad Biocarburantes Avanzados y
Bioproductos (CIEMAT)



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE CIENCIA, INNOVACIÓN
Y UNIVERSIDADES

Ciemat
Centro de Investigaciones
Energéticas, Medioambientales
y Tecnológicas

A María del Rocío, mi Ángel en el cielo,

A Sebastián, mi Ángel en la tierra.

Agradecimientos

Me gustaría mostrar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral, brindándome su conocimiento, su tiempo, su apoyo, sus consejos y su cariño. Gracias, pues sin vosotros no habría sido posible experimentar el gran crecimiento personal y profesional que siento he alcanzado tras este trabajo.

En primer lugar, tengo que agradecer a la Dra. Raquel Iglesias por acogerme y abrirme las puertas de la maravillosa Unidad de Biocarburantes Avanzados y Bioproductos del CIEMAT (Biocar). También, aún en la distancia, gracias a la Directora del Departamento de Energía, Mercedes Ballesteros y a la Responsable de la División de Energías Renovables, Nieves Vela, por su apoyo e interés en mi Tesis. Además, debo mencionar en esta nota a las instituciones y ayuda que han hecho posible la realización de mi Tesis Doctoral durante estos 4 años; beca concedida para mi contrato predoctoral para la formación de doctores (PRE2018-086317) financiada por MICIU/AEI/10.13039/501100011033 y por “FSE Invierte en tu futuro” en el marco de los proyectos de investigación ACMIBIO y BIOMIO.

Me gustaría continuar agradeciendo enormemente la labor de la Dra. María José Negro Álvarez y el Dr. Antonio David Moreno García, mis directores de Tesis. Gracias por contar conmigo para formar parte de vuestro equipo y confiar en mí. Vuestras enseñanzas y consejos, vuestra paciencia y vuestra dedicación y pasión por la ciencia han sido esenciales para darle sentido a mi recorrido en estos duros y bonitos años de trabajo. Destaco, además de vuestro gran conocimiento, vuestro gran trabajo, vuestra curiosidad e incansables ganas de aprender siempre, habéis sido muy inspiradores para mí.

Gracias a mi tutor de Tesis, el Profesor Manuel Pascual Hernández Cutuli, por haberme ayudado cada vez que lo he necesitado, por su simpatía, por siempre tener palabras de calma en momentos difíciles y por confiar en mí para formar parte de la Comisión de Calidad del Programa de Doctorado en Biología Funcional y Biotecnología.

Por supuesto, GRACIAS a todo el equipo de la Unidad de Biocar. No tengo palabras para describir todo lo que habéis sido para mí en estos años. Sin duda, puedo decir con total seguridad que son las personas las que hacen que valga la pena las experiencias vividas. Gracias a todos. A Paloma, por su mirada cálida y apretón de manos amoroso cuando sabía que más lo necesitaba. A Nacho, por su frescura, sentido del humor y por su gran contribución a este trabajo. A Aleta, por su ternura, por las miradas cómplices y los ataques de risa en los momentos más inesperados. A Ana, por su empatía, por sus consejos, por preocuparse tanto por mí y compartir sus experiencias para levantarme en momentos complicados, también por su trabajo que tanto ha ayudado a este estudio. A Marisa, por su gracia, espontaneidad y sencillez. A David, por su familiaridad, humildad, candidez y por compartir sus anécdotas tan increíbles. Gracias por enseñarme el interesante mundillo de los biorreactores. A Miguel G., por su naturalidad, serenidad y amabilidad. A María del Prado,

mi compi de baloncesto y ahora de Unidad, por su ternura y apoyo. A José Miguel, ese hombre “loco” y a la vez sensato, amable, divertido, entrañable, del Atleti y de gran sentido del humor, al que verle entrar por la puerta ya te alegra el día...gracias por las risas, por el apoyo, por la confianza y la ayuda brindada. Me has dejado huellita. A María José, por enseñarme tanto y por cuidarme y hacer de “madre” (aconsejando, abrazando, “riñiendo”, bromeando) cuando lo necesitaba. A Javi, por “arrimar el hombro” en el laboratorio conmigo y por sus chistes espontáneos que tanto se agradecen. A Miguel M., por los debates sobre tiburones, por su preocupación y su ayuda en el lab. A José Luis, por dejarme conocerle y compartir conmigo sus divertidas anécdotas, interesantes aficiones y por ser compañero de insomnio y de lab con los “insufribles” carotenoides. A Isa, por su alegría, aire fresco y cariño, gracias por abrirte conmigo y compartir momentos de todo tipo. A Alberto, “el algas”, por las risas, por sus ocurrencias y por su ingenio...para mí sigues formando parte del equipo. A mi Kiko, mi gran compañero de Tesis y amigo. Mi isleño. Gracias por estar ahí siempre, por escuchar, por tu empatía, por tu cariño, por tu sincera preocupación, por las risas, por nuestras charlas, por los congresos juntos, por ser un buenazo...he aprendido mucho junto a ti, te espero en otras aventuras. A mi Raquel, amiga y mi compi de despacho. Lo vivido junto a ti ha sido una fantasía, nuestras “maldades”, ocurrencias, risas, humor, cotilleos, charlas...todo ha sido increíble, me alegra haberte tenido tan cerca y agradezco tu ayuda con la Tesis. Y por último, a dos de los pilares principales en mi estancia en CIEMAT, mis compañeros de lab, de mi antiguo despacho y para mí, amigos, Cris y Alberto, a los que tanto quiero. Mi Cris, gracias por haber hecho tantas veces de hermana mayor. Sin ti, esto no habría sido igual. Gracias por acercarme a tu increíble familia y por acompañarme en momentos de soledad, a la vez que en buenísimos momentos. Gracias por ayudarme tanto en el aspecto profesional y personal, con tu trabajo en el laboratorio, con la gestión de la estancia internacional y con tus consejos para la Tesis y para aliviar mi angustia frente a las dificultades presentadas. Gracias por tu alegría espontánea, por “espabilarme” y cargarme las pilas cuando era necesario, por haberme ayudado a solucionar tantos problemas de forma eficaz, por apoyarme y estar ahí siempre, lo dicho, como una hermana. A mi Alberto, Bertín, empecé este camino junto a ti, solos en el despacho, fuiste tan importante en las primeras semanas y aún más en los años siguientes que no sé cómo agradecértelo. Eres todo bondad, sólo buenas palabras y amor, quién no querría tenerte siempre cerca. El primero en el que pensaba cuando la cosa se torcía pues sabía que tendrías las palabras adecuadas además del calor de la familia que tanta falta me hacía. Pero también el primero en el que pensaba para compartir algún momento gracioso o disparatado porque siempre sabes hacer reír. Tantos dones buenos en una sólo persona, qué suerte he tenido de toparme contigo y haber compartido tanto...incluidos esos momentos de extracción y análisis de “FAMEs” tan necesarios para este estudio. Gracias amigo, siempre en mi corazón.

También tengo que mencionar a otros compañeros del CIEMAT que han sido muy importantes para mí, como José María, Feli, José Manuel, Carlos, Marina, Antonio “el primo”, Gema, Nuria, Rita, Esther, Charo (mi sevillana), Glenda, Altagracia, Sonia, Tomasi, mis compis becarios y de batalla Naia, Joaquín y mi adorada Meryem, esa amiga que nunca me ha fallado, mi gotita de agua y compañera de risas, lágrimas y más risas. Te quiero.

Thanks to PhD Rodrigo Ledesma Amaro for welcoming me to his Department of Bioengineering at Imperial College London and sharing his great knowledge with me. It was a pleasure meeting you and working on your team for more than three months. Furthermore, I thank your entire team for hosting me, especially Javiera, Piotr, Young, Razieh, Mohamed, and Cinzia. Gracias al club de los cafés y risas del “Cervantes SynBio Club” con Diego, Alicia, Albert, Oliver, Joaquín y Mateo. Pero “Mi Chiqui”, tu fuiste lo mejor de esta estancia en Londres. Amiga e increíble compañera. Siempre en mi mente.

Thanks to this Thesis I have met wonderful people like my incredible friend Kate, my adorable friend and flatmate Farrah and her family and friends. Thank you both for making me part of your lives and for making me feel like family. Thanks to Iga, Mariana, Elia, Sergio, Marta and other colleagues who have made this experience an unique moment.

I would also like to thank the external experts, PhD Daniela Maza and Professor James González, who have evaluated my thesis. Thank you for your positive comments, for your time and for appreciating my work.

Gracias a mis amigos del pueblo (Lora del Río) y de la uni, Sofía, Vir, Sara, Jesús, Mai y Raquel por vuestro apoyo y por seguir en mi vida después de tantos años. Especialmente, gracias Raquel por siempre verme capaz de todo y por interesarte tanto por mi futuro profesional. Gracias a mis compis de piso de Madrid, Yolanda (mi compi y casera), Marina, Rocío, Yolanda (bebota) y Lola (mi Lolilla). Sin vosotras no habría sido lo mismo. Especialmente, gracias Lola, por ser amiga, por todo...tú en mi vida siempre.

Por último agradecer a mi familia, pequeñita pero de corazón enorme. Gracias por todo vuestro apoyo y amor, sobre todo gracias a los que más me habéis aguantado y sufrido en el “modo on: desesperación y ansiedad por la tesis”. A mi pareja, Fran, la persona que la vida puso en mi camino cuando más lo necesitaba, para poder apreciar aún más los pequeños detalles, para descubrir que el amor de verdad siempre suma y para aprender a disfrutar de absolutamente todo y saber que la vida es el ahora. Gracias gordititi por ser tan maravilloso, mi almita. A mi hermano, Sebastián, le escribo estas palabras que, aunque nunca comprenderá, me gustaría plasmar aquí, que se sepa que él es lo mejor que tengo en mi vida, lo que más quiero, de quién más he aprendido y él único que me salva cuando siento que todo está perdido. Gracias “Osi” por cuidar de mí a tu manera, especial, como tú eres. Finalmente, dedico especialmente esta Tesis y todo el esfuerzo puesto en ella a mis padres, José Enrique y Paqui, mi “apá” y mi “murs”. Ellos son las personas más trabajadoras, inteligentes y buenas que conozco, los que nunca me fallan, los que siempre miran por mi bien. Gracias por todo vuestro apoyo y amor incondicional, por enseñarme a ser autocrítica, humilde, responsable, fuerte, trabajadora y libre. Os elegiré siempre en todas mis vidas. Papá y mamá, gracias, os quiero.

María G.G.

Índice

Listado de Abreviaturas.....	i
Glosario	iii
Resumen	vii
Abstract.....	x
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Biocarburantes avanzados en el contexto de una economía sostenible.....	3
1.2. Biorrefinerías para la generación de biocombustibles y otros productos de valor	6
1.3. Producción de triacilglicéridos como moléculas base de biocombustibles avanzados	7
1.3.1. Metabolismo de síntesis de triacilglicéridos en levaduras oleaginosas.....	12
1.3.2. Estrategias de cultivo.....	17
i) Modo Batch.....	17
ii) Modo Fed-batch	19
iii) Modo Batch repetido o en dos etapas	21
iv) Modo continuo	22
1.4. Nuevas materias primas para la producción de triacilglicéridos	25
i) Residuos agrícolas y derivados de alimentos.....	26
ii) Residuos procedentes de biomasa lignocelulósica.....	31
ii.i) Residuos celulósicos urbanos	35
1.4.1. Pretratamiento de los residuos de biomasa lignocelulósica.....	36
1.4.2. Hidrólisis enzimática	40
1.5. Producción de otros compuestos de interés. Carotenoides.....	42
1.6. La modificación genética como herramienta para la mejora de levaduras oleaginosas	44

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	47
2.1. Justificación	49
2.2. Objetivos.....	50
3. MATERIALES Y MÉTODOS	53
3.1. Materia prima	55
3.1.1. Tipologías de residuos	55
i) Residuos agrícolas procedentes de cultivos en invernaderos - Destríos	55
ii) Residuos lignocelulósicos municipales (RLM) - Poda urbana	56
iii) Residuos celulósicos de rechazo (RCR)- Papel no reciclado	56
3.2. Azúcares como molécula plataforma del proceso	56
3.2.1. Tratamiento de los destríos.....	57
3.2.2. Pretratamientos de los RLM y RCR.....	58
i) RLM – poda urbana	58
ii) RCR – papel de la fracción orgánica	60
3.2.3. Hidrólisis enzimática de los RSI de los RLM y RCR	60
3.3. Caracterización de la materia prima	61
3.4. Levaduras oleaginosas.....	63
3.4.1. <i>Cryptococcus curvatus</i>	67
3.4.2. <i>Rhodospiridium toruloides</i>	68
3.4.3. <i>Yarrowia lipolytica</i>	68
3.5. Estrategias de cultivo.....	69
3.5.1. <i>Batch</i>	69
3.5.2. <i>Fed-batch</i>	70
3.5.3. <i>Batch</i> en dos etapas.....	71

3.6. Determinaciones analíticas.....	71
3.6.1. Determinación de azúcares y nitrógeno.....	71
3.6.2. Determinación del crecimiento celular.....	72
i) Peso seco celular.....	72
ii) Densidad óptica.....	72
iii) Viabilidad celular.....	72
3.6.3. Determinación de ácidos y fenoles o compuestos de degradación.....	72
3.6.4. Determinación de lípidos totales.....	73
3.6.5. Determinación del perfil de ácidos grasos.....	74
3.6.6. Tinción con rojo de Nilo.....	74
3.6.7. Determinación de carotenoides totales.....	75
3.6.8. Determinación del perfil de compuestos carotenoides.....	76
3.6.9. Determinación del β -caroteno.....	76
3.6.10. Determinación de la violaceína.....	77
3.6.11. Determinación de la indigoidina (índigo).....	77
3.6.12. Determinación de la actividad de la enzima manitol deshidrogenasa en <i>C. curvatus</i>	78
3.6.13. Cálculo del número de cetano (CetN).....	79
3.7. Análisis tecno-económico.....	80

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 83

4.1. Selección de residuos agrícolas y urbanos.....	85
4.2. Composición de la materia prima. Residuos agrícolas y urbanos.....	87
4.2.1. Composición de los medios de cultivo derivados de los residuos.....	89
4.3. Cultivos de levaduras oleaginosas en medio sintético.....	91
4.4. Cultivos en medios derivados de destríos bajo diferentes relaciones C/N.....	95

4.4.1. Estrategia de cultivo <i>fed-batch</i> en medio derivado de destrío de tomate, pimiento y sandía a C/N 15, 30 y 50	95
i) Cultivos en medio derivados de destríos de tomate	95
ii) Cultivos en medio derivados de destríos de pimiento	101
iii) Cultivos en medio derivados de destríos de sandía	105
4.4.2. Perfiles de ácidos grasos.....	109
4.4.3. Concentración lipídica y rendimientos en los distintos cultivos realizados	112
4.4.4. Producción de manitol durante los cultivos con <i>Cryptococcus curvatus</i> CL6032	117
4.4.4.1. Determinación de la actividad de la enzima manitol deshidrogenasa	120
4.4.5. Análisis tecno-económico.....	121
4.5. Cultivo de la especie <i>Rhodospiridium toruloides</i> en medio sintético	128
4.6. Cultivo en medios derivados de destríos y residuos lignocelulósicos o celulósicos	130
4.6.1. Estrategia de cultivo <i>fed-batch</i> en medio derivado de destrío con pulsos HPO o HPA	131
i) Cultivo con pulsos de medio HPO	131
ii) Cultivo con pulsos de medio HPA	131
4.6.2. Estrategia de cultivo <i>batch</i> en dos etapas en medio derivado de destrío y de HPO o HPA	138
i) Cultivo en dos etapas: Medio de destrío y medio HPO	139
ii) Cultivo en dos etapas: Medio de destrío y medio HPA	139
4.6.3. Perfiles de ácidos grasos y carotenoides.....	143
4.6.4. Concentración lipídica y rendimientos en los distintos cultivos realizados	148
4.7. Cultivo de levaduras oleaginosas modificadas genéticamente en medios derivados de residuos	154
4.7.1. Estrategia <i>batch</i> en medios derivados de destríos y de HPO	154
i) Cultivo de las cepas productoras de β -caroteno y violaceína	155

ii) Cultivo de la cepa productora de indigoidina	158
4.7.2. Determinación de la concentración de los diferentes productos (β -caroteno, violaceína e indigoidina)	158
4.7.3. Producción de manitol con las cepas modificadas de <i>Yarrowia lipolytica</i>	163
4.8. Número de cetano como indicador de calidad del perfil lipídico para producir biodiésel.....	164
5. CONCLUSIONES	167
5.1. Conclusiones.....	169
5.2. Conclusions	172
6. REFERENCIAS	175
6. Referencias	177
PUBLICACIONES	205
Listado de publicaciones	207

Listado de Abreviaturas

Acetil-CoA: Acetil coenzima A

ACO: Aconitasa

ACLY: ATP-citrato liasa

AMP: Adenosina monofosfato

ATP: Adenosina trifosfato

BHT: Butilhidroxitolueno

CetN: Número de cetano

C/N: Carbono/Nitrógeno

CoA: Coenzima A

D: Tasa de dilución

DMSO: Dimetilsulfóxido

DO: Densidad óptica

EIA: Administración de información energética

EV: Explosión con vapor

FAS: Complejo o sistema ácido graso sintasa

FC: Fuente de carbono

FL: Fracción líquida

GEI: Gases de efecto invernadero

HE: Hidrólisis enzimática

HPA: Hidrolizado enzimático del residuo de papel no reciclado pretratado

HPO: Hidrolizado enzimático del residuo de poda urbana pretratado

IDH: Isocitrato deshidrogenasa

IMP: Inosina monofosfato

Abreviaturas

INRAE: Instituto Nacional de Investigación sobre Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de Francia

MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

MLO: Medio sintético de levaduras oleaginosas

Mtdh: Manitol deshidrogenasa

NAD⁺/NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido (oxidada/reducida)

NADP⁺/NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (oxidada/reducida)

PBS: Tampón fosfato salino

RCR: Residuos celulósicos de rechazo

RE: Retículo endoplasmático

RSM: Residuos sólidos municipales

RSU: Residuos sólidos urbanos

TAGs: Triacilglicéridos

YNB: Medio sintético *Yeast-Nitrogen-Base*

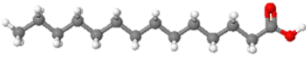
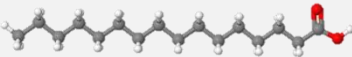
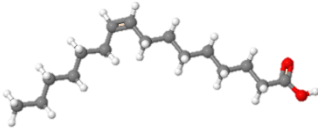
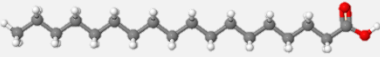
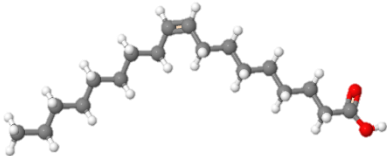
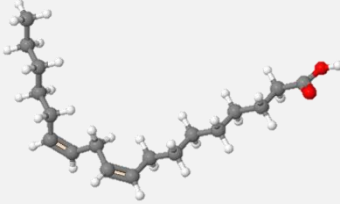
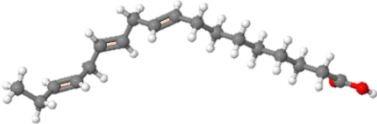
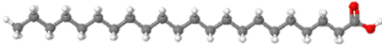
YPD: Medio sintético *Yeast extract-Peptone-Dextrose*

1G: De primera generación

2G-4G: De segunda, tercera y/o cuarta generación (biocombustibles avanzados)

Glosario

Tabla i. Resumen de los ácidos grasos estudiados en esta Tesis

Nombre ácido graso (IUPAC/ común)	Abreviatura (Sistema delta)	Estructura química*
Ácido tetradecanoico / ácido mirístico	C14:0	
Ácido hexadecanoico / ácido palmítico	C16:0	
Ácido cis-9-hexadecenoico / ácido palmitoleico	C16:1 Δ^9	
Ácido octadecanoico / ácido esteárico	C18:0	
Ácido cis-9-octadecenoico/ ácido oleico	C18:1 Δ^9	
Ácido cis,cis-9,12- octadecadienoico / ácido linoleico	C18:2 $\Delta^{9,12}$	
Ácido cis,cis,cis-9,12,15- octadecatrienoico / ácido α -linolénico	C18:3 $\Delta^{9,12,15}$	
Ácido eicosanoico / ácido araquídico	C20:0	
Ácido docosanoico / ácido behénico	C22:0	
Ácido tetracosanoico / ácido lignocérico	C24:0	

*Estructura química en 3D modelada en <https://biomodel.uah.es/en/DIY/JSME/>

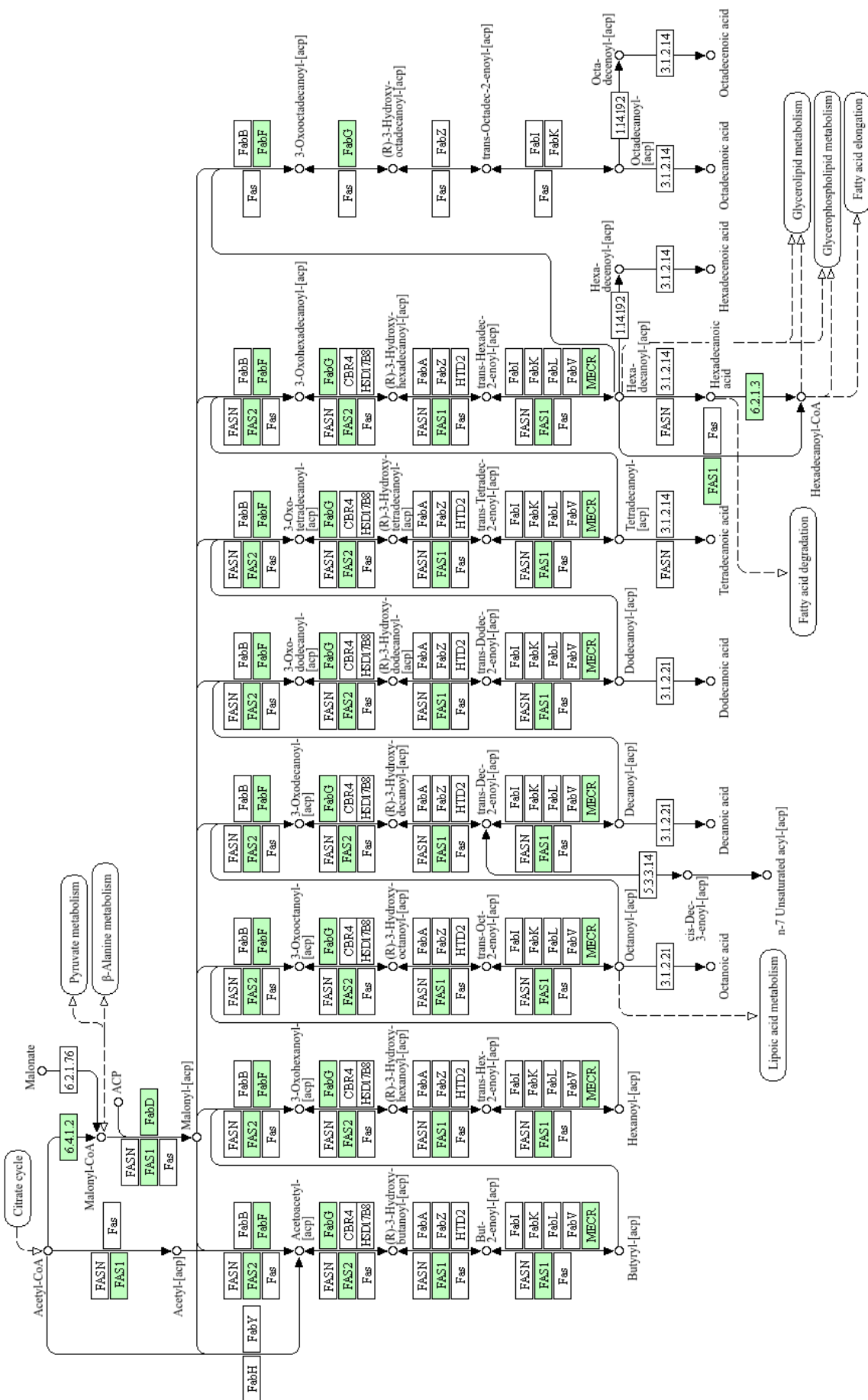
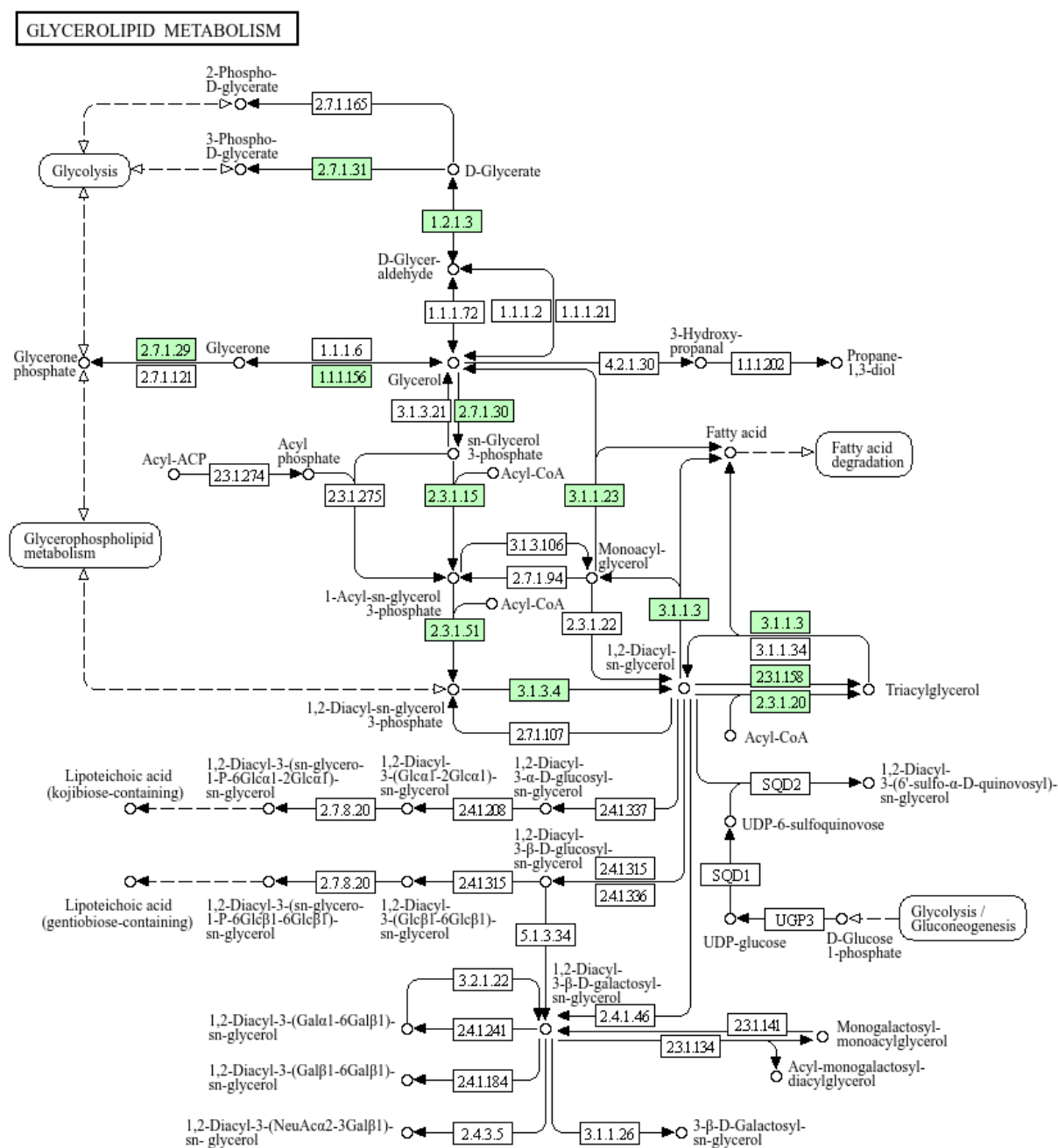


Figura i. Esquema de la biosíntesis de ácidos grasos a partir de los cuales se forman los triacilglicéridos (TAG) según la base de datos KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. En verde se destacan las enzimas y complejos multienzimáticos que intervienen en esta vía de síntesis en la levadura oleaginosas *Yarrowia lipolytica*. Reproducido con el permiso de Kanehisa Laboratories (Kanehisa y col., 2023).



00561 8/17/22
(c) Kanehisa Laboratories

Figura ii. Esquema del metabolismo de glicerolípidos según la base de datos KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. En verde se destacan las enzimas que intervienen en este metabolismo en la levadura oleaginosa *Y. lipolytica*. Reproducido con el permiso de Kanehisa Laboratories (Kanehisa y col., 2023).

Resumen

Actualmente, industria y sociedad tienen que hacer frente a diversos retos referentes a la industria energética, de productos y de nuevas tecnologías debido al gran incremento en la demanda de energía a consecuencia del rápido crecimiento demográfico, así como apostar por recursos más sostenibles, renovables y menos contaminantes, contribuyendo a su vez a la disminución de la generación de residuos. Para ello se deben estudiar e implementar nuevos procesos que garanticen, tanto en la actualidad como en el futuro, el crecimiento sostenible, el empleo de energías y tecnologías más respetuosas con el medio ambiente y el uso eficiente de los recursos vitales para la humanidad.

Uno de los principales retos a afrontar en el sector de la energía, y en concreto el sector del transporte, es la producción sostenible de biocombustibles a costes competitivos que sean al mismo tiempo compatibles con los motores de combustión interna actuales. En este sentido, resulta fundamental promover la transición de los combustibles fósiles hacia los biocombustibles; siendo mejor opción y más beneficiosa progresar desde los biocombustibles de primera generación hacia los biocombustibles avanzados. Estos últimos se pueden producir utilizando microorganismos no convencionales para el desarrollo de bio-procesos y de materias primas económicas como residuos agrícolas, lignocelulósicos o la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos. Estas materias primas no compiten con el sector de la alimentación, al contrario que los cereales y los aceites vegetales usados en los procesos convencionales. En esta transición, la investigación y el desarrollo de nuevos conceptos y procesos, como los estudiados a lo largo de la presente Tesis, desempeñan un papel esencial.

Dentro del sector de los biocombustibles, el biodiésel es un combustible renovable, a diferencia de su homólogo de origen fósil, el diésel o gasoil. El uso del biodiésel contribuye a una mayor sostenibilidad en el sector energético, principalmente al reducir las emisiones de gases de efecto invernadero. La producción actual de biodiésel depende en su mayoría de materias primas de origen vegetal y animal, lo que se traduce en elevados costes finales en los precios de las propias materias. Además, la producción de esa materia compite por tierra fértil, recursos hídricos y cadena de suministro y de transporte, provocando conflictos en relación con su uso como alimento o combustible.

Como alternativa, los aceites obtenidos a partir de microorganismos oleaginosos son fuentes atractivas como precursores de biocombustibles avanzados debido a su capacidad de acumular lípidos neutros en forma de triacilglicéridos (TAGs) y a la composición similar de los ácidos grasos obtenidos con la de los aceites vegetales y las grasas animales empleados para este fin. Resulta esencial el uso de sustratos de bajo coste y de fácil disponibilidad para hacer que los aceites microbianos sean competitivos desde un punto de vista económico. Concretamente, este estudio se ha centrado en la producción de aceite microbiano para su aplicación como biocombustible usando levaduras oleaginosas y azúcares derivados de residuos vegetales como moléculas plataforma del proceso desarrollado, con el objetivo futuro de implementar esta tecnología en el marco de un concepto de biorrefinería.

Las levaduras oleaginosas empleadas en este estudio para producir aceite combustible microbiano, cultivadas en medios derivados de residuos vegetales, pertenecen a las especies *Cryptococcus curvatus*, *Rhodospiridium toruloides* y *Yarrowia lipolytica*. En cuanto los residuos valorizados como nuevas materias primas, para la obtención de medios de cultivo ricos en fuentes de carbono azucaradas de bajo coste, se encuentran residuos procedentes del sector agrícola y urbano. Específicamente, se emplearon destríos de pimiento, de sandía, de tomate y mezcla de diferentes destríos derivados del sector hortofrutícola, al igual que residuos de naturaleza lignocelulósica procedentes de la poda de árboles urbana y del papel no reciclado de la fracción orgánica de los residuos sólidos municipales.

Con el fin de establecer las condiciones de operación óptimas para la producción de aceite microbiano en forma de TAGs y otros productos de valor, utilizando levaduras oleaginosas, se han estudiado diferentes estrategias de cultivo usando los modos de operación *batch* y *fed-batch*. Además, con el objetivo de lograr un proceso lo más rentable y atractivo posible de cara a su escalado industrial, también se ha estudiado la coproducción de lípidos junto con otros compuestos de interés en el mercado como son los carotenoides, e incluso, se ha estudiado el cultivo de cepas de levaduras oleaginosas modificadas genéticamente en medios derivados de residuos vegetales para lograr un proceso con rendimientos y/o tasas de producción mejores o para obtener otros productos de valor que no se producen de forma natural en estas levaduras.

En este sentido, para lograr un almacenamiento significativo de aceites microbianos, y/o la coproducción junto a otros compuestos, es fundamental seleccionar las cepas de levaduras adecuadas, obtener medios de crecimiento de composición adecuada para el cultivo de levaduras además de económicos, así como establecer las condiciones de cultivo determinadas para cada cepa y las estrategias de cultivo más apropiadas para alcanzar el objetivo propuesto.

Abstract

Nowadays, industry and society have to face several challenges related to the energy industry, products and new technologies due to the great increase in the demand for energy as a result of rapid demographic growth, as well as to target at using more sustainable, renewable and less contaminant resources, contributing at the same time to the reduction of waste generation. The development of new processes must be studied and implemented to guarantee in the short-medium perspective, sustainable growth, the use of more environmentally friendly energies and technologies and the efficient use of natural resources.

One of the main challenges that the energy sector must face, mainly involving the transport sector, is the sustainable production of biofuels at competitive costs. In addition, these biofuels should also be compatible with current internal combustion engines. In this respect, it is essential to promote the transition from fossil fuels to biofuels, mainly encouraging the production of advanced biofuels over first generation biofuels. Advanced biofuels can be obtained using non-conventional microorganisms and low-costs raw materials such as agricultural waste, lignocellulosic waste or the organic fraction of municipal solid waste. These raw materials do not compete with the food sector, in contrast to the first generation feedstocks (e.g., vegetable oils, starch-related materials and sugar-based feedstocks). In this transition, the development and implementation of new concepts and processes, such as those studied in this Thesis, play an essential role.

Within the biofuels sector, biodiesel is a renewable fuel, and can be used to replace its fossil-derived homolog, diesel. The use of biodiesel contributes to greater sustainability in the energy sector, mainly by reducing greenhouse gas emissions. Current biodiesel production relies mostly on raw materials of vegetal and animal origin, which results in high final costs in the prices of the raw materials themselves. In addition, feedstock production competes for fertile land, water resources and the supply and transport chain, leading to conflicts over its use as food or fuel.

Alternatively, oils obtained from oleaginous microorganisms are attractive sources as precursors to produce advanced biofuels. Oleaginous microorganisms usually

accumulate neutral lipids in the form of triacylglycerides (TAGs) with similar fatty acid composition to that observed for vegetable oils and animal fats used for biofuel production. The use of low-cost and readily available substrates is also essential to make microbial oils economically competitive. Specifically, this study has focused on the production of microbial oil as biofuel precursor, using non-conventional oleaginous yeasts and vegetable waste-derived sugars as platform molecules for the development of cost-competitive and environmentally friendly bioprocess for the deployment of future biorefineries.

The oleaginous yeasts used in this study to produce microbial oil, belong to the species *Cryptococcus curvatus*, *Rhodospiridium toruloides* and *Yarrowia lipolytica*. These yeast species were grown in sugar-rich media derived from agrifood and urban residues. Specifically, pepper, watermelon and tomato waste and a mixture of wastes from different crops, as well as lignocellulosic waste from urban tree pruning and non-recycled paper from the organic fraction of municipal solid waste, were used as substrates in this Thesis.

In order to establish the optimal operating conditions for the production of microbial oil in the form of TAGs and other valuable products using oleaginous yeasts, different cultivation strategies have been studied using batch and fed-batch operational modes. Furthermore, with the aim of achieving a profitable and attractive process as for industrial scale-up, the co-production of lipids together with other added-value compounds of interest in the market such as carotenoids has also been studied. In addition, the cultivation of genetically modified oleaginous yeast strains in media derived from vegetable waste has been also studied with the aim of contributing to achieve a process with better yields and/or production rates, as well as to maximize the production of alternative valuable products of interest.



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Biocarburantes avanzados en el contexto de una economía sostenible

El rápido crecimiento económico y la expansión demográfica han aumentado de forma drástica la demanda energética global, presentándose la producción de energía como un desafío importante a abordar a corto-medio plazo. A su vez, la dependencia actual de los combustibles fósiles y su uso excesivo conduce a una grave contaminación ambiental, provocando el calentamiento global y suponiendo un riesgo para la salud humana con el aumento de la morbilidad y mortalidad por enfermedades cardiovasculares y respiratorias, entre otras (Lelieveld y col., 2019). Además, este uso masivo de combustibles fósiles afecta también a su viabilidad como recurso, al tratarse de fuentes no renovables y finitas. Por estas razones, es vital sustituir los combustibles fósiles como fuente tradicional de energía mediante una transición hacia energías más sostenibles y respetuosas con el medio ambiente (Cherwoo y col., 2023). Una alternativa es el uso de energías renovables, las cuales juegan un papel fundamental en el enfoque nacional e internacional para la mitigación de los problemas energéticos y ambientales derivados del abuso y dependencia de los combustibles no renovables como son el petróleo, el carbón y el gas natural.

Dentro del sector energético, los biocombustibles avanzados representan una de las opciones disponibles y más adecuadas para descarbonizar el transporte, sobre todo para la aviación, el mar y los vehículos pesados que actualmente no disponen de otras opciones inmediatas (Panoutsou y col., 2021). La necesidad de una transición hacia el uso de alternativas sostenibles en el sector energía/transporte es por tanto fundamental. Esta concienciación se puso de manifiesto en la cumbre del clima COP28 (Conferencia de las Partes), donde en la clausura se expuso la siguiente declaración: “El comienzo del fin de la era de los combustibles fósiles” (“*Beginning of end of fossil fuel era*” (Acuerdo COP28)), quedando recogida en la sección de noticias de diciembre de 2023 de la revista *Nature* (Sanderson, 2023) al igual que en el portal web (*UN Climate Change-COP28*, 2023) de la propia cumbre (Worth, 2023). En esta cumbre se instó a dejar de emplear combustibles fósiles en el sector energía de acuerdo con la ciencia y evolucionando hacia lograr el objetivo de cero emisiones netas para el año 2050. Para lograr dicho objetivo y avanzar hacia la descarbonización del sistema energético, se requiere de la investigación en el área de los biocombustibles para diversificar la matriz energética, combinar diferentes fuentes de energía y terminar con la explotación de los recursos fósiles. Todo

Introducción

ello tiene que estar respaldado a través de una transición justa, rápida y equitativa, favoreciendo los recortes de emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) y una mayor financiación que apoye las bases del cambio hacia el uso de energías renovables, donde se incentiven la investigación en este sector, las nuevas infraestructuras y proyectos sobre este ámbito, así como los programas que ofrezcan beneficios por el uso de energías renovables como, por ejemplo, deducciones de impuestos, etc.

Entre las alternativas renovables, los biocombustibles obtenidos a partir de biomasa y/o aquellos de origen biogénico, desempeñan y desempeñarán un papel clave para llevar a cabo la transición energética (Karka y col., 2021). Dependiendo del sustrato utilizado, de los métodos de producción y de la tecnología implementada se pueden encontrar diferentes tipos de biocombustibles. Una de las clasificaciones más comúnmente utilizadas es la que tiene en cuenta la materia prima. En este sentido, encontramos los biocombustibles de primera generación (1G), derivados de materias primas azucaradas y amiláceas, y los biocombustibles avanzados (2G, 3G y 4G), que se obtienen a partir de biomasa lignocelulósica, algal y residuos agrícolas e industriales (Sims y col., 2010; Panoutsou y col., 2021).

En 2022, la Administración de Información Energética de Estados Unidos (EIA) registró una producción global de biocombustibles 1G de 2.810.000 b/d (barriles por día). En este mismo año, Estados Unidos se posicionó como el principal productor de biocombustibles a nivel mundial con 1.206.000 b/d (entre bioetanol y biodiésel), superándose la producción de diésel renovable 1G estimada por la EIA, siendo la producción estimada de 170.000 b/d y la producción final de 213.000 b/d (Troderman y Shi, 2023). Los países que siguieron la lista en segunda y tercera posición con respecto a la producción de biocombustibles 1G en 2022 fueron Brasil e Indonesia, con una producción total de 592.000 b/d y 188.000 b/d, respectivamente, mientras que la producción de biocombustibles en España alcanzó los 41.000 b/d (7800 b/d de bioetanol y 33.000 b/d de biodiésel) (EIA, 2022). Estos biocombustibles 1G son los que actualmente se producen y comercializan junto con el gasoil y gasolina procedentes de recursos fósiles. El biodiésel 1G, derivado de semillas oleaginosas, se puede encontrar principalmente en mezclas B5-B20, correspondiéndose a mezclas del 5 al 20 % (v/v) de biodiésel en diésel elaborado a partir de petróleo (gasóleo o gasoil) (Ogunkunle y Ahmed, 2019). El bioetanol 1G, derivado principalmente de caña de azúcar y maíz en América y

de remolacha azucarera en Europa, puede encontrarse en mezclas con gasolina con porcentajes más variados que el biodiésel, desde E5 a E85, incluso usándose sin mezclar con gasolina como E100 (hidratado con agua <5 % v/v). Sin embargo, mientras que las mezclas E5-E15 pueden usarse en los motores convencionales de combustión interna sin modificar, el E100 o mezclas con gasolina con un alto porcentaje de bioetanol requiere de modificaciones en el motor o de vehículos específicamente diseñados para ese combustible (Belincanta y col., 2016; Mohammed y col., 2021).

No obstante, actualmente existe la necesidad de promocionar biocombustibles avanzados y fomentar una transición de los biocombustibles 1G a los biocombustibles 2G-4G dentro del sector energía/transporte. Esto es debido a los conflictos generados entre el sector de los biocombustibles de primera generación con el sector de la alimentación, al competir ambos sectores por tierra fértil, recursos hídricos y energía (Pimentel y col., 2008), además de los conflictos éticos que se generan con el destino de cultivos alimentarios para la producción de combustible y no para consumo humano o animal (Lee y Lavoie, 2013).

La valorización de residuos para la producción de biocombustibles avanzados es un punto primordial y necesario frente al empleo de cultivos vegetales en la producción de biocombustibles 1G, debido a la competencia de estos últimos con el uso de ciertos recursos y con la cadena de suministros de alimentos, lo que provoca, entre otros inconvenientes, un incremento de los costes de estas materias primas, como por ejemplo, los aceites vegetales comestibles (Niño-Villalobos y col., 2020; Sánchez-Solís y col., 2024). Igualmente, evitar la explotación de nuevos recursos y conectar los residuos o subproductos generados en las salidas de ciertos procesos con las entradas de otros al emplearlos como materias primas, representa una ventaja en términos tanto de reducción de costes como de producción de desechos. Además, resuelve la mayoría de los inconvenientes surgidos de destinar cultivos vegetales al sector de la producción de los carburantes. Esta evolución en la estrategia de producción estaría contribuyendo a la implementación de una bioeconomía circular.

El concepto de bioeconomía engloba aquellas actividades en las que se genera un valor económico usando recursos de origen biológico para generar bio-productos y bioenergía, sustituyendo el carbono fósil por carbono biológico u orgánico procedente

Introducción

de diferentes actividades industriales y domésticas. El otro concepto es el de economía circular, donde se engloban actividades en la que se genera un valor económico empleándose carbono reciclado para reducir al mínimo la generación de residuos y evitar usar más carbono fósil u otros recursos en el proceso, haciendo un ciclo económico más sostenible y con bajas emisiones de carbono (Mestre, 2018).

Por lo tanto, con la combinación de ambos términos se podría lograr un proceso en el que se emplee carbono reciclado para, tras una transformación biológica, obtener carbono de origen biológico destinado a la producción de biocombustibles avanzados, poniendo en valor tanto las materias primas como los productos finales; comprendiendo el desarrollo de biorrefinerías que integren la producción de energía y bio-productos con el tratamiento responsable del medio ambiente, y a su vez, cerrando la brecha entre la remediación de residuos y la recuperación de productos (Salazar y Cárdenas, 2013; Dahiya y col., 2018).

1.2. Biorrefinerías para la generación de biocombustibles y otros productos de valor

La definición de biorrefinería conforme al Laboratorio Nacional Estadounidense de Energías Renovables (*American National Renewable Energy Laboratory – NREL* (<https://www.nrel.gov/>)) se ajusta al concepto de estructura de producción que integre equipamiento adecuado y procesos de conversión de biomasa para generar energía como calor, biocombustibles y electricidad, además de otros productos de valor añadido. Para conseguir un amplio espectro de productos se requiere la combinación de diferentes procesos y tecnologías en una misma instalación, donde se usen y aprovechen eficientemente todos los recursos empleados y subproductos generados, asegurando la sostenibilidad del proceso global. Se espera de las biorrefinerías que tengan un papel fundamental en la generación de materiales, productos químicos y energías que cubran la alta demanda energética actual, permitan el desarrollo de las actividades antropogénicas y contribuyan a la implementación de una bioeconomía sostenible (Carmona-Cabello y col., 2018).

Entre las materias primas usadas en biorrefinerías podrían encontrarse residuos de origen biológico procedentes de espacios agrícolas, forestales, industriales y urbanos, entre otros. Estos residuos orgánicos adquirirían un valor al ingresar como recurso en estas plataformas industriales, ya que se componen de una alta concentración y variación

de carbohidratos y otros elementos de gran atractivo para ser utilizados en procesos biotecnológicos y producir nuevos compuestos de interés.

En una biorrefinería multiproducto, los biocombustibles entrarían dentro del abanico de productos que podrían obtenerse. Un ejemplo de este procedimiento sería el utilizar los carbohidratos derivados de los residuos orgánicos como moléculas plataformas de un proceso biológico de acumulación de aceite microbiano utilizando microorganismos oleaginosos, definiéndose en este contexto como “plataforma” al conjunto de productos intermedios que se obtienen tras diferentes transformaciones de la biomasa empleada; mientras que los aceites (triacylglicéridos) almacenados por los microorganismos serían las moléculas base (*building blocks*) sobre las que producir biocombustibles avanzados u otros productos de interés industrial (García-Aparicio, 2008).

1.3. Producción de triacylglicéridos como moléculas base de biocombustibles avanzados

Uno de los biocombustibles más prometedores como fuente de energía renovable y alternativa a los combustibles fósiles es el biodiésel, el cual se puede obtener a partir de semillas y aceites vegetales (comestibles y no comestibles), así como de grasas animales, de aceite de cocina usado, de aceite microbiano y de aceite de algas (Sorate y Bhale, 2015; Wang y col., 2023). Entre las ventajas de este combustible se encuentran la baja concentración o nulo contenido de azufre, la ausencia de compuestos aromáticos, el alto punto de ignición o inflamación, la biodegradabilidad, la lubricidad que presenta, la reducción de la mayoría de las emisiones de escape, la miscibilidad con el diésel derivado de recursos fósiles y la compatibilidad con la infraestructura de transporte y distribución del combustible actual (Knothe y Razon, 2017).

El biodiésel puede ordenarse en cuatro generaciones (Sánchez-Solís y col., 2024):

- Primera generación (1G): combustible a partir de aceites comestibles derivados de cultivos vegetales (semillas oleaginosas).
- Segunda generación (2G): combustible a partir de aceites no comestibles, aceite de cocina usado y de efluentes industriales y residuos lignocelulósicos utilizados

Introducción

como sustratos para la producción de aceite microbiano usando hongos, bacterias o levaduras.

- Tercera generación (3G): combustible a partir de aceite producido por microalgas.
- Cuarta generación (4G): combustible a partir de aceite procedente de microorganismos modificados genéticamente para mejorar la acumulación de lípidos y el proceso de extracción de estos.

La producción de biodiésel avanzado implica el uso de microorganismos oleaginosos que acumulen intracelularmente un alto contenido de lípidos neutros o triacilglicéridos (TAGs) (constituidos por tres ácidos grasos unidos a una molécula de glicerol). Se denominan microorganismos oleaginosos a aquellos capaces de acumular lípidos (ácidos grasos en forma TAGs) por encima del 20 % de su biomasa seca celular (Rakicka y col., 2015). La mayoría de estos microorganismos requieren de factores estresantes como la escasez de nutrientes para estimular la síntesis de lípidos. Tras la biosíntesis de lípidos, estos se extraen de forma mecánica, usando disolventes, enzimas u otros medios. Finalmente, los lípidos neutros se someten a un refinado químico (transesterificación entre TAGs y un alcohol de cadena corta) para producir ésteres u otras moléculas objetivo, obteniéndose glicerol y ácidos grasos individuales (Huang y col., 2012; Sitepu y col., 2014a).

Entre los principales organismos en estudio empleados para la producción de bio-aceites se pueden encontrar bacterias, microalgas, hongos filamentosos y también cultivos vegetales que presentan semillas y frutos oleaginosos (palma/soja/girasol). La Tabla 1.1 recoge las principales fuentes de producción de bio-aceites así como el porcentaje de lípidos y la composición de ácidos grasos acumulados (Fassinou y col., 2010; Yu y col., 2011; Thevenieau y Nicaud, 2013; Issariyakul y Dalai, 2014; Fei y col., 2016; Gardeli y col., 2017; Heikal y col., 2017; Lee y col., 2017; Saisriyoot y col., 2019; Sathiyamoorthi y col., 2019; Carsanba y col., 2020; Feng y col., 2020; Shaigani y col., 2021; Wang y col., 2022).

Tabla 1.1. Comparación del porcentaje de lípidos y de la composición de ácidos grasos acumulados por diferentes organismos oleaginosos

Procedencia de lípidos	Lípidos (% p/p)	Composición Ácidos Grasos principales (% p/p)							Referencias
		C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	
CULTIVOS VEGETALES									
Palma	48-50	0,1	39,3	0,2	4,4	42,5	11,4	-	(Thevenieu y Nicaud, 2013; Heikal y col., 2017)
Girasol	40-45	-	5,2	0,1	3,7	33,7	56,5	-	(Thevenieu y Nicaud, 2013; Issariyakul y Dalai, 2014)
Colza	45-48	-	3,0	-	1,0	64,4	23,3	8,0	(Fassinou y col., 2010; Thevenieu y Nicaud, 2013)
Soja	20-40	-	10,1	-	4,3	22,3	53,7	8,1	(Thevenieu y Nicaud, 2013; Issariyakul y Dalai, 2014)
Coco	45-50	-	23,3	0,9	24,5	28,7	3,9	-	(Fassinou y col., 2010; Thevenieu y Nicaud, 2013)
LEVADURAS									
<i>Rhodosporidium toruloides</i>	60-77	1,3	25,1	-	10,1	45,9	10,5	3,3	(Thevenieu y Nicaud, 2013; Fei y col., 2016; Wang y col., 2022)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	20-45	-	6,0	-	2,0	56,0	19,9	-	(Yu y col., 2011; Thevenieu y Nicaud, 2013; Carsamba y col., 2020)
<i>Cryptococcus albidus</i>	31-60	-	20,0	-	5,0	42,0	25,0	8,0	(Thevenieu y Nicaud, 2013; Lee y col., 2017; Sathiyamoorthi y col., 2019)
<i>Cutaneotrichosporon oleaginosus</i>	62	-	30,8	9,2	-	54,3	5,3	0,4	(Shaigani y col., 2021)
<i>Lipomyces starkeyi</i>	55-63	-	36,2	-	4,5	46,3	3,4	-	(Yu y col., 2011; Thevenieu y Nicaud, 2013; Wang y col., 2022)
MICROALGAS									
<i>Chlorella</i> sp.	32-53	-	19,0	10,9	4,0	9,0	14,0	19,0	(Thevenieu y Nicaud, 2013; Feng y col., 2020)
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	23	13,0	23,0	-	3,0	8,0	-	-	(Thevenieu y Nicaud, 2013)
HONGOS									
<i>Pythium ultimum</i>	48	-	15,0	-	2,0	20,0	16,0	1,0	(Thevenieu y Nicaud, 2013)
<i>Mortierella isabellina</i>	50-60	-	29,0	-	3,0	55,0	3,0	3,0	(Thevenieu y Nicaud, 2013; Gardeli y col., 2017)
BACTERIA									
<i>Rhodococcus opacus</i>	26-30	-	-	19,0	74,0	-	-	-	(Thevenieu y Nicaud, 2013; Saisriyoot y col., 2019)

Introducción

Dentro de los diferentes organismos oleaginosos, las levaduras presentan una serie de ventajas frente al resto. A continuación, se destacan algunas de estas ventajas:

1. Capacidad de crecer bajo condiciones controladas en biorreactores, por lo que no requieren grandes espacios para su cultivo ni ocupar grandes superficies de terreno como en el caso de los cultivos vegetales, suponiendo menos inconvenientes de espacio e infraestructura para el escalado en plantas industriales (biorrefinerías) (Li y col., 2008; Chatterjee y Mohan, 2018).
2. Con respecto a los cultivos vegetales, presentan alta tasa de crecimiento y requerimiento de menos mano de obra para su empleo y manipulación. Tiempos de crecimiento mucho menores ya que el ciclo de vida de las levaduras es más corto que el de las plantas (Li y col., 2008; Chatterjee y Mohan, 2018).
3. Uso de una mayor gama de azúcares y otras fuentes de carbono como alcoholes o ácidos grasos, además de exhibir mayor tolerancia a iones metálicos y a menor concentración de oxígeno comparado con otros hongos (Qin y col., 2017).
4. El cultivo de levaduras se ve menos afectado por diferencias del clima que las microalgas, las cuales dependen de una fuente de luz para crecer y alcanzar altas densidades de biomasa celular (Li y col., 2008; Qin y col., 2017).
5. Se conocen cepas de levaduras capaces de coproducir lípidos y otros compuestos de alto valor añadido de forma natural como carotenoides (β -caroteno, toruleno, astaxantina y torularodina) (Kot y col., 2019; Bertacchi y col., 2020). No obstante, algunas microalgas también son capaces de producir carotenoides como luteína y astaxantina (Minhas y col., 2016).
6. El mayor tamaño celular facilita la etapa de recolección respecto a las bacterias. A su vez, los cultivos con levaduras son más resistentes frente a las infecciones víricas y gracias a su capacidad de crecer a niveles bajos de pH hace que sean menos susceptibles a la contaminación bacteriana (Sitepu y col., 2014a; Qin y col., 2017) (Sánchez-Solís y col., 2024).
7. Gran desarrollo y disponibilidad de diversas herramientas y protocolos de biología sintética e ingeniería metabólica aplicados a levaduras oleaginosas,

como *Yarrowia lipolytica*, para la transformación y el diseño de cepas microbianas con nuevas propiedades fisiológicas y/o metabólicas y de interés industrial (Park y Ledesma-Amaro, 2023).

8. Y en general, capacidad de acumular más de un 70 % de lípidos con respecto a su peso seco celular (Li y col., 2007b), presentando una composición de ácidos grasos adecuada para destinar a la producción de biodiésel (Thevenieau y Nicaud, 2013), similar a la de algunos aceites vegetales empleados con este fin (Liu y col., 2021) (Tabla 1.1).

Entre los cultivos vegetales más usados para la producción de biodiésel se encuentran la soja, la colza, el girasol y la palma aceitera, siendo este último de gran interés y valor en algunos países, como por ejemplo Indonesia y Malasia, (Papilo y col., 2022). Aludiendo al perfil similar de ácidos grasos acumulados por cultivos vegetales oleaginosos y por levaduras oleaginosas, se destaca de la Tabla 1.1 la similitud entre el aceite obtenido de la palma y el obtenido de las levaduras indicadas, donde los ácidos grasos mayoritarios son el ácido oleico (C18:1) seguido del ácido palmítico (C16:0) cuya estructura química se recoge en la Figura 1.1, así como en la Figura i en el Glosario de ácidos grasos junto con información más ampliada. Perfil muy parecido también al producido por el hongo *Mortierella isabellina* (Gardeli y col., 2017). Entre las levaduras señaladas en la Tabla 1.1, las del género *Rhodosporidium*, *Cryptococcus* y *Lipomyces* son las que alcanzan, según los datos reportados en la bibliografía, mayor acumulación de lípidos intracelulares, aproximándose al 70 % en algunas especies como *Rhodosporidium toruloides*.

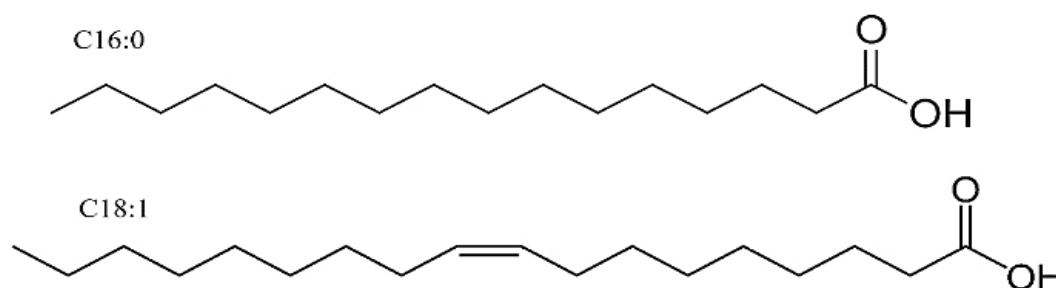


Figura 1.1. Representación del ácido graso saturado C16:0 (ácido palmítico) y del ácido graso insaturado C18:1 (ácido oleico); encontrándose entre los más representativos del perfil de acumulación de levaduras oleaginosas.

Introducción

Las levaduras oleaginosas han sido estudiadas durante décadas, sin embargo, en los últimos años se ha observado un desarrollo significativo en sus aplicaciones biotecnológicas mostrándose algunas de estas en los siguientes puntos (Spagnuolo y col., 2019):

- Desarrollo de nuevas cepas con la introducción de genes heterólogos. Expresión de enzimas heterólogas que pueden contribuir a la formación de nuevos productos de interés como alcanos, alcoholes grasos y pigmentos, o a la mejora de la capacidad de acumulación de lípidos; siendo *Y. lipolytica* de las mejor estudiadas y con la mayor cantidad de herramientas genéticas desarrolladas para su modificación.
- Crecimiento en fuentes de carbono alternativas, ya que presentan flexibilidad metabólica de manera natural para asimilar diversos sustratos como glicerol, xilosa, acetato e incluso compuestos aromáticos, sobre todo levaduras del género *Rhodospiridium*, *Cutaneotrichosporon* o *Lipomyces*, por encima del género *Yarrowia*.
- Conocimiento más extendido del genoma de especies de levaduras oleaginosas y de las rutas metabólicas responsables de la producción de lípidos y por ende de los factores que tienen mayor influencia sobre la acumulación, condiciones de cultivo más favorables, condiciones de mayor estrés, etc.

1.3.1. Metabolismo de síntesis de triacilglicéridos en levaduras oleaginosas

La biosíntesis lipídica o lipogénesis puede llevarse a cabo mediante dos rutas principales (Huang y col., 2017; Rafiq y col., 2023):

- Síntesis *ex novo*: a partir de sustratos hidrofóbicos como aceites o alcanos. Se halla asociada al crecimiento que ocurre simultáneamente con el desarrollo y reparación celular.
- Síntesis *de novo*: a partir de sustratos hidrofílicos como azúcares o similares. Se halla asociada a la disponibilidad de enzimas como por ejemplo la enzima ATP-citrato liasa (ACLY) e isocitrato deshidrogenasa (IDH).

Entre los sustratos hidrofóbicos para la síntesis de lípidos *ex novo* en levaduras oleaginosas se pueden encontrar ácidos grasos volátiles (AGVs) o de cadena corta, aceites, alcanos o gases como metano y dióxido de carbono. A través de la fermentación anaeróbica de residuos orgánicos se pueden producir AGVs como ácido acético, propiónico, butírico, caproico, etc., considerados muy adecuados como sustratos para la producción de lípidos, entre otras aplicaciones biotecnológicas (Tomás-Pejó y col., 2023; Qin y col., 2024), o también, a partir de esos residuos, por digestión anaerobia se puede producir biogás (gases de un C como CH₄ y CO₂), que puede destinarse directamente como fuente de carbono alternativa y verde a la producción de aceite microbiano para su conversión a biodiésel (Sana y col., 2023).

En la literatura pueden encontrarse diversos estudios de síntesis de lípidos *ex novo* usando levaduras oleaginosas como *Y. lipolytica*. Entre ellos se pueden encontrar el de Papanikolaou y col. (2007) donde estudiaron la acumulación de lípidos en esta levadura en un medio sintético con 10 g/L de estearina como única fuente de carbono (estearina: grasa sólida industrial compuesta al 100 % (p/p) de ácidos grasos libres) y 0,5 g/L de (NH₄)₂SO₄, logrando un contenido lipídico de aproximadamente 50 % (p/p). Por otro lado, Morales-Palomo y col. (2022) observaron una acumulación de 43,4 % de lípidos (p/p) en *Y. lipolytica* ACA DC 50109 usando 15 g/L de AGVs a una relación C/N 200 y una relación ácido acético:hexanoico de 6:1, ya que tanto la relación C/N como el perfil de los AGVs empleados como sustrato para la producción lipídica jugaron un papel fundamental en la producción de TAGs en la levadura de este estudio.

La síntesis de lípidos *de novo* en levaduras oleaginosas, estudiada en la presente Tesis, se favorece en condiciones de presencia de una fuente carbono como la glucosa o exceso de esta, con limitación principalmente de nitrógeno como se muestra en la Figura 1.2, aunque la limitación de otros componentes como el fósforo, zinc, magnesio, etc., también pueden favorecer la acumulación lipídica a través de esta ruta (González y col., 2020b; Caporusso y col., 2021). El agotamiento o falta de nitrógeno exógeno se mitiga a través de la activación de una vía endógena para el suministro de nitrógeno a la célula, ya que este nutriente primario es necesario para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Esta vía comienza con la activación de la adenosina monofosfato desaminasa (AMP-desaminasa). La AMP-desaminasa cataliza la escisión de adenosina monofosfato (AMP) para generar NH₄⁺ e inosina monofosfato (IMP), suministrando así a la célula de

Introducción

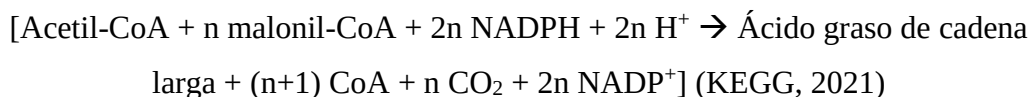
una fuente de nitrógeno. Este proceso provoca la reducción de los niveles de AMP intracelular, bloqueando el ciclo de Krebs a través de la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH), que requiere de AMP para su llevar a cabo su acción catalítica. Con lo cual, esta vía endógena de suministro de nitrógeno tiene una retroalimentación negativa sobre el ciclo de Krebs que resulta en la acumulación de isocitrato en la mitocondria (Takaku y col., 2020; Caporusso y col., 2021) como se muestra en la Figura 1.2.

Este desajuste se equilibra con la acción de la enzima aconitasa (ACO), que puede convertir el isocitrato de nuevo en citrato, el cual se exporta fuera de la mitocondria por la lanzadera de citrato-malato (González y col., 2020b). Finalmente, el citrato citosólico se convierte, con consumo de ATP, en oxalacetato y acetil-CoA por la ATP-citrato liasa (ACLY), una enzima citosólica presente en levaduras oleaginosas (clave durante la lipogénesis) y que no se ha descrito en otras levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (Muniraj y col., 2015).

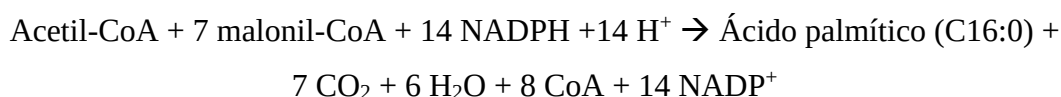
El acetil-CoA es el sustrato o molécula base en la vía anabólica de lípidos, ya que a partir de esta molécula y mediante la acción de la acetil-CoA carboxilasa, se obtiene malonil-CoA, precursor inicial en la biosíntesis de ácidos grasos en levaduras y hongos, como puede observarse en la Figura i del glosario (Kanehisa y col., 2023). El acetil-CoA también se sintetiza en la mitocondria a partir del piruvato procedente de la glucólisis (Figura 1.2). Sin embargo, la membrana interna de la mitocondria es impermeable al acetil-CoA, que no puede atravesarla por difusión simple cuando se sintetiza en este orgánulo. Por lo tanto, a partir del acetil-CoA se produce citrato mitocondrial que se exporta al citosol por el mecanismo de transporte malato/citrato como ya se ha mencionado anteriormente, pudiendo generar de nuevo acetil-CoA en el citosol para la síntesis de TAGs, mediante la ACLY.

La biosíntesis de ácidos grasos comienza, por tanto, tras la conversión de acetil-CoA en malonil-CoA como se muestra en la Figura i del glosario. A continuación, se llevan a cabo diferentes reacciones enzimáticas (reacciones cíclicas de condensación, reducción y deshidratación) catalizadas por el complejo o sistema ácido graso sintasa (FAS) a expensas de NADPH (procedente de la ruta de las pentosas fosfato), donde tiene lugar una fase de iniciación, otra de elongación y una de terminación. El NADPH para la síntesis de ácidos grasos proviene sobre todo de la vía de las pentosas fosfato (Herráez,

2024), concretamente de la actividad de las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (Passoth, 2017). A continuación, se muestra la reacción de este ciclo llevada a cabo por el complejo multienzimático FAS:



El producto final de esta reacción llevada a cabo en el citosol es el ácido palmítico (C16:0). Esta vía produce ácidos grasos saturados de hasta 16 átomos de carbono, mientras que una mayor elongación y etapas de desaturación tienen lugar en el retículo endoplásmico (RE) (Caporusso y col., 2021; Pham y col., 2021). A continuación, se muestra la estequiometría de la reacción para producir C16:0:



La ruta de biosíntesis puede continuar con la esterificación del ácido palmítico con la coenzima A, formando palmitoil-CoA. El palmitoil-CoA es transportado al RE para sintetizar otros ácidos grasos a través de reacciones de elongación y desaturación. La síntesis de aceite microbiano como reservorio energético culmina con la producción de TAGs en el RE. Esta síntesis comienza con la formación de ácido fosfatídico a partir del glicerol-3-fosfato, derivado principalmente de la vía del glicerol-3-fosfato como puede observarse en la Figura ii del glosario. El ácido fosfatídico se convierte posteriormente en diacilglicérido que, mediante la adición de un acil-CoA, se convierte en TAG, almacenándose estos últimos finalmente en vesículas lipídicas en el citoplasma (Gonçalves y col., 2014; Caporusso y col., 2021; Pham y col., 2021).

Por lo tanto, se puede decir que la acumulación intracelular de vesículas de TAGs se ve motivada por un desequilibrio en el metabolismo celular, desencadenado por la ausencia o déficit de ciertos nutrientes o elementos como el nitrógeno. Con lo cual, optimizar las condiciones de cultivo, aplicar las estrategias adecuadas y obtener un medio de crecimiento que desencadene la formación de estos cuerpos lipídicos, son puntos clave para la obtención de ácidos grasos que puedan ser explotados en la industria del biodiésel, entre otras industrias.

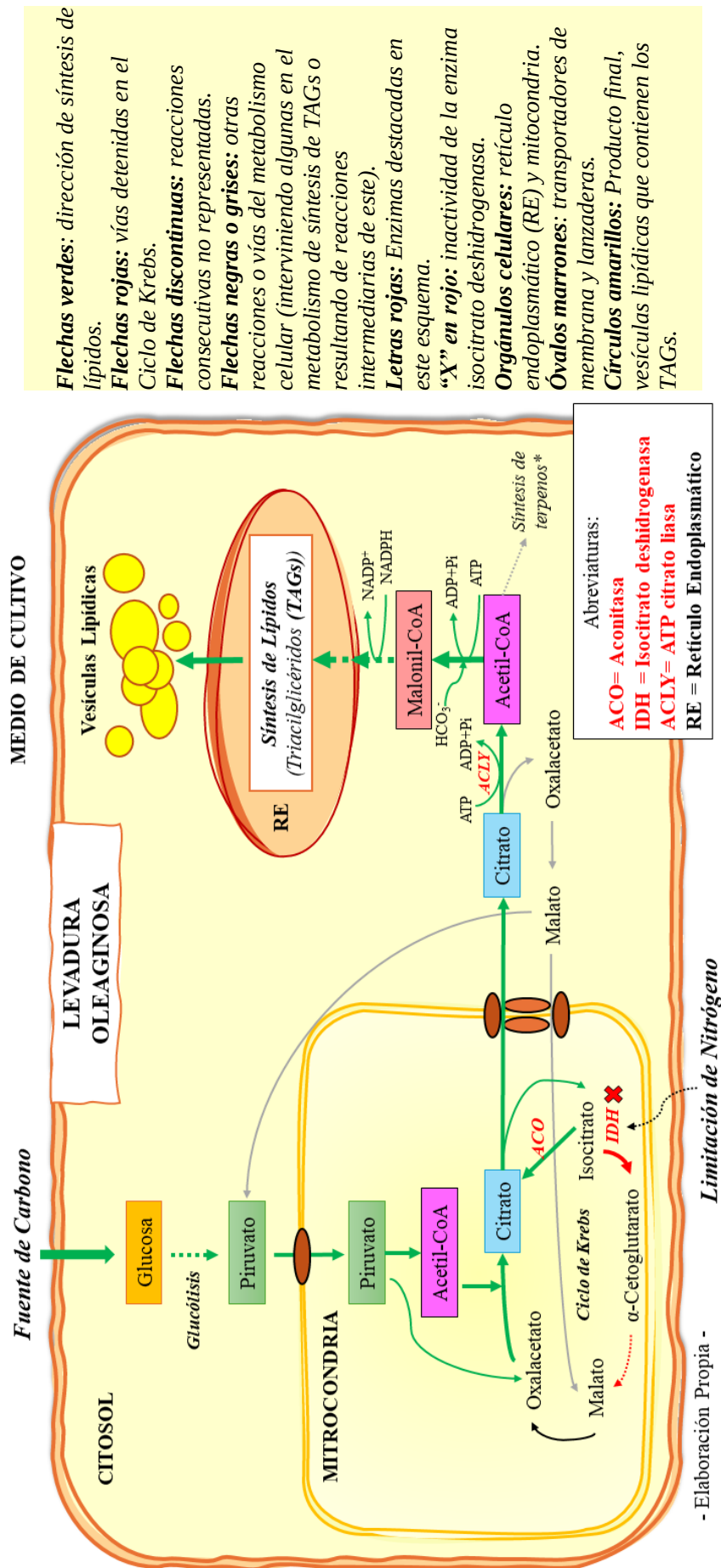
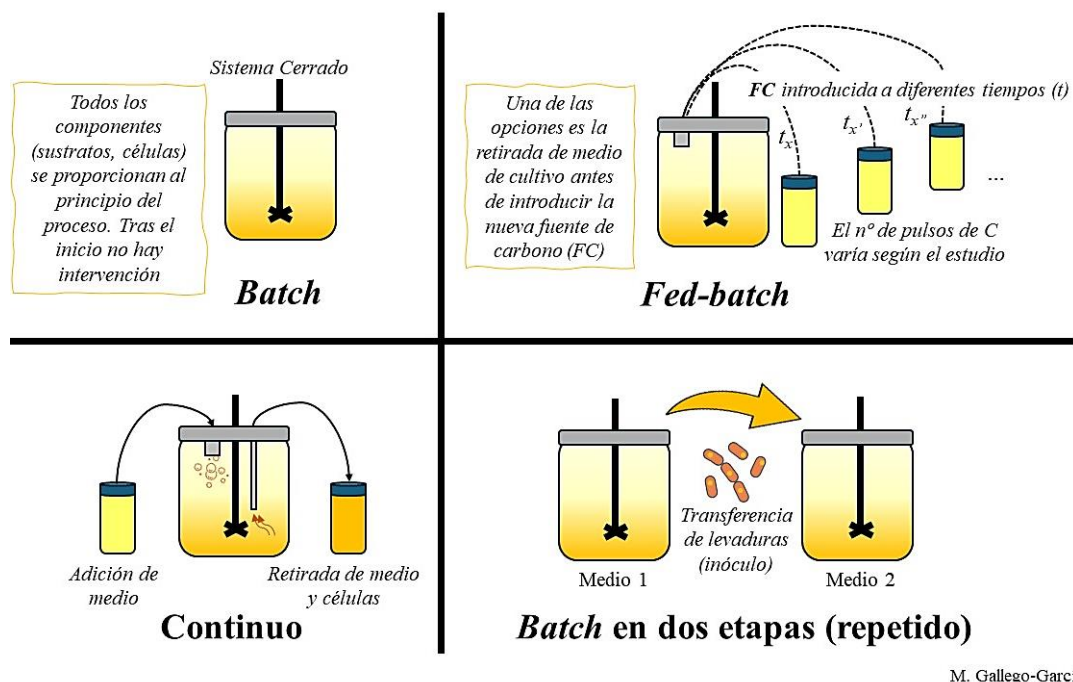


Figura 1.2. Resumen de la vía de síntesis de triacilglicéridos (TAGs), síntesis "de novo" de lípidos, a partir de una fuente de carbono azucarada como la glucosa y por limitación de nitrógeno, en levaduras oleaginosas. *En algunas levaduras oleaginosas se puede obtener la coproducción de lípidos y compuestos de alto valor añadido como terpenos (carotenoides).

1.3.2. Estrategias de cultivo

El modo de cultivo y la optimización de las condiciones de cultivo son claves para un crecimiento celular adecuado y para la obtención de compuestos deseados como los TAGs. Existen varias estrategias de cultivo, quedando las más comunes o conocidas como la estrategia *batch*, *fed-batch* o en modo continuo reflejadas en la Figura 1.3.



M. Gallego-García

Figura 1.3. Estrategias de cultivo empleadas en la producción de bio-aceites u otros compuestos deseados.

Las estrategias principales para fomentar la acumulación intracelular de lípidos en levaduras oleaginosas se describen a continuación en mayor detalle:

i) Modo Batch

La estrategia *batch* o cultivo por lotes es el modo de cultivo más sencillo empleado en el estudio de producción de lípidos y el más usado en la fermentación convencional. En este modo de cultivo no hay entrada ni salida de medio, pues todos los nutrientes del estudio están presentes desde el inicio. En el caso de levaduras oleaginosas, suministrando una fuente de carbono y energía y limitando la fuente de nitrógeno se desencadenaría la síntesis lipídica en presencia de O_2 . También hay diferentes

Introducción

modalidades de esta estrategia de cultivo, existiendo la posibilidad de hacer cultivos en *batch* en diferentes etapas (proceso descrito en el punto iii) de este apartado).

A diferencia de cultivos en matraces en los que habría control de temperatura y agitación para airear el medio, si se utiliza un biorreactor también podrían controlarse activamente el pH, la aireación, la formación de espumas, la condensación del medio, etc. (Karamerou y Webb, 2019).

El modo *batch* se utiliza sobre todo para el estudio de optimización de las condiciones de cultivo o para el estudio de cepas de levaduras cuyas características están siendo investigadas (Huang y col., 2013; Tchakouteu y col., 2015). En el estudio de levaduras oleaginosas, esta estrategia presenta la limitación de obtener un bajo rendimiento de biomasa celular por partir de bajas concentraciones de nitrógeno, o presentar inhibición de crecimiento por sustrato (altas relaciones C/N) (Kitcha y Cheirsilp, 2011; Braunwald y col., 2013; Osorio-González y col., 2023).

Asimismo, la presencia inicial de una alta concentración de glucosa podría generar otros productos que no son el deseado y por lo tanto verse reducida la eficacia del flujo de carbono (Bisen y Sharma, 2013; Braunwald y col., 2013). Por ejemplo, Antonopoulou y col. (2020) observaron que la levadura *Trichosporon fermentans* derivó el flujo de carbono hacia la producción de etanol, incluso en presencia de oxígeno (efecto Crabtree), cuando la concentración de azúcar inicial del medio fue superior a 40 g/L, obteniéndose hasta 25 g/L de etanol a una concentración inicial de azúcar de 200 g/L.

Sin embargo, hay estudios que demuestran que hay levaduras que no sufren inhibición por sustrato como por ejemplo las pertenecientes al género *Rhodospiridium* o *Rhodotorula*. Utilizando una estrategia de crecimiento en modo *batch* y glicerol como sustrato con una relación C/N de 60, Gao y col. (2016) observaron que *R. toruloides* acumuló un porcentaje superior al 40 % de lípidos junto a una concentración de biomasa celular seca de alrededor 15 g/L. En un proceso similar, usando glicerol como fuente de carbono a una relación C/N 68, Karamerou y col. (2016) determinaron que *Rhodotorula glutinis* logró un contenido intracelular de lípidos superior al 30 % (p/p) y una concentración de biomasa celular seca de 5 g/L aproximadamente. Por último, Dobrowolski y col. (2016) reportaron un contenido lipídico intracelular de hasta el 20 %

y una concentración de biomasa celular seca de 25 g/L en *Y. lipolytica*, utilizando una estrategia similar de cultivo con glicerol y una relación C/N de 100.

Tchakouteu y col. (2017) cultivaron la levadura *R. toruloides* DSM 4444 en medio de glucosa, suplementado con NaCl 4 % (p/v), empleando una estrategia de cultivo en *batch* y una relación C/N de aproximadamente 210. La acumulación lipídica reportada en este estudio fue del 65 %, observándose una concentración de biomasa celular seca de 36,2 g/L. En estas condiciones, a pesar de utilizar una alta concentración inicial de glucosa (150 g/L), no se observó inhibición por sustrato.

Dependiendo de la relación C/N y de la especie microbiana se pueden obtener contenidos de lípidos y pesos secos celulares diferentes. Asimismo, el uso de sustratos diferentes también ejerce una influencia importante en la acumulación intracelular de lípidos. En el estudio de Dobrowolski y col. (2016) mencionado con anterioridad, el cultivo de *Y. lipolytica* con una relación C/N 100, el uso de glicerol crudo como fuente de carbono y un modo de cultivo tipo *batch*, alcanzó una acumulación lipídica del 20 %. Sin embargo, esta acumulación se superó en estudios que emplearon sustratos hidrofóbicos como fuente de carbono en el cultivo de *Y. lipolytica*. Esto pudo deberse a que la presencia de fuentes de carbono lipídicas pudo destinarse a la síntesis de lípidos de almacenamiento con el uso de las vías *ex novo* y *de novo* en paralelo en esta especie (Fabiszewska y col., 2019; Wierzchowska y col., 2022).

Una de las principales desventajas del modo de operación en *batch* es que la relación C/N durante el proceso no se puede controlar, traduciéndose por lo general en menores rendimientos de proceso. En este sentido, una forma de mejorar la utilización del sustrato e incrementar los rendimientos es utilizar estrategias de cultivo en las que se pueda regular esta relación C/N.

ii) Modo Fed-batch

La estrategia de cultivo *fed-batch* o *semi-batch* se trata de un sistema alimentado de forma discontinua que consiste principalmente en la introducción del sustrato limitante en el biorreactor sin retirada de medio (Karamerou y Webb, 2019). Por ejemplo, tras una fase de crecimiento en condiciones óptimas, cuando la fuente de carbono u otros nutrientes se empiezan a agotar, se introducen los nutrientes esenciales para el desarrollo

Introducción

celular o la síntesis del producto deseado. En el caso de levaduras oleaginosas se puede incorporar de forma intermitente carbono adicional, tras el agotamiento de éste, y de esta forma conseguir redirigir el metabolismo celular hacia la síntesis de TAGs, debido a la limitación de nitrógeno en el medio por haber sido consumido inicialmente para el crecimiento celular.

A través de este modo de cultivo se pueden alcanzar altas relaciones C/N sin sufrir inhibición por sustrato inicial, además de lograr altas densidades de biomasa celular, disminuir inhibición por producto final, reducir viscosidad del medio de cultivo y mantener en un nivel óptimo los nutrientes limitantes (Papanikolaou y Aggelis, 2002; Chang y col., 2013; Anschau y col., 2014). La composición del medio y los tiempos en los que se adiciona el nuevo carbono pueden afectar a los rendimientos y producción de lípidos, aunque esto también dependerá de las cepas empleadas y del diseño del estudio.

Respecto al modo *batch*, el uso de la estrategia *fed-batch* ha mostrado un contenido lipídico mayor en las especies *R. toruloides* y *R. glutinis*. Esta última especie se cultivó durante 12 h con 95 g/L de glicerol. Tras este tiempo, se suministraron 4 pulsos de glicerol con fuente de nitrógeno incluida, cada pulso de relación C/N 85, lográndose una acumulación de 60,7 % de lípidos y 10,1 g/L de biomasa celular seca (Saenge y col., 2011). En *R. toruloides*, la levadura se creció en un medio con 60 g/L de glucosa, administrando 5 pulsos de glucosa, manteniendo el azúcar siempre por encima de 20 g/L en el medio, lográndose una acumulación de 67,5 % de lípidos y hasta 106,5 g/L de biomasa seca tras 134 h (Li y col., 2007b).

Han y col. (2018), utilizando el modo *fed-batch* como estrategia de alimentación y la levadura *Sporidiobolus pararoseus* JD-2, observaron una concentración de lípidos de 41,6 g/L, junto con una concentración de 13,1 g/L de exopolisacáridos tras 72 h de cultivo. Llevaron a cabo la estrategia incorporando de forma regulada, a través de cinco pulsos, el sustrato que contenía 80 g/L de glucosa para mantener el azúcar residual del medio entre 20 y 30 g/L, logrando un rendimiento final de aceite de 0,257 g de lípidos/g azúcar consumido, mientras que siguiendo una estrategia *batch* el rendimiento final fue de 0,213 g lípidos/g azúcar consumido.

Más recientemente, Poontawee y Limtong (2020) comprobaron que, en el cultivo de la levadura roja *Rhodospiridiobolus fluvialis* DMKU-SP314, la estrategia *fed-batch*

en dos etapas aplicada usando glicerol crudo tuvo una importante influencia y mejora tanto en la producción de biomasa celular como de lípidos en comparación con la estrategia *batch*, con 38,5 g/L de biomasa celular y 23,6 g/L de lípidos frente a 30,3 g/L de biomasa celular y 19,1 g/L de lípidos, respectivamente.

iii) Modo Batch repetido o en dos etapas

Esta estrategia de cultivo consiste en un sistema cerrado formado por dos etapas. En la primera etapa, durante los ensayos con levaduras o microorganismos oleaginosos, se realiza un cultivo en *batch* para crecer al microorganismo, con el medio y las condiciones óptimas. Tras agotar las fuentes de carbono, la segunda etapa se puede llevar a cabo de dos formas:

A) Retirando una parte del caldo de cultivo (para no diluir el medio del segundo proceso) y utilizando las células restantes como inóculo concentrado, aproximadamente 10 % v/v, para el siguiente ciclo en *batch* en el mismo vaso del biorreactor con un medio adecuado para desencadenar la acumulación de TAGs. Así se proporciona un inóculo mayor y se reduce el tiempo de inactividad, gracias a la suspensión celular concentrada y a la eliminación de la mayoría de los productos metabólicos potencialmente tóxicos del ciclo anterior.

B) Recuperando todas las células de la primera fase para su uso como inóculo en un segundo biorreactor con un nuevo medio adecuado para desencadenar la producción de TAGs.

A pesar de las diferencias respecto a la recolección del medio y las células, los procedimientos descritos para los sistemas en dos etapas son muy parecidos (Dashti y Abdeslahian, 2016). Esta estrategia ayuda a acortar la fase de latencia en el segundo cultivo, haciendo que, por ejemplo, la producción de TAGs se lleve a cabo en un periodo de tiempo menor, además de aprovechar prácticamente todo el carbono de la segunda etapa para la síntesis de lípidos (Karamerou y Webb, 2019). En esta estrategia se evita la inhibición por sustrato en las etapas iniciales de crecimiento, y, además, es más adecuada que la estrategia *batch* de una etapa para alcanzar mayor densidad celular y mayor acumulación de TAGs.

Introducción

La estrategia en dos etapas se ha evaluado utilizando diferentes levaduras oleaginosas, alcanzándose porcentajes de lípidos en peso seco superiores al 50 %. Huang y col. (2016) reportaron una acumulación lipídica de más de un 50 % en *R. toruloides*, utilizando en primer lugar un medio de crecimiento con glucosa como fuente de carbono y una relación C/N 15 y a continuación un medio de acumulación con ácido acético como fuente de carbono y una relación C/N 200. Lin y col. (2011) alcanzaron un porcentaje lipídico del 65,2 % en biomasa celular seca, mediante un cultivo en dos etapas con *Lipomyces starkeyi*, utilizando un medio rico en nutrientes para favorecer el crecimiento celular y un segundo cultivo en un medio con glucosa y sin nutrientes auxiliares. Asimismo, estos autores también reportaron que puede alcanzarse un alto contenido lipídico (62,4 %) sin la necesidad de realizar el cultivo de acumulación en condiciones estériles.

Pereira y col. (2022) estudiaron una estrategia de cultivo *batch* en dos etapas con la levadura *Y. lipolytica* NCYC 2904 con el objetivo de mejorar los resultados obtenidos en el modo *batch* en ensayos anteriores. En una primera etapa llevaron a cabo el crecimiento de la levadura en medio con glucosa (20 g/L). En la segunda etapa, para la fase lipogénica, utilizaron una mezcla de 18 g/L de AGVs (6 g/L de acetato, 6 g/L de propionato y 6 g/L de butirato) como estrategia para mejorar la producción de lípidos microbianos. Finalmente lograron un contenido de lípidos del 38 % (p/p), superior al alcanzado usando la estrategia *batch* en un medio con una mezcla de AGVs y glucosa como cosustrato, donde se observó un contenido de lípidos final del 17 % (p/p).

iv) Modo continuo

La estrategia continua es aquella en la que se mantiene constante la tasa de crecimiento y concentración celular, suministrando continuamente el sustrato y retirando simultáneamente los productos generados y las células. Es un modo de cultivo en el que se opera manteniendo una relación C/N constante con la introducción de carbono y nitrógeno hasta el estado estacionario, limitando el nitrógeno cuando se desee la acumulación de lípidos. La fase de producción de TAGs depende en gran medida de la tasa de dilución (D), habitualmente por debajo de $0,06 \text{ h}^{-1}$ para una conversión eficiente, y de la relación C/N del medio (Christophe y col., 2012). Al igual que en el modo *fed-batch*, también se evita la inhibición por sustrato.

En esta estrategia, al mismo tiempo que se introduce el sustrato se retira medio de cultivo, por lo que es importante tener en cuenta los valores del parámetro D . Es necesario diseñar la estrategia, el suministro de la fuente de carbono en el tiempo y/o la retirada de medio de crecimiento y células, teniendo en cuenta que una alta D favorece el crecimiento celular, pero la síntesis lipídica se ve favorecida generalmente por valores bajos de D . Por ejemplo, Shen y col. (2013) en un estudio con *R. toruloides* AS 2.1389 observaron que, en condiciones de limitación de nitrógeno, el incrementar la D desde $0,02 \text{ h}^{-1}$ a $0,06 \text{ h}^{-1}$, $0,1 \text{ h}^{-1}$ ó $0,2 \text{ h}^{-1}$ disminuía el contenido intracelular de lípidos desde 61,8 % a 47,3 %, 36,7 % ó 13,2 %, respectivamente. Este efecto se atribuye a que la relación C/N está regulada por la D , ya que la tasa de absorción específica de la glucosa aumenta con el aumento de la tasa de dilución, disminuyendo la relación C/N y viceversa. Por ejemplo, tasas de dilución de $0,02 \text{ h}^{-1}$ y $0,2 \text{ h}^{-1}$ se tradujeron en tasas de absorción específicas de glucosa de 0,17 y 0,56 g glucosa/g biomasa celular/h, respectivamente. Por tanto, la optimización de los niveles adecuados de nitrógeno en el medio y de la tasa de dilución aplicada resulta fundamental durante el modo continuo de cultivo, ya que la acumulación lipídica depende de la relación C/N y ésta, a su vez, de la D .

Fu y col. (2018), investigaron la presencia de nitrógeno en el medio suministrado continuamente, durante el cultivo de *Cryptococcus albidus* siguiendo una estrategia en modo continuo de dos etapas. En este trabajo, el medio de partida suministrado de forma continua tenía una relación C/N de 8, con un exceso de nitrógeno para promover el crecimiento celular. A su vez, se bombeaba parte de este medio a otro biorreactor conteniendo un medio con un 75 % menos de nitrógeno y una relación C/N de 61 para promover la acumulación lipídica. Con una tasa de dilución de $0,05 \text{ h}^{-1}$, para ambos cultivos, se logró acumular cerca de un 57 % de lípidos en el segundo biorreactor con un total de 20,1 g/L de biomasa celular seca.

Gorte y col. (2020) utilizaron la levadura oleaginosa *Saitozyma podzolica* DSM 27192 en un cultivo continuo con glucosa, manteniendo un exceso de azúcar constante de aproximadamente 10 g/L en la fase de alimentación. De esta forma, se obtuvo una utilización del azúcar mucho más eficiente, aumentando el consumo total de glucosa hasta el 91 %. Además, el estudio demostró que la alimentación controlada con una concentración constante de glucosa incrementó un 28 % la concentración de biomasa celular y un 19 % el contenido de lípidos, comparado con un exceso inicial de glucosa

Introducción

en el medio. Sin embargo, para la coproducción de lípidos intracelulares y ácido glucónico extracelular en esta levadura, una alta concentración de azúcar inicial o introducida de forma discontinua (modo *batch* y *fed-batch*, respectivamente) resultó ser mejor estrategia desde el punto de vista de la concentración de ácido glucónico (19,8 g/L vs. 10,4 g/L) (Qian y col., 2019; Gorte y col., 2020).

El mejor desempeño del proceso en modo *batch* o *fed-batch* frente al continuo para la coproducción de compuestos de interés también se ha observado en otras levaduras. Karamerou y col. (2017) estudiaron el cultivo en modo *fed-batch* y continuo para la coproducción de lípidos y ácido cítrico en *R. glutinis* CICC 31596. En su estudio lograron una concentración de 11 g/L de ácido cítrico y 9,4 g/L de lípidos siguiendo el modo *fed-batch* frente a una concentración de 5,4 g/L de ácido cítrico y 16,2 g/L de lípidos siguiendo el modo continuo. Por lo tanto, los autores concluyeron que frente a altas concentraciones de una fuente de carbono en el medio, disponible de forma inmediata, la tendencia a la coproducción de lípidos y ácido cítrico fue mayor; mientras que con una alimentación continua, el flujo de carbono se dirigía principalmente a la acumulación de lípidos.

En la Tabla 1.2 se recoge un resumen general del concepto de las estrategias de cultivo mencionadas, así como las características más destacadas de cada una de estas estrategias de cultivo.

Tabla 1.2. Resumen de las principales estrategias de cultivo aplicadas a levaduras oleaginosas

Modo de Cultivo	Características destacadas	Referencias
Batch	-Sistema de cultivo cerrado, sin entrada o salida de flujo -Método más estudiado para producción de lípidos tanto en matraces como en biorreactores -No es necesaria la intervención externa una vez iniciado el proceso. Es la estrategia más sencilla desde el punto de vista operacional	(Bisen y Sharma, 2013)
Fed-batch	-Cultivo alimentado con adición de medio en pulsos o en continuo -Se alcanzan altas densidades celulares -Se alcanzan altas relaciones C/N sin producir inhibición por sustrato -Intermedio entre modo <i>batch</i> y modo continuo	(Bisen y Sharma, 2013; Anschau y col., 2014)
Batch repetido o en dos etapas	-Tras una fase inicial en <i>batch</i>, se retira una parte del medio y la biomasa celular restante se usa como inóculo de un nuevo cultivo en <i>batch</i> sin nutrientes auxiliares para promover acumulación de lípidos -Se reduce la fase de latencia del cultivo en la segunda etapa -Se alcanza una alta densidad celular y se logra más acumulación lipídica que en el cultivo <i>batch</i> de una etapa	(Dashti y Abdeslahian, 2016; Huang y col., 2016; Huang y col., 2018)
Continuo	-Suplementación continua del cultivo con C y N para mantener C/N constante -Se alcanzan altas relaciones C/N sin producir inhibición por sustrato -Se desencadena acumulación lipídica por modificación de la concentración de nitrógeno residual -Una alta tasa de dilución favorece el crecimiento celular pero no la acumulación de lípidos. Es el principal factor que afecta a la productividad	(Papanikolaou y Aggelis, 2002; Christophe y col., 2012)

1.4. Nuevas materias primas para la producción de triacilglicéridos

En todo proceso biológico, como el expuesto en apartados anteriores sobre la síntesis de TAGs, es necesario un sustrato para, tras su transformación biológica, obtener el producto deseado. En la producción de TAGs es crucial seleccionar las condiciones adecuadas para lograr la máxima acumulación de lípidos posible explotando el sustrato o fuente de carbono suministrada. Teniendo en cuenta la producción de TAGs a nivel industrial y con fines comerciales, el coste de adquisición de la materia prima para su síntesis representaría entre el 40 % y el 80 % del costo total de producción (Valdés y col.,

Introducción

2020), estimándose que el costo de la glucosa (la fuente de carbono más frecuentemente empleada en los medios de cultivo como fuentes de energía) alcanzaría aproximadamente el 80% del coste total del medio de cultivo (Li y col., 2007a).

Por estas razones, el uso de fuentes de carbono más económicas, como son las derivadas de residuos biológicos procedentes de diferentes sectores, puede suponer alternativas viables, más rentables y atractivas en cuanto a costos, a sostenibilidad, al desarrollo de procesos más “verdes” y de políticas de cero residuos, con el propósito de crear una bioeconomía circular próspera y eficaz. Algunos de los residuos con un mayor potencial para su uso como materia prima en la producción de aceite microbiano se desglosan a continuación:

i) Residuos agrícolas y derivados de alimentos

El uso de residuos derivados de alimentos como materia prima para la producción de aceite microbiano ha sido revisado recientemente por Ma y col. (2024). Estos residuos representan una fuente de carbono excelente y de muy bajo costo, puesto que son ricos en materia orgánica y en nutrientes. Los vegetales (hortalizas/frutas) presentan una alta concentración de azúcares, principalmente glucosa, fructosa y sacarosa, que son fácilmente extraíbles mediante un procesamiento mecánico, por lo que tienen un alto potencial para emplearse como materia prima para producir aceite microbiano (Figura 1.4).

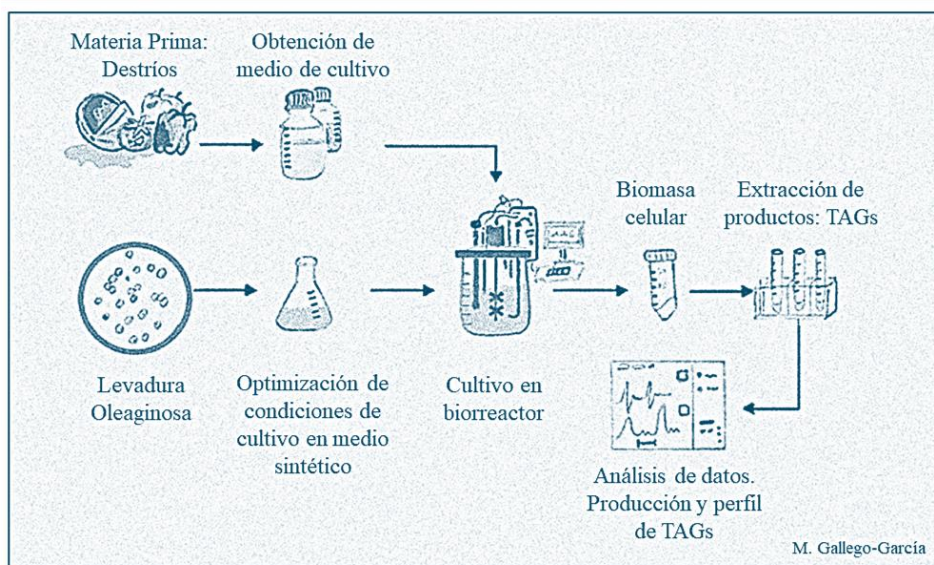


Figura 1.4. Esquema de un bio-proceso a escala de laboratorio para la producción de TAGs con levaduras oleaginosas a partir de medios ricos en azúcares obtenidos de residuos agrícolas y derivados de alimentos.

Donzella y col. (2022) utilizaron cáscaras de calabaza y jarabe de frutas confitadas como materia prima para el cultivo y la producción de lípidos con las levaduras oleaginosas *Rhodospiridiobolus azoricus* y *Cutaneotrichosporon oleaginosum*. Los mejores resultados se observaron con el cultivo de *R. azoricus* en medio a base de hidrolizado de cáscaras de calabaza mediante un cultivo en *fed-batch* añadiendo pulsos de sirope de frutas confitadas, alcanzando un contenido lipídico del 55 % (p/p). Martani y col. (2020) utilizaron como sustratos residuos de pulpa y melaza procedentes del procesamiento de la remolacha azucarera, para el crecimiento y la acumulación de lípidos por la levadura oleaginosa *L. starkeyi*, alcanzando un contenido lipídico del 49,2 % en una estrategia de cultivo *fed-batch*.

Carota y col. (2017) cultivaron las levaduras *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511 y *Cryptococcus laurentii* UCD 68-201 en suero derivado de queso ricotta, un subproducto de la industria láctea, alcanzando en torno a 6,8 y 5,1 g/L de lípidos, respectivamente. En un estudio posterior, Carota y col. (2020) investigaron el cultivo de *R. toruloides* NRRL 1091 y *C. laurentii* UCD 68-201, en residuos de cáscara de naranja, obteniendo una concentración de 5,8 y 4,5 g/L de lípidos, respectivamente.

Mirza y col. (2019) exploraron el potencial de acumulación lipídica de diferentes levaduras aisladas en muestras de suelos de diferentes orígenes, utilizando almidón de patata como materia prima. El mejor resultado de concentración de lípidos obtenido con uno de los aislados fue de 7,9 g/L. Por otro lado, Sathiyamoorthi y col. (2020) cultivaron la levadura oleaginosa *Naganishia albida* en un medio obtenido a partir de residuos derivados de cebolla y siguiendo una estrategia *fed-batch* mediante la adición de glicerol crudo, alcanzando una acumulación de lípidos de 34 % (p/p).

Desde el punto de vista de los territorios que pueden generar una mayor cantidad de residuos dentro del sector agrícola en España, cabe mencionar las zonas de cultivo situadas en el sureste del país, destacando la provincia de Almería, que presenta una extensa área de cultivos intensivos bajo invernadero; una de las mayores concentraciones de invernaderos del mundo, con una alta producción a nivel nacional e internacional, abarcando un área significativa que puede observarse desde el espacio. (Figura 1.5).

Introducción



Figura 1.5. Imagen de una de las áreas más importantes de invernaderos de Almería tomada el 24 de mayo de 2022 por el “Operational Land Imager-2 (OLI)” del “Landsat 9” procedente del observatorio de la tierra de la NASA (National Aeronautics and Space Administration) (<https://earthobservatory.nasa.gov/images/150070/almerias-sea-of-greenhouses>)

Almería cuenta con una superficie de cultivo de aproximadamente 45.700 hectáreas, donde se lleva a cabo la producción especializada de varios cultivos, destacando el cultivo de tomates, pimientos, pepinos, sandías, calabacines, berenjenas, judías verdes y melones (Aznar-Sánchez y col., 2020).

Las frutas y verduras que no son aptas para su comercialización, bien sea por no cumplir el tamaño definido por el mercado (calibre) o por presentar una forma anómala, contaminación o algún daño derivado de condiciones meteorológicas adversas o de plagas, se retiran del cultivo durante las fases de crecimiento, cosecha y almacenamiento. A estos productos que no pueden ser vendidos se les denomina destríos, comprendiendo estos residuos vegetales el 25 % del total del cultivo en Almería, siendo los cultivos de primavera y de ciclo largo como el tomate, pimiento y pepino aquellos que generan un mayor volumen, alcanzando un 75 % del total de los residuos vegetales generados (Duque-Acevedo y col., 2020).

Según datos de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación en español) (Gustavsson y col., 2011), al igual que ocurre en Almería, las regiones de Europa, América y Oceanía tienen un 25 % de pérdidas respecto a la producción total en frutas y verduras entre la fase de crecimiento (agricultura), la recolección y el almacenamiento. Sin embargo, otras regiones como Asia y el Norte de África muestran una mayor pérdida durante la distribución del producto. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) de España data la producción de frutas y hortalizas del año 2022 en más de 25 millones de toneladas, mostrándose la distribución de esta producción en la Figura 1.6.

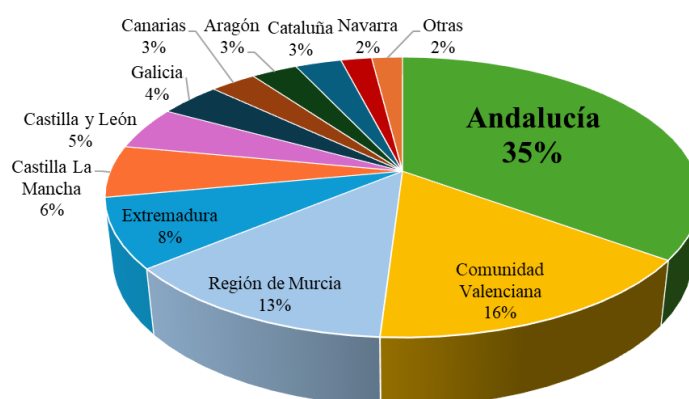


Figura 1.6. Distribución de la producción de frutas y hortalizas en España en 2022. Fuente: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Anuario de Estadística y Superficies y Producciones Anuales 2022).

Como se puede observar, Andalucía (que incluye la región de Almería), la Comunidad Valenciana y Murcia, representan en torno a los 2/3 de la producción total de frutas y hortalizas, concentrando por tanto en el área mediterránea la generación de este tipo de residuos.

Tomando el dato de aproximadamente una producción de 25 millones de toneladas de frutas y verduras en 2022 en España, y el dato de la generación de residuos en este sector del 25 % en las primeras etapas de los cultivos (siembra, cosecha y almacenamiento), los destríos supondrían en torno a casi 6 millones y medio de toneladas, lo que lo convierten en residuos con una alta disponibilidad.

Según los datos de 2022, se estima que en España se generaron en torno a 6,5 millones de toneladas de destríos, destacando la importancia de su gestión y uso en biorrefinerías. En este sentido, la legislación vigente en España contempla el

Introducción

procesamiento de este tipo de residuos como materia prima en procesos de tratamiento biológico. A nivel nacional, la Ley 7/2022, de 8 de abril, de residuos y suelos contaminados para una economía circular recoge en el artículo 27.3 sobre eliminación de residuos que *“Los residuos vegetales generados en el entorno agrario o silvícola que no queden excluidos del ámbito de aplicación de esta ley de acuerdo con el artículo 3.2.e), deberán gestionarse conforme a lo previsto en esta ley, en especial la jerarquía de residuos, priorizando su reciclado mediante el tratamiento biológico de la materia orgánica.”* (BOE-A-2022-5809).

Por otro lado, la Junta de Andalucía publicó un informe sobre las líneas de actuación en materia de gestión de restos vegetales procedentes de la horticultura en Andalucía (Junta de Andalucía, 2016) donde se recogen las medidas de actuación para la *“Gestión de restos vegetales – Entrega a un gestor autorizado”*: *“Cuando se realiza la gestión de los restos vegetales a través de su entrega a un gestor autorizado es el agricultor quien asume el coste del servicio de retirada y transporte a una planta de tratamiento. El precio de este servicio suele ir en función del volumen a transportar”*

Además de su uso como materia prima para su tratamiento mediante procesos biológicos, desde el MAPA se ha creado el programa *“Más alimento, menos desperdicio”* (MAPA, 2020) que fomenta reducir las pérdidas generadas en los cultivos, así como disminuir el desperdicio de alimentos durante toda la cadena de valor. Este tipo de programas junto con otras estrategias políticas y planes desarrollados a nivel nacional e internacional como la *“Estrategia Española de Economía Circular”* (MITECO, 2020a), el *“Programa Estatal de Prevención de Residuos 2014-2020”* (MITECO, 2020b) y el *“Pacto Verde Europeo”* (Consejo de la UE y Consejo Europeo, 2019), están impulsando la mejor gestión de los residuos agrícolas para ampliar la cadena de valor y fomentar el principio de residuo cero.

Por lo tanto, la ley obliga a gestionar estos residuos agrícolas cuando supongan un problema para el medio ambiente o la salud, ya que pueden traer problemas de contaminación o desequilibrios en la composición del suelo, en el cultivo venidero, contaminación de acuíferos por los lixiviados, formación y propagación de plagas, etc. Además de concienciar y luchar contra el desperdicio de alimentos en distintos sectores, desde el agrícola hasta el urbano (hogares). Por ello, la valorización de residuos

proporcionándoles diferentes salidas como recursos es una opción interesante para el agricultor, que puede sacar provecho de estos desechos al poder venderlos como posibles materias primas a un coste más bajo que el producto original. Además, para las industrias que los exploten en procesos biológicos también proporcionarían una serie de beneficios debido a la rica composición en nutrientes y porcentaje de materia orgánica que presentan, a los pigmentos de interés extraíbles, a las concentraciones de azúcares fermentables que los conforman, etc., al mismo tiempo de adquirirlos a un coste más económico por tratarse de descartes de la agricultura, siendo un incentivo adicional por la gestión de residuos.

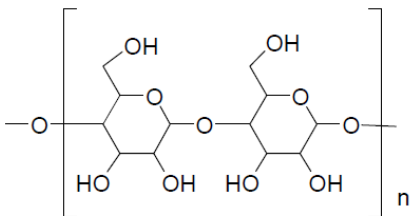
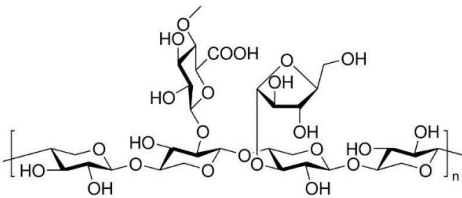
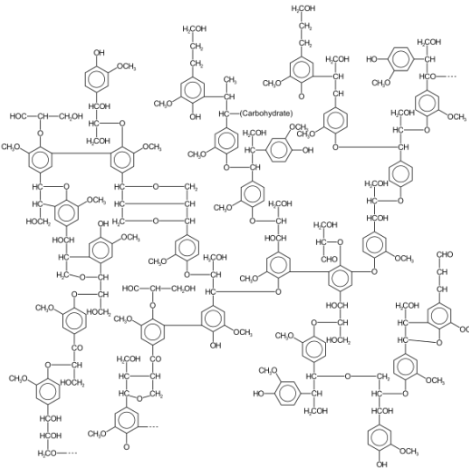
ii) Residuos procedentes de biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica, incluidos los cultivos energéticos y la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (RSU), así como los residuos forestales, los derivados de la agricultura, la silvicultura y el procesamiento de la madera, son importantes recursos energéticos sostenibles, pudiendo convertirse directa o indirectamente en energía y bio-productos de valor añadido (Yan y col., 2020).

Como se detalla en la Tabla 1.3 y en la Figura 1.7, la biomasa lignocelulósica, se compone principalmente de tres polímeros que actúan como compuestos estructurales de la pared celular de plantas: celulosa (40-60 % p/p), hemicelulosa (10-40 % p/p) y lignina (5-25 % p/p). También se pueden encontrar otras fracciones no estructurales en la pared celular primaria y secundaria como son proteínas (unión entre lignina y polisacáridos), pectinas (responsables de la porosidad de la pared, regulación de pH, balance iónico), extractos (resinas, ceras, grasas, terpenos que están implicados en la resistencia frente a microorganismos, olor, color) y cenizas (sales inorgánicas como carbonatos o silicatos). Las proporciones, tanto de estas fracciones como las de los componentes principales, dependen del tipo de material lignocelulósico y de su especie, ya que esta biomasa es muy heterogénea (Bidlack y col., 1992; Yan y col., 2020).

Introducción

Tabla 1.3. Compuestos estructurales principales que conforman la biomasa lignocelulósica (Testa y Tummino, 2021)

POLÍMERO	CARACTERÍSTICAS
CELULOSA	
	Homopolímero lineal compuesto por cadenas de monómeros de glucosa unidas mediante enlace glucosídico β -(1 $\rightarrow$ 4), dispuestas paralelamente y conectadas a través de puentes de hidrógeno formando una estructura cristalina, cadenas que a su vez se empaquetan formando microfibrillas. La unidad de repetición es la celobiosa.
HEMICELULOSA	
	Heteropolímero de estructura altamente ramificada compuesto de azúcares de cinco carbonos (β -D-xilosa, α -L-arabinosa) y seis carbonos (β -D-manosa, β -D-glucosa, α -D-galactosa). Debido a la estructura ramificada que presenta es más vulnerable a la deconstrucción química y enzimática.
LIGNINA	
	Polímero de base fenólica cuya composición principal son tres monómeros de lignol. Estos monolignoles son los alcoholes <i>p</i> -cumarílico, coniferílico y sinapílico, precursores de las unidades <i>p</i> -hidroxifenil (H), guaiacil (G) y siringil (S). Se encuentra unida a la celulosa y hemicelulosa confiriendo rigidez, fuerza mecánica, impermeabilidad y resistencia química a la pared celular de la biomasa.

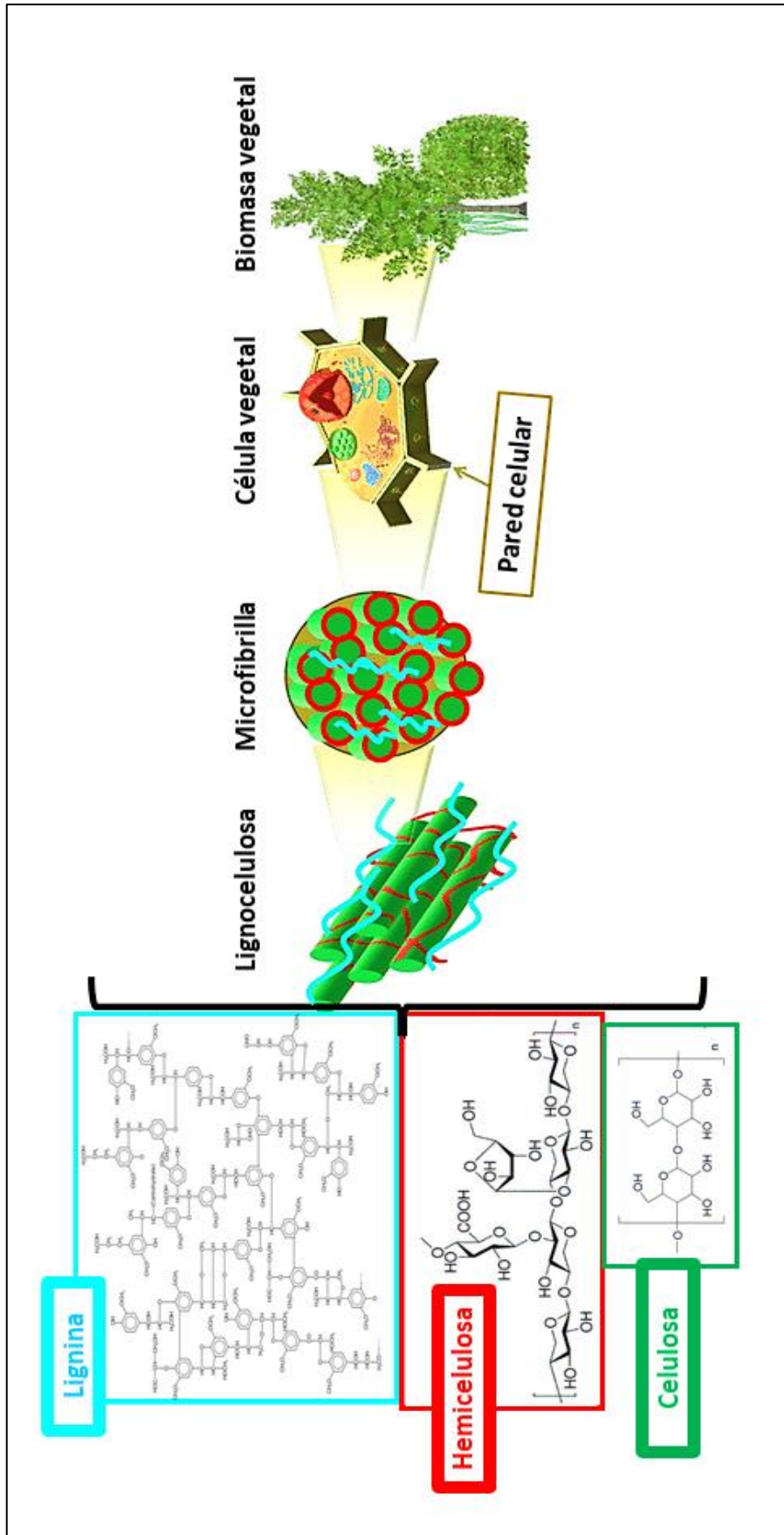


Figura 1.7. Estructura de la pared celular secundaria derivada de biomasa lignocelulósica. Los componentes están dispuestos de modo que las microfibrillas de celulosa (verde) y las cadenas de hemicelulosa (rojo) queden embebidas en la lignina (azul) (Ilustración basada en imagen de Testa y Tummino (2021)).

Introducción

Con el procesamiento adecuado de la biomasa lignocelulósica se pueden obtener carbohidratos en forma monomérica, siendo la glucosa (procedente del polímero de celulosa) y la xilosa (procedente del polímero de hemicelulosa) los azúcares principales. Esto hace que la lignocelulosa tenga un gran potencial de aplicación como materia prima en bio-procesos para obtener biocombustibles y otros productos de alto valor añadido.

Un tipo de biomasa lignocelulósica con potencial para ser explotada por su composición, distribución, variedad y disponibilidad es la procedente de residuos sólidos municipales (RSM), como la poda urbana. Los RSM presentan diferentes impactos ambientales negativos y riesgos para la salud cuando se descartan inadecuadamente. Entre los impactos negativos o riesgos por su incorrecta gestión o por su descomposición pueden encontrarse la contaminación del suelo, la de aguas superficiales y subterráneas por los lixiviados y la emisión a la atmósfera de compuestos volátiles y gases tóxicos, además de GEI (Chacartegui y col., 2015).

El desarrollo urbano sostenible requiere una forma eficaz de integrar la calidad de vida de las personas y la reducción de la contaminación ambiental junto con estrategias adecuadas de gestión de residuos. En la actualidad más del 50 % de la población vive en entornos urbanos, existiendo la necesidad de transformarlos en entornos “más saludables” para mejorar la calidad de vida en ellos, como por ejemplo con la introducción de espacios verdes (Negro y col., 2020). Con el aumento de zonas verdes, el residuo lignocelulósico derivado de la gestión de estas zonas se verá incrementado, favoreciendo la disponibilidad de esta materia prima en las zonas urbanas a nivel global.

La poda representa la principal actividad de cuidado de los árboles y las plantas de parques, jardines y avenidas en las ciudades, llevándose a cabo para reducir el riesgo de caídas de ramas o árboles debido a la acción de fenómenos meteorológicos adversos, para garantizar la visibilidad de las carreteras, para reducir los daños a las infraestructuras y las interacciones con estas, además de por razones estéticas (Muscas y col., 2024). Estos residuos lignocelulósicos municipales (RLM), procedentes de la poda urbana, al depositarse en vertederos se descomponen lentamente, liberando metano y dióxido de carbono durante los primeros 150 años, quedando el 20 % sin descomponer como material estable (Araújo y col., 2017).

ii.i) Residuos celulósicos urbanos

Otros residuos de gran interés de carácter lignocelulósico son aquellos con un alto contenido en celulosa, como por ejemplo los residuos de papel y/o los residuos de la industria textil. El residuo de papel está compuesto aproximadamente de un 40-80 % (p/p) de celulosa, un 5-15 % (p/p) de hemicelulosa y una cantidad muy baja de lignina, proteínas, aditivos y cenizas (Al Azkawi y col., 2018; Di Fidio y col., 2020). Por lo tanto, el residuo derivado del proceso de fabricación de papel o del reciclaje de papel derivado de oficinas, periódicos, cuadernos o cartón junto con el papel no reciclado que se descarta en la fracción orgánica son candidatos apropiados para seleccionarse como materias primas en las biorrefinerías, ya que son residuos ricos principalmente en homopolímeros de glucosa (Di Fidio y col., 2021), considerados en este trabajo como residuos celulósicos.

Entre los residuos ricos en celulosa procedentes de la fracción orgánica de los RSU pueden encontrarse servilletas usadas, papel de cocina, tickets de comercios, etiquetas, bolsitas de té o infusiones, así como papel y cartón sucios. Además, también se pueden encontrar papel no reciclado de oficina o el papel reciclado que finalmente se descarta en la fracción orgánica en contenedores y finalmente vertederos por su baja calidad debido a la reducción en el tamaño de la fibra durante el proceso de reciclaje (Al-Battashi y col., 2019). A nivel mundial, los residuos de papel usado suponen unos 400 millones de toneladas anuales, de los cuales se recicla el 50-65 % (Annamalai y col., 2018). La fracción de papel no reciclada por lo general termina incinerándose o acumulándose en vertederos, lo que supone un problema ambiental, no sólo por las emisiones de GEI resultantes, sino por la posibilidad de liberar a la atmósfera o al suelo diversos componentes potencialmente cancerígenos contenidos en las tintas y tintes (Nair y Sivakumar, 2022).

Por lo tanto, teniendo en cuenta su alto contenido en carbohidratos (siendo la celulosa el componente mayoritario) y la necesidad de implementar procesos alternativos para su mejor gestión, los residuos ricos en celulosa derivados de papel representan un material con alto potencial para su uso como sustrato en la producción de aceite microbiano.

1.4.1. Pretratamiento de los residuos de biomasa lignocelulósica

Como se ha descrito, la biomasa lignocelulósica ofrece un alto potencial como materia prima para el desarrollo de una plataforma basada en la conversión de azúcares por procesos biotecnológicos. Sin embargo, la estructura tridimensional conformada por los diferentes componentes, hacen que la biomasa sea altamente recalcitrante a los procesos de hidrólisis enzimática necesarios para obtener los azúcares monoméricos contenidos en los carbohidratos estructurales. Con el fin de alterar su estructura y aumentar la accesibilidad de las enzimas hidrolíticas a los carbohidratos estructurales, la biomasa lignocelulósica tiene que someterse, por tanto, a una etapa de pretratamiento previa a la hidrólisis enzimática (Brownell y Saddler, 1987; Chandra y col., 2007; Alvira y col., 2010).

En la actualidad, no existe una tecnología de pretratamiento universal que pueda aplicarse a los diferentes tipos de biomasa lignocelulósica ya que, como se han mencionado anteriormente, la biomasa es heterogénea tanto en su composición como en su estructura. En función del tipo de biomasa se pueden aplicar diferentes pretratamientos: físicos (molienda, extrusión), químicos (líquidos iónicos, ácidos o alcalinos, organosolventes), fisicoquímicos (explosión con vapor, microondas, ultrasonidos, oxidación húmeda) y biológicos (biodegradación por enzimas (hongos ligninolíticos)) (Gómez-Toribio y col., 2009; Mankar y col., 2021), siendo posible la combinación de estos para un adecuado tratamiento de diversos materiales. Para evaluar la efectividad del pretratamiento y su optimización, se deben tener en cuenta, entre otros, los siguientes aspectos: 1) maximizar el área de superficie accesible, 2) reducir el índice de cristalinidad de la celulosa, 3) aumentar el tamaño de poro, 4) promover la deslignificación y/o 5) fomentar la despolimerización parcial de los carbohidratos estructurales (Bhatia y col., 2020; Negro y col., 2020).

También hay que tener en cuenta la producción de compuestos inhibidores resultantes de la degradación de la biomasa tras el pretratamiento. Las posibles moléculas inhibitoras presentes en los hidrolizados pretratados, que pueden llegar a producirse, entre otros factores, por las condiciones severas aplicadas en algunos pretratamientos y según el tipo de materia prima empleado, se pueden clasificar principalmente en tres grupos: (1) furanos: compuestos derivados de la degradación de los azúcares (pentosas y

hexosas); (2) ácidos carboxílicos: subproductos de degradación principalmente procedentes del polímero de hemicelulosas y de la degradación de los furanos formados; y (3) compuestos fenólicos: compuestos obtenidos a partir de la solubilización parcial de la lignina y otros compuestos aromáticos de la biomasa lignocelulósica (Kim, 2018).

De los pretratamientos descritos en la bibliografía, la explosión con vapor (EV) ha demostrado ser un pretratamiento eficaz para tratar varios tipos de materiales lignocelulósicos, entre ellos los leñosos. Este pretratamiento ha sido ampliamente utilizado para tratar biomásas residuales como paja de cebada, de avena, de canola y de trigo (Ballesteros y col., 2006; Adapa y col., 2010; Alvira y col., 2016), residuos agrícolas del banano (tallo y raquis) (Guerrero y col., 2018), residuos de madera como el álamo (Tang y col., 2018), residuos de poda del olivar (Negro y col., 2014) y rastrojos de maíz (Fontes y col., 2024). Además, comparado con otras tecnologías de pretratamiento como el proceso *organosolv* u otros procesos alternativos, la EV tiene un impacto ambiental significativamente menor, una menor inversión de capital, un mayor potencial de eficiencia energética, ofrece versatilidad para la adición catalizadores químicos, presenta bajas pérdidas de materia y permite alcanzar altos rendimientos en la etapa posterior de hidrólisis enzimática (Debzi y col., 1988; Avellar y Glasser, 1998; Mankar y col., 2021).

Explosión con vapor

La explosión con vapor es un pretratamiento hidrotérmico en el que la biomasa se somete a vapor saturado en un reactor a altas temperaturas (160-260 °C) y a alta presión (0,7 a 5 MPa) (Singh y col., 2014) durante un período de tiempo (segundos o minutos) seguido de una rápida despresurización (Duque y col., 2016). Los factores más importantes que influyen en la eficiencia del proceso son la temperatura, el tamaño de partícula, la humedad, la utilización de catalizador y el tiempo de residencia. La combinación sobre todo de este último factor junto con el de temperatura determinan la severidad del proceso y por ello, las características del material pretratado, los rendimientos de azúcares obtenidos y la producción de compuestos inhibidores (Alvira y col., 2010).

El pretratamiento por EV combina efectos químicos como la autohidrólisis y efectos mecánicos por la despresurización (Singh y col., 2014):

Introducción

- El efecto químico es debido a la liberación de los grupos acetilos existentes en la hemicelulosa, promoviendo la formación de ácido acético y por lo tanto la disminución del pH, conduciendo a un efecto de autohidrólisis de este polímero. Además, a altas temperaturas el agua puede actuar también como ácido, ya que las moléculas de agua tienden a disociarse (OH^- y H^+) aumentando el hidrógeno (n° de protones) en el medio y, por ende, disminuyendo el pH. Con la ruptura de la cadena de la hemicelulosa se liberan carbohidratos de menor tamaño: oligómeros y monosacáridos. No obstante, como consecuencia de las condiciones en las que se realiza el pretratamiento se pueden producir también otros compuestos no deseados o posibles inhibidores del crecimiento celular derivados de la degradación de las pentosas y hexosas como son los furanos (furfural y 5-hidroximetilfurfural, respectivamente), así como ácidos orgánicos (ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico, etc.) y/o compuestos fenólicos.
- El efecto mecánico es producido por la rápida despresurización, lo que provoca la evaporación del agua condensada interfibrilarmente creando fuerzas de cizalla que hacen que se separen las fibras, produciendo una desestructuración física del material (Figura 1.8). Durante el pretratamiento se produce la degradación sustancial de la estructura de la lignocelulosa con la hidrólisis parcial y solubilización de la hemicelulosa, la redistribución de la lignina y despolimerización de los componentes de la lignina y el desfibrado del material (Cara y col., 2006; Jørgensen y col., 2007; He y col., 2022).

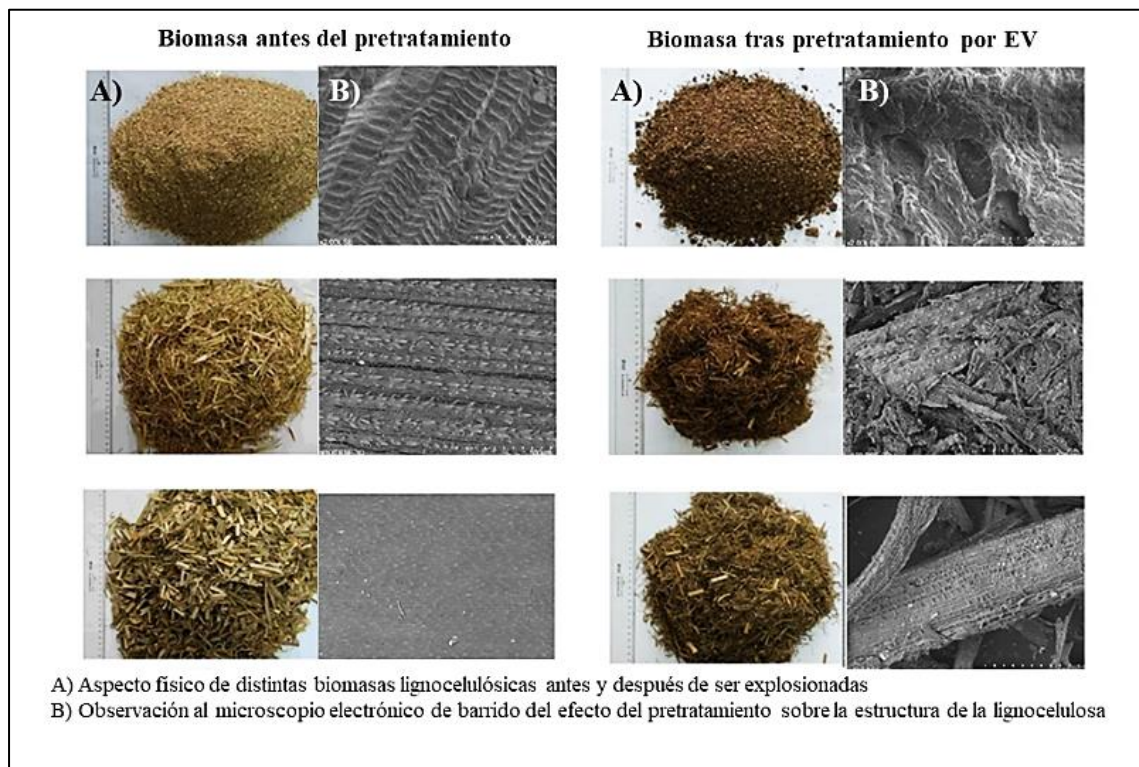


Figura 1.8. Efecto del pretratamiento por explosión con vapor sobre diferentes biomásas de naturaleza lignocelulósica. Se observa el aspecto físico (columnas A) antes y después del pretratamiento, revelándose cambios de color tras la explosión con vapor. La observación de las microestructuras (columnas B) mediante microscopía electrónica de barrido mostró que las superficies de todas las biomásas estaban intactas, compactas y rígidas, mientras que tras el pretratamiento las superficies se volvieron irregulares, desestructuradas y amorfas (Imágenes de He y col. (2022)).

Generalmente, el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica suele requerir condiciones severas, como altas temperaturas ($> 160\text{ }^{\circ}\text{C}$), altas presiones (5-30 bares) y/o la adición de un catalizador ácido/álcali (Moreno y col., 2019), generando cambios en la compleja estructura de la lignina (ruptura de enlaces) acoplados a la hidrólisis de la hemicelulosa, aumentando la disponibilidad de la celulosa del material pretratado y favoreciendo la etapa de hidrólisis enzimática (Jacquet y col., 2015) (Figura 1.9).

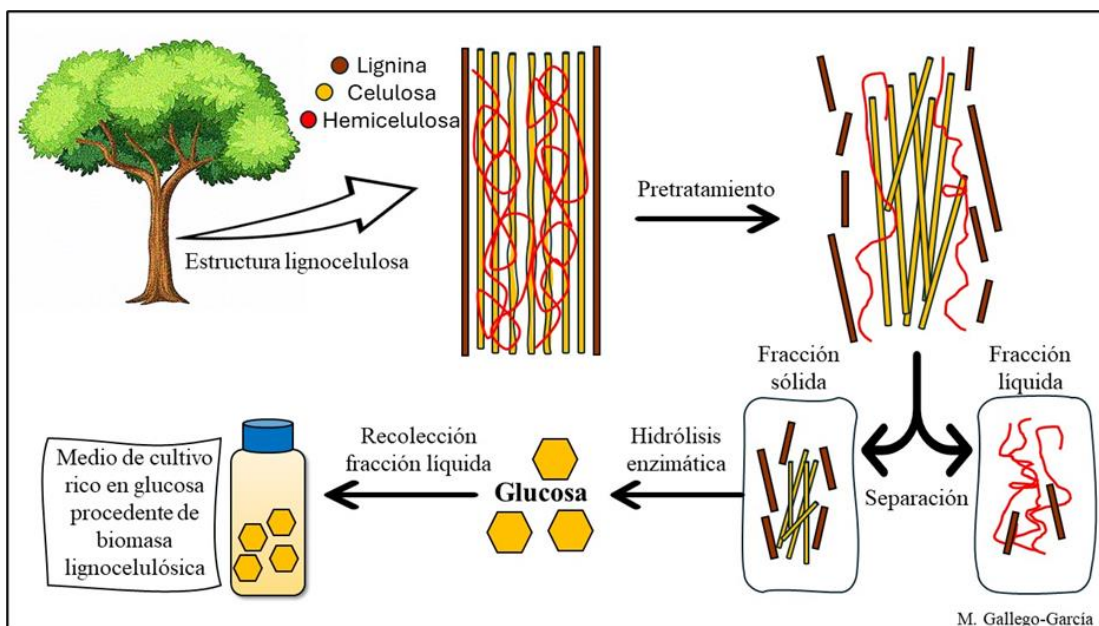


Figura 1.9. Representación simplificada de la estructura de la lignocelulosa antes y después de ser sometida a un pretratamiento severo como la explosión con vapor. Tras una etapa de filtración del material pretratado completo, en la fracción líquida se recupera la hemicelulosa y en la sólida la lignina y celulosa, quedando esta última más accesible a las enzimas que la hidrolizarán a monómeros de glucosa. Finalmente se puede obtener un medio rico en azúcares.

1.4.2. Hidrólisis enzimática

Una vez llevado a cabo un pretratamiento de la biomasa, como puede ser la explosión con vapor, para desestructurar o fraccionar la compleja interacción que se da entre los componentes estructurales (celulosa, hemicelulosa y lignina), la siguiente etapa para la obtención de azúcares en forma monomérica es la de hidrólisis enzimática (HE). Las enzimas empleadas deben conformar una mezcla óptima para obtener la mayor despolimerización posible de la biomasa lignocelulósica tratada (Moreno y col., 2021; Guo y col., 2023).

La glucosa, encontrada mayoritariamente en el polímero de celulosa de los materiales lignocelulósicos, es el monosacárido utilizado preferentemente como fuente de carbono y energía por la mayor parte de las células de los seres vivos. Las enzimas encargadas de degradar la celulosa en glucosa son las celulasas (endoglucanasas y celobiohidrolasas) y la β -glucosidasa, actuando sinérgicamente (Figura 1.10).

Dentro de las celulasas se encuentran las endoglucanasas (EC 3.2.1.4) que son las encargadas de hidrolizar aleatoriamente los enlaces glucosídicos β (1 $\rightarrow$ 4) internos, encontrándose también las exoglucanasas, conocidas además como celobiohidrolasas, que degradan progresivamente la celulosa a partir de los extremos, reductor (EC 3.2.1.176) y no reductor (EC 3.2.1.91), escindiendo unidades de celobiosa. La celobiosa es un disacárido formado por dos moléculas de glucosa y es el sustrato de la β -glucosidasa (EC 3.2.1.21) capaz de hidrolizar el enlace β (1 $\rightarrow$ 4) liberando dos moléculas de glucosa (Jørgensen y col., 2007).

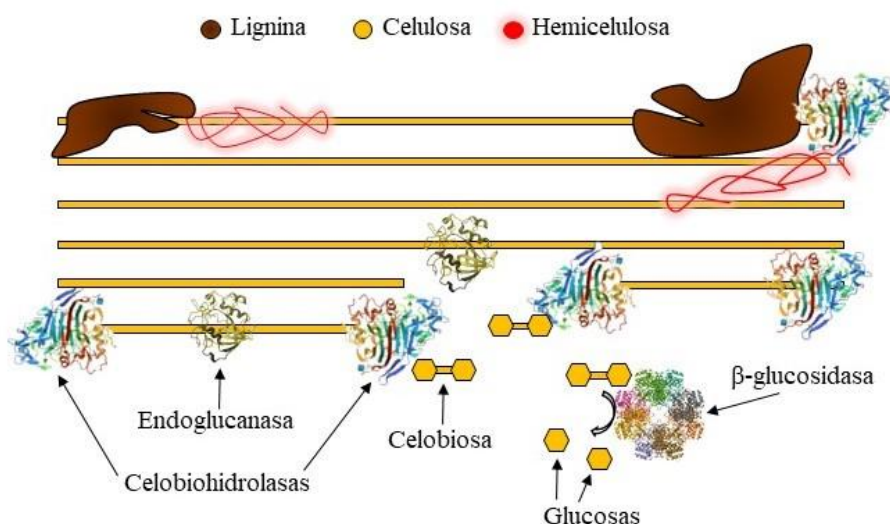


Figura 1.10. Esquema simplificado sobre la actuación de celulasas y β -glucosidasa sobre la celulosa. Se refleja como fragmentos de hemicelulosa y lignina cubriendo las microfibrillas pueden impedir que las celulasas accedan a la superficie de algunas zonas de la celulosa. (Ilustración basada en imagen de Jørgensen y col. (2007). Enzimas derivadas de la base de datos: Protein Data Bank (2024))

Este cóctel enzimático, junto con otras enzimas accesorias y proteínas, como las polisacárido-monooxigenasas o monooxigenasa líticas de polisacáridos que actúan estimulando la actividad celulolítica de las celobiohidrolasas, son necesarios para hidrolizar el polímero, crear nuevos sitios accesibles, eliminar obstáculos (lignina unida a celulosa) y aliviar la inhibición por producto y la inactivación de enzimas (Eriksson y col., 2002; Våljamäe y col., 2003; Guo y col., 2023).

Un aspecto a tener en cuenta durante la hidrólisis enzimática de la celulosa es la presencia de hemicelulosas en el material pretratado como puede observarse en la Figura 1.10. El polímero de hemicelulosa se encuentra envolviendo a la celulosa, por lo que la hidrólisis de las hemicelulosas también resulta fundamental para facilitar el acceso de las

Introducción

celulasas. La hidrólisis enzimática de las hemicelulosas requiere de un sistema enzimático más complejo debido a su naturaleza más variable (Shallom y Shoham, 2003). En la Tabla 1.4 se encuentran reflejadas algunas de las enzimas hemicelulolíticas más comúnmente empleadas para hidrolizar este polímero.

Tabla 1.4. Enzimas implicadas en la degradación de diferentes cadenas y grupos laterales de la hemicelulosa

Enzima	Número EC	Enlace diana o actividad
Endo-1,4-β-D-xilanasa	3.2.1.8	Enlace β-1,4 interno de la cadena de xilano
β-D-xilosidasa	3.2.1.37	Enlace β-1,4 de xilooligosacáridos desde el extremo no reductor, liberando xilosa
Endo-1,4-β-D-mananasa	3.2.1.78	Enlace β-1,4 interno en manano
1,4-β-D-manosidasa	3.2.1.25	Enlace β-1,4 de manooligosacáridos en manosa
α-D-galactosidasa	3.2.1.22	Residuos terminales de α-D-galactosa no reductores en α-D-galactósidos, incluidos oligosacáridos de galactosa y galactomananos
α-L-arabinofuranosidasa	3.2.1.55	Residuos terminales de α-L-arabinofuranósido no reductores en α-L-arabinósidos
α-glucuronidasa	3.2.1.131 3.2.1.139	Enlace (1→2)-α-D-(4-O-metil) glucuronosilo en la cadena principal de xilanos; actúa sobre α-D-glucuronósido de D-glucuronato
Acetil xilano esterasa	3.1.1.72	Desacetilación de xilanos y xilooligosacáridos
Feruloil esterasa	3.1.1.73	Grupo 4 – hidroxí – 3 – metoxicinamoilo (feruloilo) de un azúcar esterificado, que suele ser arabinosa en sustratos "naturales"

Referencias: Carbohydrate Active Enzymes database (CAZy, 2024);(Shallom y Shoham, 2003; Jørgensen y col., 2007; Drula y col., 2022).

1.5. Producción de otros compuestos de interés. Carotenoides

Aparte de lípidos neutros, algunas cepas de levaduras oleaginosas son capaces de sintetizar otros compuestos celulares valiosos, como los terpenos o carotenoides. Los carotenoides han sido reconocidos en todo el mundo como aditivos alimentarios y suplementos nutricionales gracias a sus útiles funcionalidades biológicas. Algunos carotenoides como el β-caroteno actúan como antioxidantes en el cuerpo para proteger células, tejidos y órganos del efecto dañino de los radicales libres, que pueden contribuir a la aparición de enfermedades cardíacas, cáncer, etc. (Tang y col., 2019). Debido en gran medida al uso creciente de carotenoides naturales como colorantes alimentarios y suplementos nutracéuticos, se espera que el mercado de carotenoides crezca a 2 mil

millones de dólares para el año 2026, representando el β -caroteno alrededor del 32 % de este mercado. El mercado mundial de β -caroteno en 2022 alcanzó los \$575 millones y se prevé que supere los \$850 millones para 2032, según el informe de investigación de Global Market Insight (2023).

En la actualidad, los carotenoides se obtienen industrialmente por extracción de materiales vegetales, biosíntesis de base microbiana y por síntesis química. Más del 90 % del caroteno comercial se produce mediante síntesis química, proceso que ha sido criticado por la toxicidad de los reactivos utilizados y la formación de subproductos no deseados. Además, debido a la creciente demanda de productos naturales por parte de los consumidores, están surgiendo nuevas investigaciones que pretenden proponer diferentes formas de obtener este tipo de productos (Lopes da Silva y col., 2023). Los bio-procesos que utilizan células microbianas como biocatalizadores son un enfoque excelente para este propósito, ya que la producción de carotenoides a base de levadura roja o rosa es una fuente natural. En este contexto, las levaduras de los género *Rhodotorula*, *Rhodospiridium* o *Sporobolomyces* presentan la capacidad de producir carotenoides como β -caroteno, γ -caroteno, toruleno y torularodina, lípidos neutros (TAGs) y un extenso perfil de ácidos grasos debido a la metabolización de diferentes sustratos (Frengova y Beshkova, 2009). Passarinho y col. (2020), con la levadura *R. toruloides* NCYC 921 para la coproducción de ácidos grasos y carotenoides, demostraron como, a través de un proceso secuencial de saponificación y extracción líquido-líquido, pueden extraerse simultáneamente y separarse los carotenoides (lípidos insaponificables) de los lípidos saponificables como los TAGs. Los autores obtuvieron rendimientos de recuperación del 91 % y 85,2 % para ácidos grasos y carotenoides totales, respectivamente.

Así pues, las levaduras oleaginosas pueden ser consideradas prometedoras fábricas celulares para la coproducción de diferentes productos de interés industrial, pudiendo explotarse en diversos procesos como el de producción de aceite microbiano y carotenoides mediante la valorización de subproductos o residuos agroindustriales como fuentes de carbono (Villegas-Méndez y col., 2023).

1.6. La modificación genética como herramienta para la mejora de levaduras oleaginosas

El uso de levaduras no convencionales como factorías celulares en procesos de bioconversión en biorrefinerías es un método alternativo y prometedor para generar bioenergía, diferentes productos de interés y/o biocombustibles. Entre éstas, las levaduras oleaginosas se consideran una alternativa atractiva para la producción de aceite microbiano para su aplicación como biocombustible, así como para generar otros productos de valor como pigmentos o ácidos orgánicos. Sin embargo, la utilización de cepas silvestres aún presenta limitaciones y desafíos que superar, sobre todo en cuanto a la fermentación industrial se refiere. Entre estas dificultades pueden encontrarse los requerimientos o condiciones de cultivo que son necesarios para alcanzar buenos rendimientos de lípidos y un crecimiento óptimo de la biomasa celular, como son la relación C/N (o de otros nutrientes), la fuente de nitrógeno, el pH o la concentración de oxígeno disuelto en el medio, entre otros.

La modificación genética como herramienta para la mejora de levaduras oleaginosas es una opción prometedora y de gran interés para superar los inconvenientes del escalado del bio-proceso y mejorar el rendimiento de este en la industria. Generalmente, con la modificación genética de levaduras oleaginosas se puede aumentar el rendimiento de lípidos aproximadamente en un 15-45 % e incluso hasta en un 400 % (Robles-Iglesias y col., 2023). La ingeniería genética y metabólica pueden contribuir a la mejora de los cultivos en biorreactores industriales, de los rendimientos y/o de las tasas de producción, aunque se necesita seguir trabajando en adquirir conocimientos base sobre el genoma y el metabolismo de estas levaduras para poder aplicar estas herramientas de modificación de una forma eficiente como ocurre en otros organismos modelos como *S. cerevisiae* o *Escherichia coli* (Löbs y col., 2017; Navarrete y Martínez, 2020).

En este contexto, entre las herramientas más novedosas de edición genética se encuentra la tecnología CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* en inglés) multiplexada (Mendoza-Téllez y col., 2023). En esta tecnología se expresan varios ARN guías (ARNg: ácido ribonucleico guía) o enzimas Cas (CRISPR *associated protein* en inglés) a la vez, activándose y reprimiéndose simultáneamente

varios genes, facilitándose las aplicaciones eficaces en biología sintética e ingeniería genética y metabólica, mejorando en gran medida el alcance y la eficiencia de la edición genética y la regulación transcripcional en levaduras no convencionales (McCarty y col., 2020). Schwartz y col. (2018) estudiaron un sistema de activación CRISPR/Cas para activar y sobreexpresar genes nativos de *Y. lipolytica* que permiten el crecimiento en carbohidratos derivados de la biomasa lignocelulósica como la celobiosa; obteniendo un metabolismo más robusto al activar conjuntamente diferentes genes de β -glucosidasa para poder crecer usando como única fuente de carbono el disacárido mencionado.

Y. lipolytica, a pesar de clasificarse en algunos estudios como levadura no convencional, es una levadura oleaginosa muy estudiada para la acumulación de lípidos intracelulares, la producción de ácidos orgánicos y proteínas heterólogas y el crecimiento en sustratos hidrofóbicos como ácidos grasos o alcanos. El genoma de esta levadura está secuenciado en su totalidad y se han desarrollado numerosas herramientas de modificación genética y de biología sintética diseñadas y aplicadas para este microorganismo de manera eficiente para producir y secretar diferentes compuestos de interés (Park y Ledesma-Amaro, 2023). Además, se está usando en ingeniería metabólica como organismo receptor para la producción de lípidos “inusuales” que son aquellos de cadena muy larga o corta y con números impares, conjugados y poliinsaturados y con diferencias en el tipo de grupo funcional comparado con los lípidos habituales encontrados en la naturaleza, despertando un gran interés en diversas industrias por sus aplicaciones y valor económico (Park y Nicaud, 2020).

Sin embargo, además de en la levadura *Y. lipolytica*, las herramientas de edición genética y estrategias de ingeniería metabólica se están aplicando y estudiando en una gran variedad de levaduras no convencionales como *Trichosporon oleaginosus*, *R. toruloides*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus* o *Pichia kudriavzevii*, para solventar los problemas encontrados en los procesos biotecnológicos que se escalan o aplican en biorrefinerías usando estas levaduras como “fábricas celulares”, para potenciar algunas de las propiedades que presentan de forma innata o para producir novedosos compuestos de gran valor en el mercado (González y col., 2020a; Navarrete y col., 2020; Rajkumar y Morrissey, 2020; Navarrete y col., 2022; Chu y col., 2023).

Introducción

Por ejemplo, Lyu y col. (2021) sobreexpresaron genes responsables de la degradación de compuestos fenólicos para potenciar la robustez y resistencia de la levadura roja *R. toruloides* frente a posibles compuestos inhibidores presentes en el medio de cultivo. Estos autores lograron un 30 % de mejora en el crecimiento de esta levadura cultivándola en hidrolizados concentrados derivados de biomasa lignocelulósica, mejorando también la acumulación de lípidos en un 25 %. Por otro lado, Strucko y col. (2021) trabajaron en un nuevo método CRISPR/Cas basado en plásmidos para la edición genética eficiente de la levadura halotolerante *D. hansenii*, cuya disponibilidad de técnicas moleculares eficientes descritas era limitada, consiguiendo desarrollar herramientas de edición eficaces que incluso podrían adaptarse a otras levaduras no convencionales



2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El trabajo de esta Tesis Doctoral se enmarca en las actividades de investigación de la Unidad de Biocarburantes del CIEMAT (Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas), concretamente en los proyectos de investigación nacionales denominados: ACMIBIO (Aceites microbianos para la producción de biocarburantes avanzados: utilización de carboxilatos y azúcares como moléculas plataforma) y BIOMIO (Conversión de bio-residuos en aceites microbianos para la producción de biocombustibles) de los Programas Estatales de I+D+i orientados a los Retos de la Sociedad (Retos Investigación).

2.1. Justificación

La globalización y la industrialización masiva sumada al crecimiento demográfico (en 2050 se estima una población mundial de 9700 millones según Naciones Unidas (2023)), han conducido al aumento de las necesidades y actividades dentro del sector energético y de transporte. Por lo tanto, uno de los focos de interés dentro de estos sectores para hacer frente al incremento de la demanda energética es el de los combustibles producidos a partir de biomasa renovable, los biocombustibles.

Este tipo de energía renovable encaja en el marco de las nuevas políticas emergentes de energía sobre uso de fuentes renovables que garanticen el desarrollo y seguridad energética. Además, hace frente a los problemas actuales del uso de las reservas finitas de combustibles fósiles, cuya combustión genera una creciente emisión de contaminantes y aumento de los gases de efecto invernadero (Antoni y col., 2007; Demirbas, 2009).

Asimismo, el aumento de la población mundial está llevando al agotamiento de recursos de manera insostenible debido al incremento de necesidades básicas y al desarrollo social y tecnológico actual. Todos estos factores, además de agotar recursos, también traen consigo la generación de toneladas de residuos que generan numerosos impactos negativos y gastos económicos en su gestión y eliminación.

Por estas razones expuestas, este trabajo se centra en la generación de moléculas base para destinar a la producción de biocombustibles avanzados a partir de i) microorganismos y ii) residuos.

Justificación y Objetivos

i) Se ha aprovechado el potencial biotecnológico de levaduras oleaginosas para acumular lípidos intracelulares en forma de lípidos neutros o triacilglicéridos (TAGs), a partir de los cuales se puede obtener biodiésel compatible con los motores diésel de combustión interna actuales, pudiendo incluirse en mezclas con diésel y producirse a partir de recursos renovables locales (Bharathiraja y col., 2017; Niño-Villalobos y col., 2020).

ii) El biodiésel, definido según la multinacional energética y petroquímica española, Repsol (2024), es “un combustible de origen natural, renovable y biodegradable, cuyo uso permite reducir las emisiones de gases de escape, ya que se produce a partir de materia orgánica, fundamentalmente aceites vegetales o grasas animales”. Sin embargo, para evitar conflictos éticos y de lucha por recursos debido al destino de cultivos vegetales o cultivos alimentarios para la producción de biocombustibles, en este trabajo se han usado como materias primas residuos biológicos, que además de volver a la cadena de producción y valorizarse resultan ser más económicos.

2.2. Objetivos

El objetivo general de la investigación desarrollada ha sido la producción de aceite microbiano junto con otros productos de alto valor añadido, incluyendo principalmente compuestos carotenoides para conseguir aumentar la rentabilidad del proceso final, usando materias primas residuales. Para ello se ha llevado a cabo el crecimiento de levaduras oleaginosas en medios azucarados procedentes de residuos agrícolas de cultivos en invernaderos y residuos de naturaleza lignocelulósica y/o ricos en celulosa de origen urbano. Se han empleado diferentes estrategias de cultivo a escala laboratorio usando biorreactores y medios de crecimiento tanto de composición definida como derivados de residuos. De esta forma, se ha perseguido el diseño de un bio-proceso más sostenible y atractivo a nivel industrial, con el uso de materias primas económicas, la valorización de residuos, la producción de compuestos de alto valor añadido en el mercado como los carotenoides y la producción de aceite microbiano para su conversión

en biocombustibles avanzados, entre otras aplicaciones. La Figura 2.1 muestra de forma resumida las etapas del bio-proceso planteado en esta Tesis.

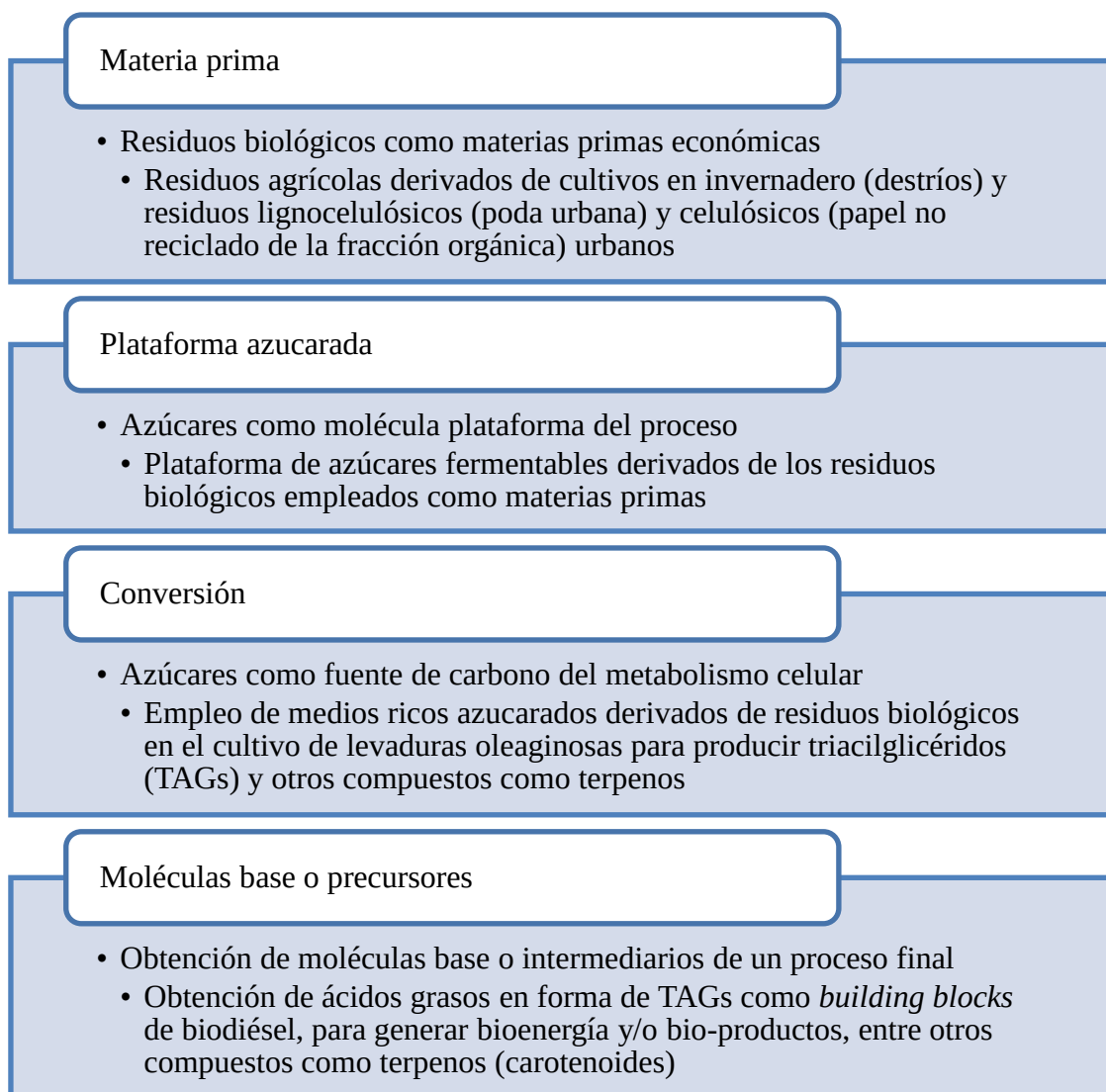


Figura 2.1. Etapas resumidas del proceso planteado en este estudio

Para mayor detalle se enumeran a continuación los principales objetivos específicos planteados en el Plan de Investigación y alcanzados en esta Tesis Doctoral:

1. Establecer las condiciones óptimas de aprovechamiento de los carbohidratos presentes en la materia prima empleada en los bio-procesos como son los residuos agrícolas y los residuos lignocelulósicos y celulósicos urbanos.
2. Establecer las condiciones de operación óptimas para la producción de aceite microbiano en forma de TAGs y otros productos a partir de azúcares utilizando levaduras

Justificación y Objetivos

no convencionales como *Cryptococcus curvatus*, *Rhodospiridium toruloides* y *Yarrowia lipolytica* y diferentes estrategias de cultivo.

3. Desarrollar un esquema de conversión adecuado de azúcares a aceite microbiano utilizando levaduras oleaginosas y estudiar las mejoras futuras del proceso, usando ensayos modelo y herramientas de análisis tecno-económico para conocer la rentabilidad del proceso a escala industrial, flujos de materia y energía, costes y beneficios.

4. Estudiar el cultivo de levaduras modificadas genéticamente usando medios de crecimiento derivados de residuos; con el fin de desarrollar un proceso donde el coste de la materia prima sea bajo pero los rendimientos alcanzados en cuanto a producción sean más elevados que los logrados usando cepas silvestres.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materia prima

En el desarrollo de las actividades descritas en este estudio se utilizaron diferentes residuos orgánicos como materias primas para la producción de aceite microbiano en forma de triacilglicéridos (TAGs) y otros productos de interés. Entre estos residuos se podían encontrar diversos destríos derivados de la agricultura intensiva bajo invernadero, suministrados por la empresa Albaida Residuos S.L. de Almería, residuos lignocelulósicos municipales (RLM) procedentes de la poda urbana de diferentes áreas de Madrid, suministrados por la Planta de Compostaje de Migas Calientes, y residuos celulósicos de rechazo (RCR) –incluyendo papel no reciclado encontrado en los residuos sólidos urbanos (RSU)–, suministrado por el gestor de residuos del Área Metropolitana de Barcelona (AMB).

Teniendo en cuenta la composición de estos residuos se consideraron como fuentes potenciales de carbono y de otros nutrientes, por lo tanto, se emplearon como materias primas en los ensayos con levaduras reflejados en apartados posteriores (apartados 3.4.1 – 3.4.3).

3.1.1. Tipologías de residuos

i) Residuos agrícolas procedentes de cultivos en invernaderos - Destríos

Dentro del sector hortofrutícola, el concepto de destrío hace referencia a las frutas y verduras que se descartan para su comercialización por no cumplir los estándares de calidad establecidos para ello. Tamaño, aspecto, contaminación causada por otros organismos o daños por fenómenos climatológicos, como granizo, son las propiedades que conforman estos estándares de calidad y determinan la viabilidad del producto. En este estudio se han caracterizado y empleado como materias primas destríos de tomate, pimiento, sandía, pepino y berenjena. La Figura 3.1-A recoge varios de estos residuos. Para los ensayos se han considerado tanto el residuo procedente de un único cultivo, así como las mezclas de destríos, simulando el modo de operación de una futura biorrefinería.

ii) Residuos lignocelulósicos municipales (RLM) - Poda urbana

Residuos lignocelulósicos procedentes de la poda de árboles de parques, jardines, avenidas y áreas urbanas afines, como el olmo (*Ulmus pumila*) y el plátano de sombra o de paseo (*Platanus × hispanica*), han sido tratados para aprovechar los azúcares que los componen como fuentes de carbono. La Figura 3.1-B recoge un tipo de poda urbana tras molerse para ser pretratada. La fracción final que se usará como medio de cultivo a partir de esta materia prima es el hidrolizado enzimático procedente de poda pretratada, nombrado en este estudio como HPO.

iii) Residuos celulósicos de rechazo (RCR)- Papel no reciclado

Residuos de papel, de celulosa, procedentes de la recogida no selectiva en la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (RSU), han sido tratados para obtener medios de cultivo ricos en los azúcares que los conforman. Este papel de rechazo, desechado en la basura, no es apto para su conversión a un nuevo producto tras su descarte, de forma que no puede ser valorizado como ocurre con el papel reciclado (Figura 3.1-C). La fracción final que se usará como medio de cultivo a partir de esta materia prima es el hidrolizado enzimático procedente de papel pretratado, nombrado en este trabajo como HPA.



Figura 3.1. A) Mezcla de destríos de berenjena, pepino y tomate. B) Poda urbana molida. C) Papel no reciclado en la fracción orgánica de los RSU mezclados con otros residuos.

3.2. Azúcares como molécula plataforma del proceso

Los diferentes residuos empleados como materias primas son ricos en carbohidratos de interés para usar como fuentes de carbono, además de aportar otros nutrientes y elementos necesarios para el metabolismo y crecimiento de los microorganismos de estudio. El primer paso consistió en hacer disponibles los

carbohidratos complejos, transformándolos en carbohidratos simples, para la correcta asimilación de éstos por parte de las levaduras.

3.2.1. Tratamiento de los destríos

La obtención de un medio apto para el cultivo de las levaduras a partir de los destríos requirió del procesado de esta materia prima (Figura 3.2). En primer lugar, se procedió a una etapa de troceado y triturado con una licuadora industrial Danamix TR/bM-330 (SAMMIC; Azkoitia, España). Tras esta fase de homogeneización, se llevó a cabo un proceso de centrifugación para separar la fracción líquida (FL) de la fracción sólida. Para ello se empleó una centrífuga tipo cesta RTL2BD (COMTEIFA; Barcelona, España) con bolsa filtrante de líquido con distinta gama de porosidad de 1 a 200 μm (elección de poro según tipo de materia prima) y unas condiciones de centrifugación de 3000 rpm durante 15 min.

Finalmente, tras obtener las dos fracciones se determinó su composición de acuerdo con el procedimiento descrito en los apartados 3.6.1. y 3.6.3. Igualmente, una parte de la biomasa residual inicial fue analizada según el apartado 3.3. De esta forma es posible conocer el potencial como materia prima que tiene este tipo de residuo, determinando el balance de materia completo, aunque finalmente de los destríos sólo la fracción líquida rica en azúcares fue la empleada en los ensayos de la presente Tesis.

La fracción líquida obtenida tras este proceso (Figura 3.2) fue empleada como medio de cultivo directamente tras su esterilización mediante filtración (Nalgene Rapid Flow® 0,22 μm) sin la adición de ningún nutriente externo. Se evitó el proceso de esterilización por autoclave para evitar la posible pérdida de los azúcares presentes, evitando reacciones indeseables como las reacciones de *Maillard* (Hill y Patton, 1947) (reacción entre carbonilos y aminas), impidiendo así la transformación de los azúcares en otros compuestos que podrían no ser asimilables por las levaduras e incluso podrían descomponerse en otras especies químicas inhibitoras del crecimiento celular.



Figura 3.2. Resumen del proceso de obtención de medio de cultivo a partir de destríos

3.2.2. Pretratamientos de los RLM y RCR

i) RLM – poda urbana

La ruptura de la estructura de la lignocelulosa que conforma los RLM es fundamental para permitir que las enzimas hidrolíticas (celulasas y hemicelulasas) tengan acceso a los carbohidratos que componen la biomasa lignocelulósica y así generar azúcares monoméricos fermentables.

El pretratamiento seleccionado para esta materia prima fue el pretratamiento de explosión con vapor (EV) basada en la tecnología Mansonite propuesta en 1926 por W. H. Mason aplicada a la fabricación de tableros de compresión de fibra (Wan y col., 2022). Este pretratamiento se llevó a cabo en una unidad piloto que opera en discontinuo, la cual forma parte de una instalación situada en el CIEMAT (Madrid). Las condiciones de pretratamiento de este residuo lignocelulósico fueron seleccionadas en base a estudios previos realizados en la Unidad de Biocarburantes del CIEMAT (Negro y col., 2020).

La unidad de EV consta de un reactor de 2 L, un generador que suministra vapor saturado al interior del reactor y un ciclón de descarga (Figura 3.3). El RLM se impregnó durante aproximadamente 20 h en 40 mg de ácido sulfúrico/g RLM. La solución que se utilizó para impregnar la biomasa fue H_2SO_4 al 0,5 % (v/v). Pasado este tiempo, la biomasa se cargó en el reactor y se sometió a condiciones controladas de temperatura, tiempo de residencia y presión (dependiente esta última de la temperatura a alcanzar). La temperatura seleccionada fue de 195 °C, 11,5 bares de presión aproximadamente y un tiempo de residencia de 10 min. Tras alcanzar la temperatura y pasado el tiempo de residencia establecido, se produjo una rápida despresurización mediante la apertura de la válvula inferior, recogiendo el material pretratado (*slurry*) en el ciclón de descarga.

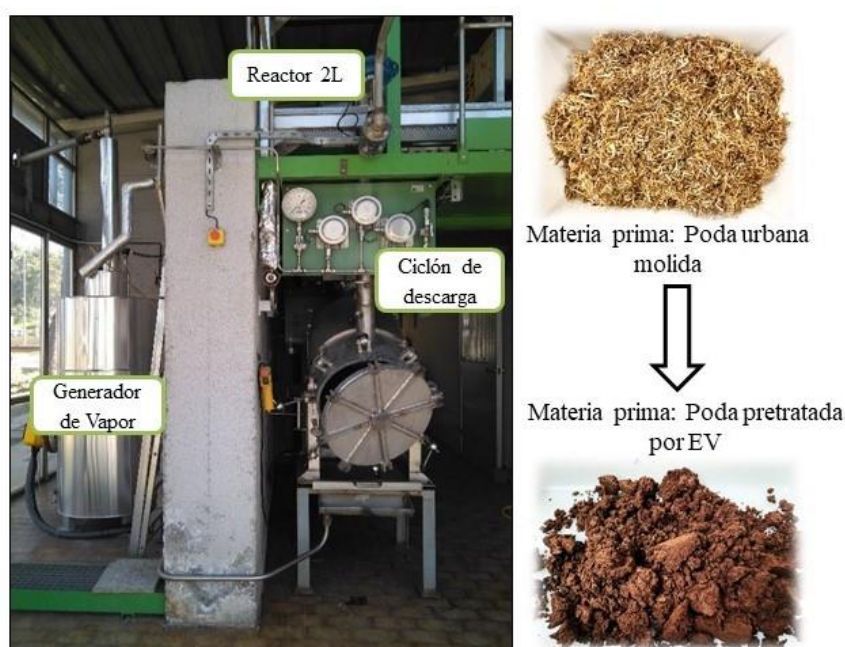


Figura 3.3. Unidad de EV y sus componentes principales (izq.). Tras el pretratamiento se observa el cambio de estructura que sufre la materia prima residual (Ej.: Poda urbana) (dcha.).

Después de realizar el pretratamiento de EV, el *slurry* fue sometido a una filtración a vacío, separándose en una fracción sólida y en una fracción líquida. La FL se recolectó y el residuo sólido fue lavado con agua. El residuo sólido insoluble (RSI) se caracterizó en cuanto a su composición en componentes estructurales mayoritarios, siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.3. En la fracción líquida obtenida del *slurry* se analizaron los azúcares y los compuestos de degradación presentes en dicha fracción, siguiendo las metodologías detalladas en los apartados 3.6.1 y 3.6.3.

ii) RCR – papel de la fracción orgánica

En cuanto al RCR, fue sometido a un pretratamiento menos severo que el RLM. El tratamiento se llevó a cabo a temperatura ambiente, a pH 5, ajustado con H₂SO₄, en presencia de un tensoactivo no iónico (Tween 20, 2,5 mL/100 g RCR) durante 4 h. De esta forma se trató este residuo antes de llevar a cabo la hidrólisis enzimática, haciendo más disponible, tras el pretratamiento, la estructura de la celulosa en el RSI frente a las enzimas y eliminando posibles sustancias inhibidoras o tóxicas como las tintas.

3.2.3. Hidrólisis enzimática de los RSI de los RLM y RCR

El RSI, procedente del pretratamiento de los RLM y de los RCR, se sometió a hidrólisis enzimática (HE) para obtener azúcares fermentables (Figura 3.4). La HE se realizó en un biorreactor de tambor de 15 L (Infors-HT Terrafors, Suiza) a 50 °C y pH 5 (tampón citrato de sodio 0,05 M para los RLM y tampón acetato 0,1 M para los RCR) durante 72 h. La hidrólisis se realizó con una concentración de sustrato del 15 % (p/p), con 0,025 mL/g de sustrato de Tween 20 (TW00200250, Scharlab), utilizando una mezcla comercial de enzimas (SAE0020-Sigma Aldrich) a 60 mg de proteína/g glucano. Esta mezcla enzimática contiene actividades celulasas, β -glucosidasas y hemicelulasas, entre otras.

Tras la hidrólisis, se procedió a la separación del hidrolizado enzimático para obtener la fracción líquida a usar como medio de cultivo mediante centrifugación y filtración.

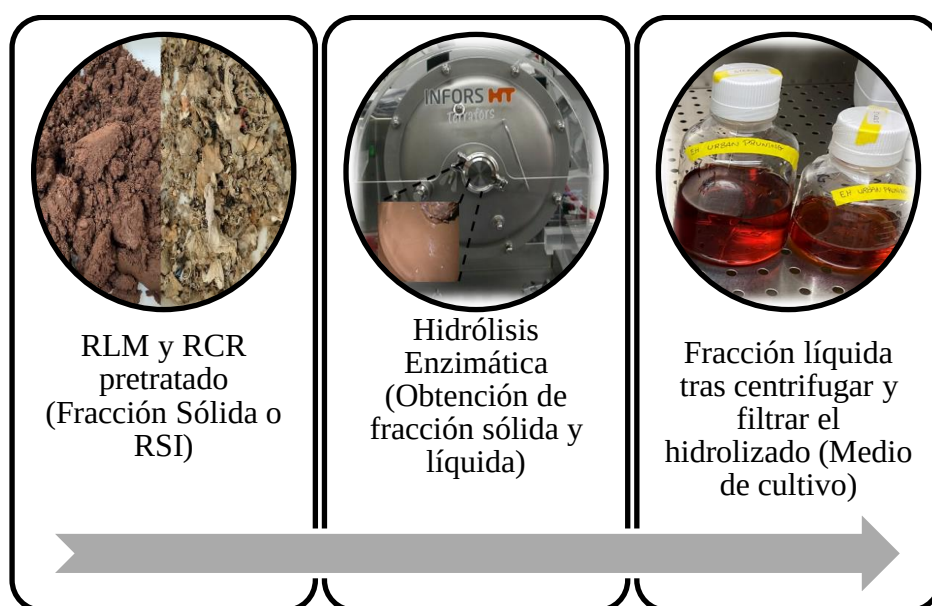


Figura 3.4. Proceso de HE para obtener medios de cultivos apropiados a partir de RLM y RCR pretratados.

3.3. Caracterización de la materia prima

El análisis de los componentes estructurales mayoritarios se realizó tanto en las materias primas como en los sólidos insolubles obtenidos tras el pretratamiento, según los procedimientos establecidos en los métodos analíticos estándar (*Laboratory Analytical Procedure* (LAP)) desarrollados por el *National Renewable Energy Laboratory* de EE.UU. (NREL) y adaptados en el laboratorio de la Unidad de Biocarburantes Avanzados y Bioproductos del CIEMAT. Estos protocolos permiten determinar los porcentajes relativos a los diferentes componentes mayoritarios: extractivos, carbohidratos estructurales, lignina (en el caso de biomasa lignocelulósica) y cenizas.

En el esquema recogido en la Figura 3.5 se muestran todos los procedimientos llevados a cabo para determinar la composición de la materia prima. En primer lugar, se determinó la humedad y el contenido en cenizas totales de la materia prima (Sluiter y col., 2008b) (procedimiento del NREL/TP-510-42622). A continuación, para determinar el contenido en extractivos fue necesaria una doble extracción con agua y etanol (Sluiter y col., 2008d) (procedimiento del NREL /TP-510-42619). El contenido en carbohidratos

Materiales y Métodos

del material sólido extraído insoluble se determinó a través de una correlación de los monómeros obtenidos tras una hidrólisis con ácido sulfúrico en dos fases:

- La primera fase consistió en una hidrólisis con ácido sulfúrico concentrado al 72 % (p/p) (30 °C durante 30 min).
- La segunda fase se llevó a cabo con ácido sulfúrico diluido al 4 % (p/p) (121 °C durante 1 h).

Tras la hidrólisis, se llevó a cabo una filtración a vacío del material resultante y de la fracción líquida se determinaron el contenido en sólido ácido soluble por espectrofotometría de UV a 205 nm y los azúcares monoméricos por HPLC/IR (*High Performance Liquid Chromatography – detector Índice de Refracción*) (apartado 3.6.1.). En el caso de la biomasa lignocelulósica (poda urbana), para determinar las fracciones de celulosa y hemicelulosa se asumió que toda la glucosa procedía del homopolímero de celulosa y la xilosa, arabinosa, galactosa y manosa procedían del heteropolímero de hemicelulosa. Se aplicó un factor de corrección de 1,1 para las hexosas y 1,13 para las pentosas hidrolizadas teniendo en cuenta la estequiometría de las reacciones de hidrólisis. En el residuo sólido insoluble que se generó tras la hidrólisis ácida se determinó el contenido en lignina y en cenizas ácido-insolubles a través de gravimetría y calcinación respectivamente (Sluiter y col., 2008a; Sluiter y col., 2008c) (procedimiento del NREL/TP-510-42627 y NREL/TP-510-42618).

Igualmente, se analizó la composición en azúcares y la composición en productos de degradación de la fracción líquida obtenida tras pretratar el RLM por EV. Se tomaron varias alícuotas de esta FL. Por una parte, se determinó la concentración de azúcares monoméricos presentes mediante HPLC. Por otra parte, para determinar la concentración de azúcares totales se llevó a cabo una hidrólisis con ácido sulfúrico al 4 % (v/v) durante 30 min a 121 °C. Teniendo en cuenta la diferencia entre la concentración de azúcares totales y la de azúcares monoméricos antes de la hidrólisis ácida, se puede calcular la concentración de azúcares en forma oligomérica de la fracción líquida. El contenido de ácidos orgánicos y fenoles de esta fracción también fue analizado por HPLC (véase apartado 3.6.3.).

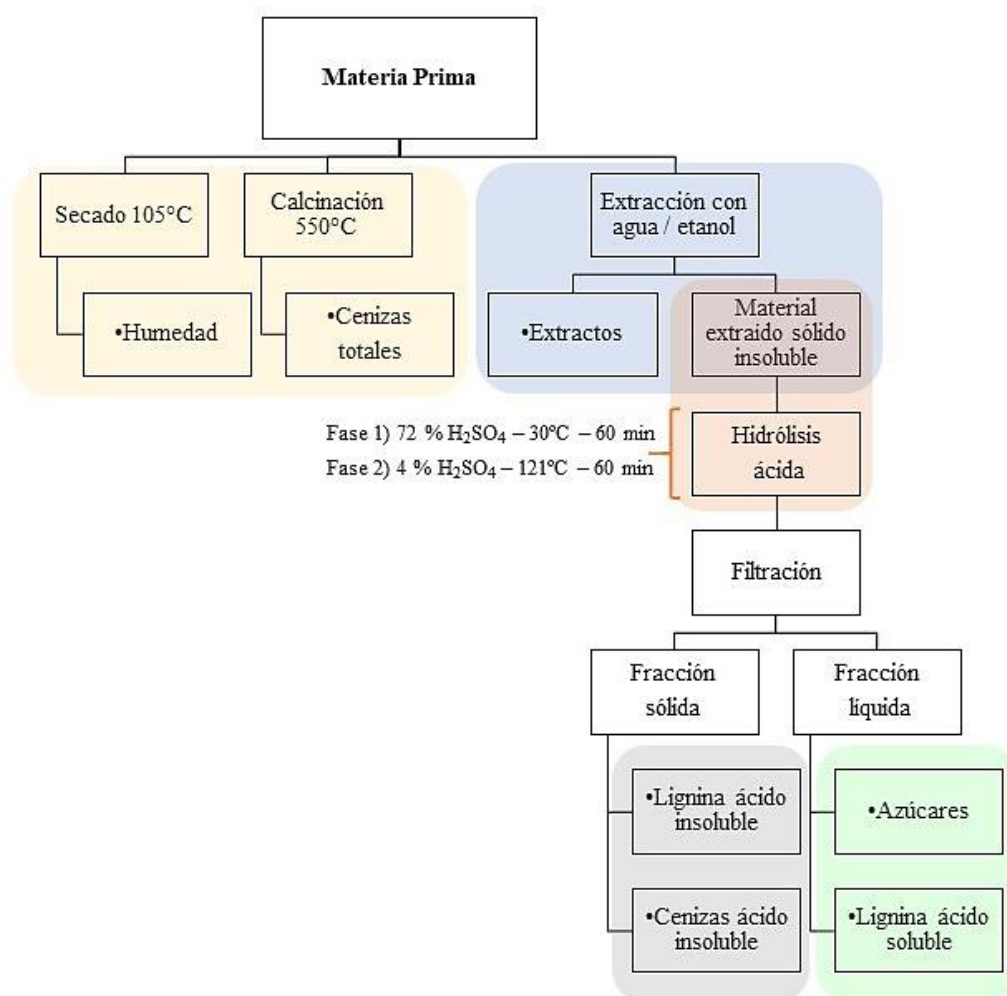


Figura 3.5. Proceso general para determinar la composición de la materia prima. La lignina ácido soluble e insoluble se determina en el caso de las materias primas de naturaleza lignocelulósica.

3.4. Levaduras oleaginosas

Las levaduras oleaginosas recogidas en la Tabla 3.1 fueron los microorganismos de estudio seleccionados para la producción de aceite microbiano en forma de TAGs, así como otros compuestos de interés.

Tabla 3.1. Especies de estudio y procedencia

Primera fase de estudio	
Especie	Colección
<i>Cryptococcus curvatus</i> CL6032	Biobanco Nacional del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), España
<i>Yarrowia lipolytica</i> CECT1240	Colección Española de Cultivos Tipo
<i>Lipomyces lipofer</i> NRRL-Y-11555	Agricultural Research Service Culture Collection (Northern Regional Research Laboratory)
<i>Rhodospiridium toruloides</i> C4	Laboratorio Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)
Segunda fase de estudio	
Especie	Colección
<i>Cryptococcus curvatus</i> (<i>Cutaneotrichosporon curvatum</i>) NRRL-Y-1511	Agricultural Research Service Culture Collection (Northern Regional Research Laboratory)
<i>Rhodospiridium</i> (<i>Rhodotorula</i>) <i>toruloides</i> ATCC 204091	American Type Culture Collection
Tercera fase de estudio – Levaduras Modificadas Genéticamente	
Especie	Colección
<i>Yarrowia lipolytica</i> S114 (producción β - caroteno)	Imperial College London e INRAE
<i>Yarrowia lipolytica</i> S2542 (producción violaceína)	Imperial College London e INRAE
<i>Yarrowia lipolytica</i> PHS32 (producción indigoidina)	Departamento de Bioingeniería -Imperial College London

En una primera etapa, las especies *Cryptococcus curvatus* CL6032, *Yarrowia lipolytica* CECT1240, *Lipomyces lipofer* NRRL-Y-11555 y *Rhodospiridium toruloides* C4 fueron estudiadas en medio sintético para examinar la acumulación de TAGs.

En primer lugar, las células se cultivaron en medio YPD (*Yeast extract-Peptide-Dextrose*) (20 g/L de glucosa, 20 g/L de peptona y 20 g/L de extracto de levadura) para la activación del metabolismo y crecimiento celular. Tras 24 h de pre-cultivo, se prepararon los inóculos para estudiar estas levaduras en biorreactores bajo condiciones de cultivo en *batch*. Para ello, un volumen de células determinado (según el requerido para inocular a una DO concreta, detallada más adelante según la especie estudiada) se centrifugó a 3000 *g* durante 5 min. Tras este paso, el sobrenadante fue retirado y las células fueron lavadas con agua destilada estéril dos veces. A continuación, el sedimento celular se diluyó con agua destilada estéril para obtener el inóculo final.

Se ha trabajado con dos tipos de medio definido para desencadenar la acumulación lipídica. El medio nombrado como MLO (Medio de Levaduras Oleaginosas) (Li y col., 2007b; Anschau y col., 2014; Chang y col., 2015) tenía la siguiente composición: 50 g/L de glucosa, 1 g/L de peptona y 1 g/L de extracto de levadura, 1,5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 11,4 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 3,4 g/L de ácido cítrico. El otro medio YNB (*Yeast-Nitrogen-Base*) presentaba la siguiente composición: 50 g/L de glucosa, 2 g/L de peptona, 1 g/L de extracto de levadura y 1,7 g/L de YNB sin aminoácidos y sin sulfato de amonio (YNB composición por litro: 1 g de fosfato de potasio, 0,5 g de sulfato de magnesio, 0,1 g de cloruro de sodio, 0,1 g de cloruro de calcio, 0,5 mg de ácido bórico, 0,04 mg de sulfato de cobre, 0,1 mg de yoduro de potasio, 0,2 mg de cloruro férrico, 0,4 mg de sulfato de manganeso, 0,2 mg molibdato de sodio y 0,4 mg de sulfato de zinc).

Las condiciones seleccionadas de temperatura y pH (determinadas en estudios previos en la Unidad de Biocarburantes del CIEMAT) fueron $28,0 \pm 0,1$ °C y pH $6,0 \pm 0,1$ (el pH se mantuvo con HCl 2 M y KOH 2 M). En la aireación del medio, necesaria para el crecimiento de estas levaduras, se usó un flujo de aire constante de 1 vvm (mL de aire por mL de medio por min) y una agitación variable de 500-1500 rpm para mantener el oxígeno disuelto en una concentración superior al 20 % v/v de saturación de aire. Estos ensayos se llevaron a cabo en biorreactores Biostat B-Plus

Materiales y Métodos

(Sartorius; Göttingen, Alemania) de 1 L con 450 mL de medio, utilizando además una solución antiespumante al 2 % (v/v) (Antifoam 289, Sigma-Aldrich Merck, Darmstadt, Alemania) según fuera necesario para evitar la formación de espuma (se añadieron 4 mL antes de la inoculación).

Se tomaron muestras periódicamente para analizar azúcares y concentración de biomasa celular como se recoge en el apartado de determinaciones analíticas (apartado 3.6). Al final del ensayo, las células se recogieron por centrifugación, se lavaron con agua y se congelaron previamente a su liofilización (Telstar LyoQuest, España) para someterlas a los procesos de extracción y análisis de lípidos totales y ácidos grasos derivados de TAGs como se muestra en apartados posteriores (apartados 3.6.4. y 3.6.5.).

Tras ensayos en medio sintético, se siguieron estudiando las levaduras oleaginosas cultivándolas en los medios derivados de los residuos seleccionados en la presente Tesis y variando las estrategias de cultivo (apartado 3.5). En las siguientes etapas, se trabajaron con las especies mencionadas en la Tabla 3.1 de la segunda fase de estudio, *Cryptococcus curvatus* (*Cutaneotrichosporon curvatum*) NRRL-Y-1511 y *Rhodospiridium* (*Rhodotorula*) *toruloides* ATCC 204091, además de continuar los ensayos con la levadura seleccionada de la primera fase (*C. curvatus* CL6032). En los ensayos finales, se incorporaron nuevas cepas de la especie *Yarrowia lipolytica* modificadas genéticamente procedentes del Departamento de Bioingeniería del *Imperial College London* y obtenidas en colaboración con la *Université Paris-Saclay*, *INRAE*, *AgroParisTech*, *Micalis Institute* (Tabla 3.1).

Para la propagación de los microorganismos y llevar a cabo los preinóculos se fijaron las siguientes condiciones: 20-50 mL de medio YPD en matraces Erlenmeyer de 100-250 mL con deflectores laterales a 26-28 °C (dependiendo del microorganismo) y 180 rpm.

En los siguientes apartados (3.4.1. – 3.4.3.) se señalan las especies finales seleccionadas para los estudios en medios reales derivados de las materias primas reflejadas en este trabajo (destríos, RLM y RCR).

3.4.1. *Cryptococcus curvatus*

La producción de aceite microbiano en *C. curvatus* CL6032 se evaluó en biorreactores de capacidad 1 L Biostat B-Plus (Sartorius; Göttingen, Alemania), utilizando un volumen de trabajo inicial de 450 mL de las correspondientes fracciones líquidas y las mismas condiciones que las fijadas en medio sintético. Estas fracciones estudiadas procedían del destrío de tomate, pimiento y sandía. Las células se inocularon con una densidad óptica inicial (DO a 600 nm) de 1 y se cultivaron siguiendo una estrategia de tipo alimentación por pulsos (*fed-batch*) (apartado 3.5.2) durante 168 – 192 h, momento en que se observó el agotamiento de las fuentes de carbono o una concentración de glucosa por debajo de 10 g/L. Se tomaron muestras periódicamente para analizar azúcares y concentración de biomasa celular como se recoge en el apartado de determinaciones analíticas.

Se evaluó el crecimiento y la producción de lípidos en biorreactores con diferentes relaciones C/N iniciales de 15, 30 y 50 con el fin de maximizar la acumulación lipídica intracelular. En este contexto, las fracciones líquidas se utilizaron directamente (C/N 15) y mezcladas en proporción 1:1 (C/N 30) o 1:2 (C/N 50) con una solución de azúcar que contenía fructosa, glucosa y sacarosa en concentraciones conocidas y simulando las de los medios reales, para mantener las concentraciones iniciales de azúcares medidas en cada medio derivado de los residuos. En los cultivos con relaciones C/N iniciales de 30 y 50, siguiendo una estrategia *fed-batch*, un único pulso de glucosa fue incorporado al medio a diferencia del cultivo con relación C/N inicial de 15 que recibió dos.

Se diseñó la estrategia con un solo pulso en las fracciones derivadas de destríos que previamente habían sido mezcladas con soluciones azucaradas en proporción 1:1 o 1:2 como se mencionó anteriormente. En los cultivos donde se empleó el medio derivado de los residuos directos (sin mezclar con solución azucarada) se diseñó la estrategia con dos pulsos para conseguir una acumulación lipídica mayor que con un solo pulso, ya que se partió de una relación C/N inicial menor. Los pulsos añadidos en la estrategia de cultivo para renovar la fuente de carbono fueron soluciones de glucosa concentrada de forma que en el medio se alcanzara una concentración de 30-50 g/L de este azúcar tras el pulso.

3.4.2. *Rhodosporidium toruloides*

La producción de aceite microbiano y carotenoides en *Rhodosporidium (Rhodotorula) toruloides* ATCC 204091 se evaluó en biorreactores de capacidad 0,5 L (MiniBio Applikon® Biotechnology), utilizando un volumen de trabajo inicial de 250 mL de las correspondientes fracciones líquidas del destrío de pimienta (materia prima seleccionada de los ensayos previos) esterilizadas por filtración. Los ensayos se realizaron a $30,0 \pm 0,1$ °C, siendo el resto de las condiciones iguales a las de los cultivos con *C. curvatus*. En este caso se añadieron 2 mL de una solución antiespumante al 2 % (v/v) (Antifoam 289, Sigma-Aldrich Merck, Darmstadt, Alemania) antes de la inoculación.

Las células se inocularon con una densidad óptica inicial (DO a 600 nm) de 0,6 y se cultivaron siguiendo estrategias de tipo alimentación por pulsos, A) *fed-batch*, y estrategias de tipo B) *batch* en dos etapas (apartados 3.5.2 y 3.5.3). Se tomaron muestras periódicamente para analizar azúcares y concentración de biomasa celular (apartados 3.6.1 y 3.6.2).

- 1) En las estrategias *fed-batch* de estos ensayos los pulsos de glucosa fueron sustituidos por pulsos de HPO y de HPA concentrados. Se concentraron de forma que en el medio se aportase aproximadamente 50 g/L de azúcar tras el pulso.
- 2) La estrategia de tipo *batch* en dos etapas consistió en un biorreactor con el medio derivado de la fracción soluble de destrío de pimienta como medio de crecimiento y otro con el medio de HPO o de HPA como medio de acumulación de TAGs. El estudio de acumulación lipídica se hizo sobre las células crecidas en el segundo biorreactor.

3.4.3. *Yarrowia lipolytica*

La producción de los pigmentos β -caroteno, violaceína e indigoidina en *Y. lipolytica* S144, S2542 y PHS32, respectivamente, se evaluó en cultivos en placas multipocillos para cultivos celulares de 48 pocillos utilizando un volumen de trabajo inicial de 2 mL de las correspondientes fracciones líquidas. Los ensayos se realizaron en agitadores a 30 °C a 700 rpm y sin control de pH (partiendo de pH iniciales de 4,8-5,2, dependiendo del medio) durante 72 h. Las células se inocularon con una densidad óptica

inicial (DO a 600 nm) de 0,8 y se cultivaron siguiendo una estrategia de tipo *batch* (apartado 3.5.1.).

Las fracciones líquidas empleadas fueron las de pimiento de destrío, las de mezcla de destríos de berenjena, tomate y pepino y las de HPO. Se emplearon medios de control que simulaban las concentraciones y composición de los medios reales respecto a azúcares, nitrógeno y ácido cítrico.

Además, estos ensayos se realizaron en medio derivado del pimiento de destrío replicando las mismas condiciones de cultivo anteriormente señaladas en este apartado, pero a mayor volumen de medio. Los cultivos se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 50 mL sin hendiduras y de 500 mL con hendiduras utilizando un volumen de trabajo inicial de las correspondientes fracciones líquidas de 20 mL, para estudiar la cepa productora de β -caroteno y violaceína, y de 200 mL para estudiar la cepa productora de β -caroteno.

3.5. Estrategias de cultivo

3.5.1. Batch

La estrategia *batch* o cultivo en discontinuo consistió en un modo de cultivo donde las levaduras se cultivaron sin incorporación de nuevos nutrientes durante la fermentación, tratándose de un proceso sin intervención externa tras iniciarse. Desde el inicio las levaduras permanecieron en el mismo medio sin alimentación en el tiempo, sin retirada de medio y sin cambio de biorreactor. Sólo se tomaron periódicamente volúmenes de muestra del cultivo para llevar un control de éste (Figura 3.6).

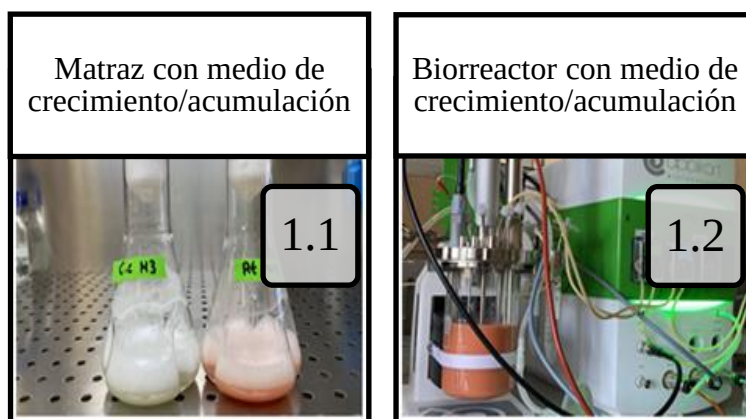


Figura 3.6. Estrategia batch. Levaduras crecidas en un medio de cultivo sin aporte externo de nueva fuente de carbono ni cambio a otro medio fresco

3.5.2. Fed-batch

La estrategia *fed-batch* o cultivo alimentado de forma discontinua consistió en la introducción del sustrato limitante en forma concentrada en el biorreactor. Para ello, dependiendo del ensayo, se emplearon pulsos de glucosa comercial, pulsos de HPO concentrado o pulsos de HPA concentrado. Estos medios se suministraron por inyección, tras previamente retirar el mismo volumen de cultivo que el introducido en los pulsos de nutrientes (Figura 3.7). Para concentrar los pulsos de HPO y de HPA se usó un evaporador rotatorio (Heidolph, Alemania).

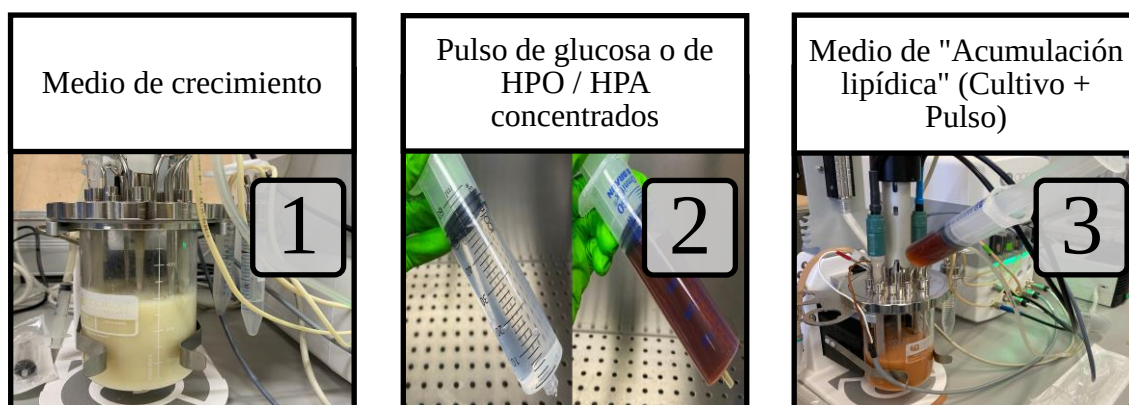


Figura 3.7. Estrategia fed-batch. **Primera fase:** Levaduras crecidas en medio de cultivo rico en azúcares y otros nutrientes. **Segunda fase:** Incorporación de pulso azucarado tras el agotamiento de las fuentes de carbono (disminución de otras fuentes de nutrientes esenciales como el nitrógeno). **Tercera fase:** Levaduras crecidas en un medio con una relación C/N mayor, más propenso para desencadenar la acumulación de TAGs.

3.5.3. Batch en dos etapas

La estrategia *batch* en dos etapas o cultivo en discontinuo en dos etapas consistió en una primera fase de cultivo de las células en un biorreactor con un medio de crecimiento bajo condiciones estériles. Tras el consumo total de las fuentes de carbono de este primer medio y la producción de biomasa celular, se pasó a una segunda etapa donde se inocularon todas las células a un segundo biorreactor con un medio más apropiado para la acumulación de aceite microbiano (Figura 3.8).

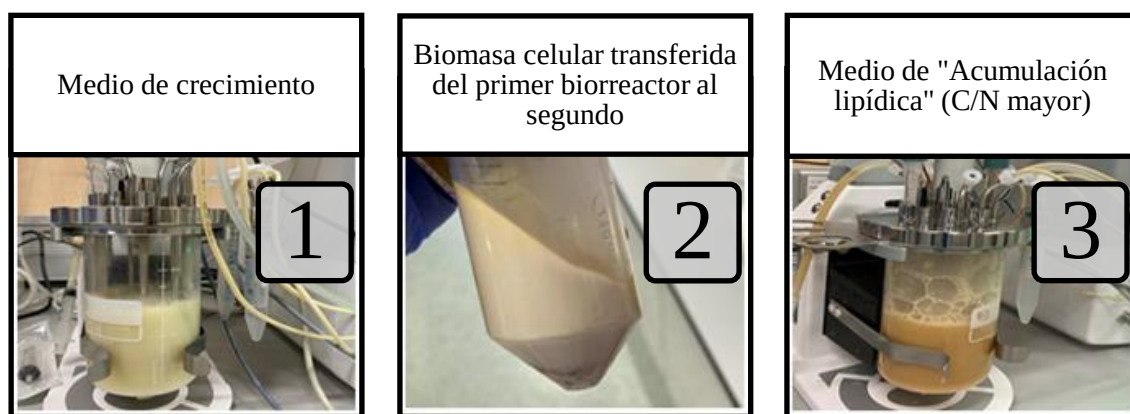


Figura 3.8. Estrategia batch en dos etapas. **Primera fase:** Levaduras crecidas en medio de cultivo rico en azúcares y otros nutrientes. **Segunda fase:** Tras el agotamiento de las fuentes de carbono, recolección de la biomasa celular crecida en el primer biorreactor. **Tercera fase:** Inoculación de la biomasa recolectada en un segundo biorreactor con medio de HPO o de HPA como medio de acumulación de TAGs.

3.6. Determinaciones analíticas

3.6.1. Determinación de azúcares y nitrógeno

Las concentraciones de azúcares de los medios de cultivo, antes y durante las fermentaciones, así como los posibles metabolitos secretados al medio (manitol), se determinaron por análisis cromatográfico utilizando un equipo HPLC Waters Alliance 2695, con detector de índice de refracción (detector 2414), equipado con una columna cromatográfica Carbo Sep CHO 782 (Transgenomic, Nebraska, USA) a una temperatura de 70 °C. Como fase móvil se empleó agua ultrapura desgasificada con un flujo de 0,5 mL/min.

Materiales y Métodos

Las concentraciones de nitrógeno de los medios sintéticos, de los medios derivados de los residuos de estudio y de los sobrenadantes se analizaron por el método *Kjeldahl* usando un sistema *Kjeldahl* MultiKjel K-365 con valorador potenciométrico Metrohm ECO (Büchi Labortechnik, Suiza).

3.6.2. Determinación del crecimiento celular

i) Peso seco celular

Se determinó el peso seco de la biomasa celular para conocer el crecimiento de las levaduras en los ensayos. La cuantificación del peso de células secas se determinó utilizando 2 mL de muestra. Las células se centrifugaron a 16000 *g* durante 10 min; el sedimento celular se lavó con agua destilada y, tras resuspender, las células se filtraron a través de una membrana de nitrocelulosa de 0,22 μm (Merck Millipore) previamente pesada. Posteriormente, las células se secaron en estufa a 50 °C durante 24 h, se pesaron después de 30 min en un desecador, y se mantuvo esta etapa final hasta obtener un peso constante. El peso se obtuvo de la diferencia de peso entre el filtro con las células y el filtro vacío considerando el volumen de levaduras filtrado.

ii) Densidad óptica

El crecimiento de la levadura también se determinó mediante la medida de la densidad óptica en un espectrofotómetro. La absorbancia de los cultivos de levaduras se midió a 600 nm utilizando espectrofotómetros UV/Vis (Biochrom Anthos Zenyth 200 y WPA Biowave).

iii) Viabilidad celular

El número de células totales y viables junto con el porcentaje de viabilidad se determinaron utilizando un analizador de viabilidad celular (Vi-CELL XR, Beckman Coulter).

3.6.3. Determinación de ácidos y fenoles o compuestos de degradación

La presencia de compuestos aromáticos (fundamentalmente fenoles) y otros compuestos de degradación (furanos) de las fracciones obtenidas tras los pretratamientos

y las fracciones líquidas finales se determinó por cromatografía líquida utilizando un equipo de HPLC (Agilent Technologies California, EE. UU) cuyo detector (1050 Photodiode-Array Agilent-serie-1200) permite obtener para cada pico cromatográfico el espectro completo de absorción ultravioleta. De esta forma, se puede realizar el análisis cuantitativo de cada compuesto. La separación de los compuestos tuvo lugar a 65 °C en una columna ICsep COREGEL87H3 (Transgenomic, Nebraska, EE. UU.). La fase móvil en modo isocrático consistió en un 89 % de ácido sulfúrico (0,005 M) y un 11 % de acetonitrilo a un flujo de 0,7 mL/min.

La concentración de ácidos en las fracciones líquidas se determinó también por HPLC (Waters Corporation, Massachusetts, EE. UU.), usando un detector de índice de refracción (Waters 2414). La separación de los ácidos tuvo lugar en una columna ICsep COREGEL-87H3 (Transgenomic, Nebraska, EE. UU) operando a 65 °C, cuya fase móvil consistió en ácido sulfúrico (0,005 M) con un flujo de 0,6 mL/min.

3.6.4. Determinación de lípidos totales

El contenido de lípidos totales se determinó por método gravimétrico siguiendo el método descrito por (Sha, 2013) con ciertas modificaciones como se detalla a continuación. Entre 70-80 mg de células liofilizadas se mezclaron con 3,2 mL de HCl 4 M y se incubaron en un baño a 55 °C durante 2 h para la lisis celular. Tras este periodo, se añadieron a las células 8 mL de una solución 2:1 (v/v) cloroformo:metanol y se continuó con la incubación en baño a 20 °C durante 3 h para proceder a la extracción de lípidos. Después de la etapa de incubación, la solución se transfirió a un tubo de vidrio para centrifugar a 2000 g durante 15 min usando un rotor basculante para facilitar la obtención de diferentes fases entre las que se encontrará la fase orgánica de cloroformo con los lípidos disueltos. La fase inferior donde se recogen los lípidos se recuperó en un nuevo tubo de vidrio previamente pesado. A la fase acuosa restante se le añadió 4 mL de cloroformo y se volvió a centrifugar para asegurar la extracción completa de todos los lípidos presentes en la solución con restos celulares. La fase orgánica generada se trasvasó al tubo de vidrio donde previamente se había recuperado el cloroformo con lípidos de la primera centrifugación. Tras esto, el cloroformo se evaporó bajo nitrógeno en un evaporador TurboVap LV (Zymark, Hopkinton, MA, USA). Los tubos con los lípidos se pesaron de nuevo para calcular el contenido de lípidos final acumulado por las

Material y Métodos

células. Los tubos se incubaron en una estufa de vacío (Heraeus Instruments, Bélgica) a 40 °C hasta obtener peso constante. El contenido lipídico resultante se determinó como g de lípidos por 100 g de célula liofilizada o seca. El rendimiento de lípidos se calculó en función de este contenido y su relación con la cantidad de azúcares totales consumidos por las levaduras (g de lípidos/g de azúcares consumidos).

3.6.5. *Determinación del perfil de ácidos grasos*

El perfil de ácidos grasos almacenados en forma de triacilglicéridos se determinó por cromatografía de gases siguiendo el método descrito por Van Wychen y col. (2016) (procedimiento del NREL/TP-5100-60958). El método consta de un proceso de transesterificación de los ácidos grasos presentes en las levaduras liofilizadas (5-10 mg) para determinar el contenido total de estos en forma de ésteres metílicos de ácidos grasos. Para ello, las células se trataron con soluciones HCl:metanol (HCl 0,6 M [2,1% v/v] en metanol) y cloroformo:metanol (2:1, v/v) para la lisis celular y la extracción de los lípidos, los cuales finalmente se extrajeron de la fase de metanol con hexano, dejando atrás compuestos polares como el glicerol formado tras la transesterificación. Para el análisis de los ácidos grasos obtenidos se empleó un cromatógrafo de gases 7890A de Agilent (California, EE. UU.), equipado con un detector de ionización de llama y un inyector con división (modo “*split*” 1/20), y una columna capilar de polisiloxano de Agilent DB-23 (longitud 30 m y 25 mm de diámetro interno). El inyector y el detector operaron a 250 °C y 280 °C, respectivamente. Se utilizó como patrón interno una solución de 10 mg/mL del éster metílico del ácido tridecanoico (C13:0ME) para cuantificar el contenido total de ésteres metílicos de ácidos grasos y para conocer el perfil lipídico se utilizó un patrón mezcla de calibración de ácidos grasos C8:0-C24:0.

3.6.6. *Tinción con rojo de Nilo*

Otro procedimiento de estudio de acumulación de lípidos para visualizar el almacenamiento en cuanto a localización celular y tiempo de cultivo fue el de la detección de fluorescencia por microscopía usando el tinte fluorescente Rojo de Nilo. El protocolo consistió en preparar una solución de Rojo de Nilo (Invitrogen™ Rojo Nilo N1142) de 60 µg/mL en acetona a partir de una solución madre de 2 mg/mL. Por otro lado, se preparó un tampón fosfato salino (PBS) 1x con Na₃PO₄ · 12 H₂O 23,2 mM, NaCl 137 mM y KCl 2,7 mM en agua destilada a pH 7,4 y esterilizado por filtración o

autoclave, el cual finalmente se utilizó en otra solución DMSO (dimetilsulfóxido):PBS (1:1). Para la tinción, se utilizaron 250 μ L de suspensión de células, 25 μ L de la solución DMSO:PBS (1:1) y 5 μ g/mL de la solución de Rojo Nilo en acetona. Las muestras se incubaron en oscuridad durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, las células teñidas se recogieron por centrifugación (500 *g*, 4 min) y se lavaron dos veces con PBS. Tras este paso, las células se resuspendieron en 100 μ L de formalina 10 % (v/v) y se incubaron en oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente. Las células fijadas y teñidas se centrifugaron durante 2 min a 500 *g*, se lavaron dos con PBS 1x y se resuspendieron en una gota (20 μ L) de SlowFade™ (Invitrogen S36917), para evitar el “fotoblanqueamiento” del Rojo de Nilo.

Las células (5-10 μ L) se visualizaron con un microscopio invertido de fluorescencia (Olympus CKX53 equipado con cámara digital Olympus DP32, Tokio, Japón) con excitación azul/verde usando como longitud de onda de excitación 488 nm y como longitud de onda de emisión 509 nm.

3.6.7. Determinación de carotenoides totales

La determinación de carotenoides totales se llevó a cabo adaptando el protocolo descrito por Moliné y col. (2012) sobre producción de los carotenoides torularodina, toruleno y β -caroteno en levaduras del género *Rhodotorula*. Entre 35-40 mg de células liofilizadas se resuspendieron en 1 mL de (DMSO)/BHT (butilhidroxitolueno; 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol) 0,05 % (p/v) y se incubaron en un baño de agua a 55 °C durante 1 h. Tras este periodo, la mezcla se centrifugó a 3000 *g* durante 5 min y se recolectó el sobrenadante. Se repitió la incorporación de 1 mL de DMSO a las células y, tras otra hora de incubación, se recolectó el sobrenadante de nuevo tras centrifugar la mezcla. A continuación, se añadió al sedimento celular 1 mL de acetona y se agitó vigorosamente durante 1 min. La mezcla se centrifugó a 3000 *g* durante 5 min y se juntó la fracción de acetona con el sobrenadante previamente recolectado con DMSO. Este paso se repitió hasta obtener un sedimento celular sin coloración aparente. Al sobrenadante obtenido se le añadieron 2 mL de hexano y 0,5 mL de una solución saturada de NaCl (20%) a 5 °C, se mezcló vigorosamente durante 15 s y se centrifugó a 3000 *g* durante 10 min a 5 °C. La fase orgánica obtenida conteniendo los pigmentos se recolectó en un nuevo tubo. Se incorporaron 5 mL de agua destilada a 5 °C y se mezcló en vórtex

Material y Métodos

durante 30 s. Se centrifugó nuevamente a 3000 *g* durante 10 min y se recolectó el sobrenadante. El hexano se evaporó bajo corriente de nitrógeno usando un evaporador TurboVap LV. Finalmente los pigmentos se resuspendieron en 1 mL de etanol/0,05% BHT para su cuantificación en un espectrofotómetro UV-Visible (Biochrom Anthos Zenyth 200). La absorbancia se midió a 450 nm y la concentración se calculó mediante una curva patrón de β -caroteno en etanol (rango 0,5-10 mg/mL).

3.6.8. Determinación del perfil de compuestos carotenoides

El perfil de compuestos carotenoides se determinó y cuantificó por HPLC (Agilent 1260 Infinity II - (Agilent Technologies California, EE. UU.) con un detector de matriz de fotodiodos utilizando un gradiente de dos soluciones (solución A, metanol:solución acuosa de ácido propanoico 0,001 M y tetrabutilamonio 0,001 M, 80:20; y solución B, acetona:metanol a una proporción 60:40) y una columna Infinity Lab Poroshell 120 EC-C18: 4 μ m, 250 x 4,6 mm. El gradiente se llevó a cabo de un 100 % de solución A a un 100 % de solución B durante 30 min, manteniendo un flujo constante de 0,8 mL/min. La elución se mantuvo con un 100% de Solución B durante 3 min más. El cambio de Solución B a Solución A entre muestras se llevó a cabo en 10 min de manera progresiva. Se utilizó una curva de calibración obtenida con β -caroteno en etanol para determinar la cantidad de cada carotenoide a partir del área del pico detectado a 450 nm. Se identificaron los carotenoides por tiempo de retención y absorbancia espectral.

3.6.9. Determinación del β -caroteno

La extracción de este pigmento en la levadura *Y. lipolytica* modificada genéticamente se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito a continuación. A partir de del cultivo de la levadura tras 72 h, se tomó 1 mL y se centrifugó a 3000 *g* durante 1 min. Tras descartar el sobrenadante el sedimento celular obtenido se trató con 500 mg de cuentas de vidrio de 0,5 mm con 1 mL de dodecano en un homogeneizador (Benchmark Scientific, NI, United States) usando 1 ciclo de 60 s a 6000 rpm. Los ciclos en el homogeneizador con la adición de dodecano fueron repetidos hasta obtener un sedimento celular sin color. La mezcla se centrifugó a 3000 *g* durante 2 min y los carotenoides totales en la fase de dodecano se cuantificaron por espectrofotometría a 453 nm. La

concentración total se estimó usando una curva patrón de β -caroteno puro con un rango lineal entre 1 y 6 mg/L de β -caroteno en dodecano.

3.6.10. Determinación de la violaceína

La extracción de este pigmento en la levadura *Y. lipolytica* modificada genéticamente se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito a continuación. A partir de del cultivo de la levadura tras 72 h, se tomó 1 mL y se centrifugó a 3000 *g* durante 3 min descartando el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 0,4 mL de agua destilada y 0,4 mL de metanol. A continuación, se llevó a un homogeneizador (Benchmark Scientific, NI, United States) con 500 mg de cuentas de vidrio de 0,5 mm y se operó a 8000 rpm realizando 3 ciclos de 1 min con 30 s de parada entre ciclos. Tras esto, se centrifugó a 3000 *g* durante 3 min recolectando el sobrenadante. Este proceso se repitió hasta obtener un sedimento incoloro. Tras la extracción completa del pigmento se midió la absorbancia a 577 nm en un espectrofotómetro usando una curva patrón con un rango lineal entre 1 y 10 mg/L de violaceína en metanol y agua destilada (1:1).

3.6.11. Determinación de la indigoidina (índigo)

La extracción de este pigmento en la levadura *Y. lipolytica* modificada genéticamente se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito a continuación. A partir de del cultivo de la levadura tras 72 h, se tomó 1 mL y se centrifugó a 3000 *g* durante 1 min. El sedimento celular se lavó con agua destilada. Se le añadieron 500 mg de cuentas de vidrio (425-600 μ m) junto con 1 mL de DMSO/2 % Tween 20 y todo se trató en un homogeneizador a 8000 rpm, durante 5 ciclos de 1 min con 15 s de pausa. Tras esto, el sobrenadante se recolectó y se repitieron los pasos en el homogeneizador con la adición al sedimento celular de DMSO más Tween 20 hasta obtener un sedimento incoloro. Tras la extracción completa se midió la absorbancia del sobrenadante a 612 nm y se cuantificó usando una curva patrón con un rango lineal entre 1 y 12,5 mg/L de indigoidina en DMSO.

3.6.12. Determinación de la actividad de la enzima manitol deshidrogenasa en *C. curvatus*

La determinación de la actividad enzimática de la enzima manitol deshidrogenasa (Mtdh) de la levadura *C. curvatus* se llevó a cabo a través del procedimiento que se describe a continuación. Se recolectaron células crecidas en un cultivo en biorreactor mediante centrifugación a 3000 *g* durante 5 min, cuando la concentración de manitol estaba por encima de 10 g/L. Las células se lavaron dos veces con tampón clorhidrato de trietanolamina 0,1 M (Tris-HCl) (pH 7,5) y se lisaron con 500 mg de cuentas de vidrio (425-600 μ m) en 0,5 mL de tampón de lisis (Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5), MgCl₂ 2 mM, ditiotreitól 1 mM y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM) en un homogeneizador (FastPrep-24, MP Biomedicals, France) aplicando 5 ciclos de 1 min a 8000 rpm y con descansos de 2 min en hielo. Tras esto, las células lisadas se descartaron por centrifugación a 16000 *g* a 4 °C durante 20 min. El sobrenadante conteniendo las proteínas se recolectó y almacenó a -20 °C para los ensayos de actividad enzimática. Previamente al ensayo de actividad, la concentración de proteína se cuantificó por espectrofotometría mediante el método del ácido bicinconínico (BCA Protein Assay Kit-Reducing Agent Compatible from Pierce® - Thermofisher, Massachusetts, EE. UU.).

La actividad de la Mtdh se determinó en dirección oxidativa y reductiva a 25 °C. La reacción de oxidación de NADH/NADPH a NAD⁺/NAPD⁺ y la de reducción de NAD⁺/NAPD⁺ a NADH/NADPH se analizaron en presencia de fructosa y manitol, respectivamente (Figura 3.9). La reacción de oxidación de NADPH se observó midiendo la absorbancia a 340 nm, usando Tris-HCl 50 mM (pH 8,5), NADPH 0,2 mM y 25 μ L del extracto de proteína (1,4 g/L de proteína total cuantificada). La reacción se desencadenó por la adición de fructosa con una concentración final de 200 mM. La reacción de reducción de NADP⁺ se llevó a cabo midiendo la absorbancia a 340 nm, usando Tris-HCl 50 mM (pH 10), NADP⁺ 1 mM y 25 μ L del extracto de proteína (1,4 g/L de proteína total cuantificada). La reacción se desencadenó por la adición de manitol con una concentración final de 50 mM.

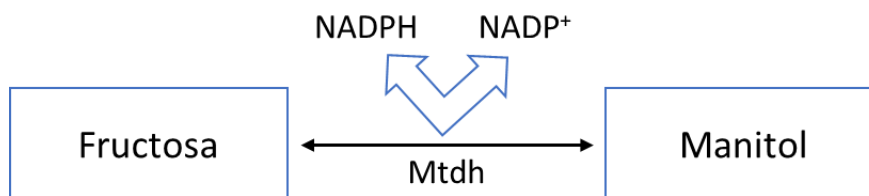


Figura 3.9. Determinación de la actividad de la enzima Mtdh bidireccionalmente, empleando como sustratos fructosa y NADPH (fructosa se reduce a manitol usando NADPH) o Manitol y NADP⁺ (manitol se oxida a fructosa interviniendo NADP⁺).

3.6.13. Cálculo del número de cetano (CetN)

En este estudio se ha calculado el número de cetano (CetN), una de las propiedades que presentan los combustibles, usada como indicador para conocer la calidad de ignición. De este modo, puede conocerse si el perfil de ácidos grasos acumulados por las levaduras oleaginosas y la concentración/proporción de estos aceites son adecuados para producir un biocombustible de calidad al destinarse los TAGs a la producción de biodiésel.

Para este cálculo se necesitan conocer los siguientes parámetros (Patel y col., 2017):

- **Valor de saponificación (VS):** cantidad de KOH en mg necesaria para saponificar un g de aceite en unas condiciones específicas y para medir el peso molecular o la longitud de la cadena de los ácidos grasos (mg KOH/g aceite).
- **Índice de yodo (IY):** cantidad de I₂ en mg que es consumida por 100 g de sustrato en una reacción química (mg I₂/100 g).
 - Porcentaje de cada componente de ácido graso (%AC)
 - Masa molecular de cada componente de ácido graso (M)
 - Número de dobles enlaces (DE)

Las fórmulas a seguir se recogen a continuación (Patel y col., 2017):

- **CetN** = $46,3 + 5458/VS - (0,255 \cdot IY)$
 - **VS** = $560 \cdot (\%AC)/M$
 - **IY** = $254 \cdot DE \cdot (\%AC)/M$

Material es y Métodos

Otra opción más simplificada, basada en un análisis de regresión usando ácidos grasos puros para establecer una relación entre el CetN y la composición de ácidos grasos, es la desarrollada por (Bamgboye y Hansen, 2008). Estos autores desarrollaron en su estudio una ecuación 1) que relaciona el CetN con el porcentaje de composición de ácidos grasos del biodiésel. La ecuación inicial es la siguiente:

$$1) \text{ CetN} = K + ax_1 + bx_2 + cx_3 + dx_4 + ex_5 + fx_6 + gx_7 + hx_8$$

Dónde: K, a, b, c, d, e, f, g, h son constantes que se determinaron en el análisis de regresión y $x_1 \dots x_8$ son los % de composición de ácidos grasos.

Una vez dado el valor a las constantes de la primera ecuación 1), usando los coeficientes obtenidos en la regresión lineal, consiguieron la ecuación definitiva 2) para poder calcular el CetN usando sólo los porcentajes de ácidos grasos obtenidos:

$$2) \text{ CetN} = 61,1 + 0,088x_2 + 0,133x_3 + 0,152x_4 - 0,101x_5 - 0,039x_6 - 0,243x_7 - 0,395x_8$$

Dónde: x_2 , x_3 y x_4 son ácidos grasos saturados (mirístico, palmítico y esteárico, respectivamente) y x_5 , x_6 , x_7 , y x_8 son ácidos grasos insaturados (palmitoleico, oleico, linoleico y linolénico, respectivamente). Observándose de la ecuación 2) que los coeficientes para ácidos grasos saturados son positivos y aumentan con el número de carbonos (aumento del CetN con aumento en la composición de ácidos grasos saturados). Sin embargo, los coeficientes para ácidos grasos insaturados son negativos, aumentando con el número de carbonos (disminución del CetN con el aumento en la composición de ácidos grasos insaturados).

Los diferentes valores de CetN alcanzados en esta tesis fueron calculados aplicando tanto las ecuaciones propuestas en el estudio de Patel y col. (2017) como las de Bamgboye y Hansen (2008), obteniéndose resultados equivalentes.

3.7. Análisis tecno-económico

El modelado de una planta de procesamiento a partir de datos experimentales se ha llevado a cabo con el software de simulación de procesos denominado ASPEN plus® (*Advanced System for Process ENgineering* en inglés), el cual simula procesos de industrias de químicos a granel, productos químicos de especialidad y farmacéutica. Esta herramienta permite la optimización de las cantidades de material procesado, la calidad

del producto y el uso de energía en operaciones por lote, continuas y combinadas (AspenTech, 2024).

Una parte de los datos experimentales resultantes de este estudio se utilizó como base para estudiar la viabilidad económica del sistema de producción de aceite microbiano en forma de TAGs empleando residuos como materias primas y levaduras oleaginosas para producir el compuesto de interés.

Este software se basa en la simulación de procesos mediante la utilización de diagramas de flujo que modelan cuantitativamente el comportamiento real de una planta de procesamiento químico, físico o físico-químico, desde la materia prima hasta la obtención del producto final, incluyendo etapas de pretratamiento y postratamiento, además del proceso central; contando con bancos de datos de componentes, biblioteca de modelos de funcionamiento de unidades, datos termodinámicos veraces y modelos de equipos y condiciones operativas usados en plantas industriales (Al-Malah, 2022).

Los pasos de los tratamientos o transformaciones dadas se visualizan en el diagrama de flujo como componentes que se transportan de una unidad (bloque) a otra mediante flujos de proceso. El proceso se describe utilizando relaciones de ingeniería básicas, resumidas en la Figura 3.10, de las cuales derivan las ecuaciones y variables con las que trabaja la herramienta informática (Al-Malah, 2022).

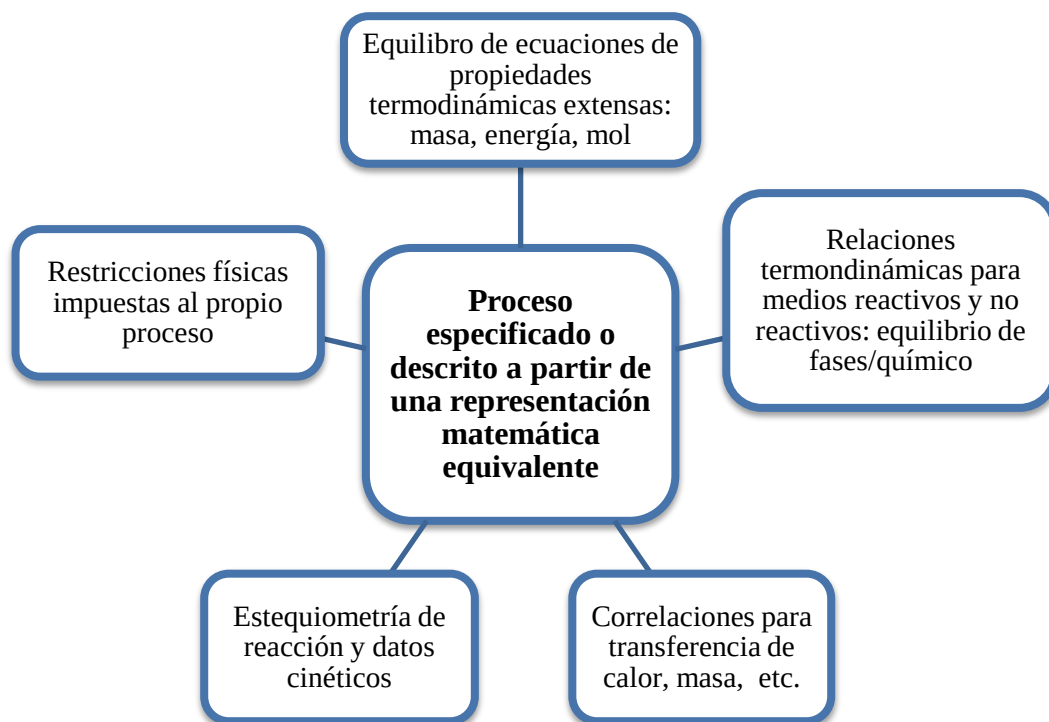
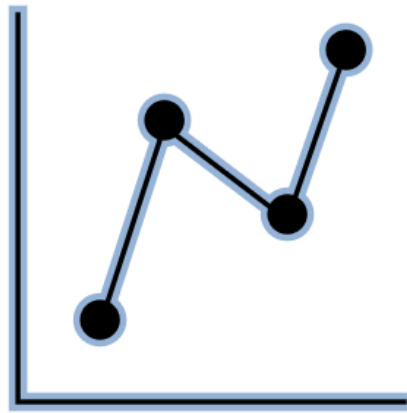


Figura 3.10. Relaciones, datos y aspectos a tener en cuenta en la representación del proceso en forma de ecuaciones matemáticas y variables para el modelado de una planta de procesamiento químico usando Aspen Plus®.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Selección de residuos agrícolas y urbanos

Con el objetivo de seleccionar una materia prima adecuada para el cultivo de levaduras que utilicen azúcares como moléculas plataforma en un proceso de obtención de aceite microbiano, se estudiaron diferentes residuos del sector agrícola y urbano en la Unidad de Biocarburantes Avanzados y Bioproductos del CIEMAT.

Por un lado, se estudiaron qué cultivos hortofrutícolas generaban mayor producción (toneladas) a nivel nacional y por lo tanto también mayor volumen de residuos. Igualmente, se analizó la composición de éstos para determinar cuáles eran los más adecuados para usar como materia prima rica en azúcares.

Se seleccionaron el tomate, el pimiento y la sandía ya que dentro del sector hortofrutícola de España son los cultivos que presentan una mayor producción, según datos proporcionados por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), el cual recoge cada año la producción de frutas y hortalizas en España en un “Resumen nacional de superficie, rendimientos y producción” recogido en la Tabla 4.1. En esta tabla, se puede observar que el tomate es el cultivo de fruto que más toneladas genera y el cultivo que más superficie ocupa en el país, seguido del pimiento y de la sandía.

En cuanto a la producción de residuos, Duque-Acevedo y col. (2020) estimaron que la producción de residuos por cultivo, utilizando el tomate como caso de estudio, asciende al 38 % de la producción anual considerando restos de planta y destríos. En España, con una producción media anual de tomate de 4,7 millones de toneladas, se generan, por tanto, en torno a 1,8 millones de toneladas al año de este cultivo, de los cuales, los destríos suponen 1,2 millones de toneladas (25 % de la producción). Los cultivos de pimiento y de sandía generan por su parte en torno a las 350.000 y 300.000 toneladas de destrío al año, respectivamente, según los promedios de producción de la Tabla 4.1.

Resultados y Discusión

Tabla 4.1. Superficie, rendimiento y producción de cultivos de tomate, pimiento y sandía en España (2018 – 2021).

Cultivos	Superficie (hectáreas)				Rendimiento (kg/ha)			Producción (toneladas)
	Secano	Regadío		Total	Secano	Regadío		
		Aire libre	Protegido			Aire libre	Protegido	
Tomate 2018	330	36.428	19.370	56.128	7.771	79.113	97.270	4.768.595
Tomate 2019	308	38.619	18.010	56.937	7.902	85.388	94.421	5.000.559
Tomate 2020	315	38.150	17.003	55.468	8.250	70.962	94.284	4.312.895
Tomate 2021	318	39.462	16.326	56.106	7.819	82.324	92.075	4.754.380
Media producción								4.709.107
Pimiento 2018	147	6.792	13.460	20.399	6.603	36.379	76.053	1.271.721
Pimiento 2019	157	6.586	14.486	21.229	6.342	39.539	78.539	1.399.192
Pimiento 2020	143	6.162	15.282	21.587	6.505	36.687	81.295	1.469.969
Pimiento 2021	128	5.902	16.040	22.070	7.060	36.095	80.689	1.508.168
Media producción								1.412.263
Sandía 2018	301	11.726	8.374	20.401	11.940	56.436	50.997	1.092.401
Sandía 2019	414	12.169	8.876	21.459	8.140	57.665	55.768	1.200.093
Sandía 2020	351	12.214	9.052	21.617	7.959	58.477	57.205	1.234.850
Sandía 2021	403	12.793	10.790	23.986	9.492	59.559	57.136	1.382.278
Media producción								1.227.406

(Fuente: MAPA (2024). Superficies de cultivos y producciones - Hortalizas: Resumen nacional de superficie, rendimientos y producción, 2018-2021).

Además de los residuos hortofrutícolas, en la presente Tesis también se tuvo en cuenta la utilización de residuos urbanos para su valorización en el marco de producción de aceite microbiano. A este respecto, se seleccionaron residuos de biomasa lignocelulósica procedente de la poda urbana y residuos de papel no reciclado derivado de los residuos sólidos urbanos (RSU). Estos residuos se seleccionaron atendiendo a diferentes criterios, incluyendo la composición, la localización, la disponibilidad, el impacto positivo de la valorización del residuo sobre diferentes sectores y el volumen generado, entre otros aspectos. Según el Instituto Nacional de Estadística, en el año 2021 se generaron en España en torno a 1.490.000 toneladas de residuos de papel y cartón y

más de 1.500.000 toneladas de residuos vegetales, teniéndose en cuenta también los residuos de madera (INE, 2024).

4.2. Composición de la materia prima. Residuos agrícolas y urbanos

Los resultados de la caracterización de las materias primas derivadas de residuos estudiadas en este trabajo se recogen en la Tabla 4.2. Se ha analizado la composición de los destríos de tomate, pimiento, sandía y mezclas de estos (tomate, berenjena y pepino), junto con los residuos lignocelulósicos municipales (RLM) y residuos celulósicos de rechazo (RCR), siguiendo los procedimientos indicados en la Sección 3.3 de Materiales y Métodos. Se determinaron extractivos, sólidos ácido insoluble, cenizas totales, monosacáridos, disacáridos, polisacáridos (glucano, hemicelulosa), entre otros componentes.

Tabla 4.2. Composición de los residuos usados como materias primas

Componente (g/100 g materia seca)	Residuos agrícolas (Destríos)				Residuos urbanos	
	Tomate	Pimiento	Sandía	Mezcla	RLM	RCR
Extractivos Totales	69,2	61,4	67,6	72,8	7,4	<0,01
Extractivos orgánicos	3,3±1,0	3,6±0,1	0,8±0,6	1,7±0,0	1,9±0,1	<0,01
Extractivos acuosos	65,9±4,5	57,8±1,2	66,8±4,3	71,1±2,1	5,5±0,4	<0,01
Glucosa	17,6±3,0	18,1±0,5	13,9±0,4	17,3±1,8	0,8±0,1	<0,01
Fructosa	23,7±2,0	28,5±0,0	29,1±0,8	15,3±2,2	<0,01	<0,01
Sacarosa	0,3±0,0	2,2±0,1	18,0±1,0	<0,01	<0,01	<0,01
Galactosa	0,3±0,1	0,6±0,0	0,3±0,0	1,3±0,1	<0,01	<0,01
Xilosa	0,3±0,0	0,4±0,1	0,3±0,0	0,3±0,1	<0,01	<0,01
Arabinosa	0,1±0,1	0,2±0,0	0,3±0,0	0,5±0,0	<0,01	<0,01
Manosa	0,5±0,1	0,7±0,0	0,2±0,0	0,3±0,0	<0,01	<0,01
Glucano	8,0±0,1	5,6±0,12	10,1±0,0	7,9±0,8	34,7±1,3	53,1±0,8
Hemicelulosa*	4,6±0,0	5,3±0,1	6,0±0,2	4,2±0,3	18,7±0,3	13,6±0,1
Sólido ácido insoluble	9,3±0,8	17,1±0,5	5,2±0,9	3,5±0,4	26,4±0,0	12,6±0,6
Cenizas Totales	6,9±0,1	5,5±0,1	5,5±0,4	9,2±0,0	1,5±0,0	9,8±0,0
Grupos acetilos	<0,01	<0,01	<0,01	0,3±0,0	4,1±0,1	0,4±0,0

*Xilano + Galactano + Arabinano + Manano

Resultados y Discusión

De acuerdo con el análisis de composición de la materia prima, los destríos presentaron un alto porcentaje de extractivos acuosos, aproximadamente entre 58 y 71 % (dependiendo del residuo), de los cuales una gran parte son azúcares altamente aprovechables por microorganismos como glucosa y fructosa. El destrío de pimienta presentó como azúcares mayoritarios la glucosa, fructosa y sacarosa con un contenido de 18,1, 28,5 y 2,2 g de azúcar sobre 100 g de biomasa seca, respectivamente. El destrío de sandía presentó un contenido mayor de azúcares con un total de 13,9, 29,1 y 18,0 g de glucosa, fructosa y sacarosa, respectivamente, sobre 100 g de biomasa seca. El destrío de tomate y la mezcla de destríos presentaron un contenido más bajo de azúcares en relación con su peso seco. No obstante, los extractos en fase acuosa mostraron una concentración de azúcares apropiados para el uso de estos residuos como medios de cultivo.

Los datos de extractivos reflejaron que los destríos presentan un contenido de azúcares fácilmente extraíbles en fase acuosa, resultando en una fracción líquida rica en estos componentes. Este resultado pone de relieve la necesidad de utilizar tratamientos menos exigentes para obtener las fracciones líquidas ricas en los azúcares fermentables de los residuos hortofrutícolas, en comparación con los materiales lignocelulósicos.

Los RLM y RCR apenas presentaron azúcares en el extracto acuoso comparado con los destríos, ya que los azúcares se encuentran presentes en los carbohidratos estructurales, siendo el glucano (celulosa) el componente mayoritario con un 34,7 y 53,1 %, respectivamente. Con el objetivo de aprovechar la fracción de celulosa de estos residuos urbanos, se llevó a cabo un pretratamiento de los RLM y RCR para facilitar el acceso de las enzimas hidrolíticas a los carbohidratos durante la etapa de hidrólisis enzimática (HE). Tras el pretratamiento, el residuo sólido insoluble (RSI) se sometió a HE según se describe en la sección 3.2.3 de Materiales y Métodos. Los hidrolizados resultantes se filtraron para obtener, finalmente, una fracción líquida rica en azúcares monoméricos que pueden ser asimilados por las levaduras.

En el siguiente apartado se muestra la composición de todos los medios de cultivo estudiados en la presente Tesis.

4.2.1. Composición de los medios de cultivo derivados de los residuos

El primer paso que desarrollar para llevar a cabo las actividades planteadas en este estudio fue el de tratar la materia prima seleccionada para la obtención de medios de cultivo adecuados para levaduras oleaginosas. En primer lugar, se procedió al análisis de la composición de las fracciones líquidas tras obtenerlas siguiendo los procedimientos descritos en los apartados pertinentes de la sección de Materiales y Métodos. Las diferentes fracciones utilizadas para este trabajo se describen a continuación:

- Fracciones líquidas (FL) del destrío de tomate, pimiento, sandía o mezclas de destríos (tomate, berenjena y pepino) obtenidas mediante la tritución de los residuos y posterior centrifugación para separar el sólido del líquido.
- Hidrolizado enzimático del residuo de poda urbana pretratado (HPO) obtenido tras pretratar por EV (Explosión con Vapor) el RLM y someter la fracción sólida a HE para finalmente obtener una FL rica en azúcares monoméricos.
- Hidrolizado enzimático del residuo del papel no reciclado pretratado (HPA) obtenido tras pretratarse este material y someter a la fracción sólida a HE para finalmente obtener una FL rica en azúcares monoméricos.

En la Tabla 4.3 se muestran la composición y concentración de azúcares de cada medio, la concentración de ácido cítrico y acético, el nitrógeno total *Kjeldahl* y la relación carbono/nitrógeno (C/N).

Resultados y Discusión

Tabla 4.3. Composición de las fracciones líquidas de los destríos, medios HPO y HPA y relación carbono/nitrógeno

Componentes	Fracción líquida destríos				Hidrolizados enzimáticos	
	Tomate	Pimiento	Sandía	Mezclas	HPO	HPA
Glucosa (g/L)	11,8±0,9	24,3±2,8	14,5±1,4	16,0±0,5	78,6±10,7	62,5±0,3
Fructosa (g/L)	14,9±1,3	31,7±4,5	29,3±1,6	14,2±0,2	<0,01	<0,01
Sacarosa (g/L)	<0,01	0,5±0,2	24,3±6,6	<0,01	<0,01	<0,01
Xilosa (g/L)	0,1±0,0	0,3±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	1,5±0,3	11,9±0,1
Galactosa (g/L)	0,1±0,0	0,4±0,1	0,1±0,0	0,2±0,0	<0,01	<0,01
Arabinosa (g/L)	<0,01	<0,01	<0,01	1,4±0,1	<0,01	<0,01
Manosa (g/L)	0,1±0,0	0,4±0,2	0,1±0,0	0,1±0,0	<0,01	<0,01
Ácido cítrico (g/L)	1,7±0,5	4,5±1,1	<0,01	1,8±0,2	11,5±0,0	<0,01
Ácido acético (g/L)	0,01±0,0	0,02±0,0	<0,01	0,7±0,0	0,19±0,0	10,6±0,0
Nitrógeno total (g/L)	0,7±0,0	1,7±0,1	1,5±0,2	0,9±0,1	0,6±0,1	0,2±0,0
Relación C/N	13-15	14-17	16-25	14-15	40-55	135

El cálculo de las relaciones C/N se realizó en base al aporte de carbono de los azúcares mayoritarios y al nitrógeno total determinado por el método *Kjeldahl*.

El medio HPA fue el que presentó la relación C/N mayor, sobrepasando la relación C/N de 100, debido a la alta concentración de azúcares, 74,4 g/L de media (entre glucosa y xilosa) y la baja concentración de nitrógeno en la FL, 0,2 g/L.

Continuando con el análisis de la Tabla 4.3, hay que puntualizar que la concentración de ácido cítrico y ácido acético en los medios de HPO y HPA procede en su mayoría del correspondiente tampón añadido en la HE del RSI de los RLM y RCR, respectivamente (el tampón se utiliza para controlar el pH durante los procesos de HE a escala laboratorio). El carbono aportado por estos ácidos no se tuvo en cuenta en el cálculo de la relación C/N ni en los rendimientos finales de los ensayos llevados a cabo con los medios derivados de residuos, ya que sólo se consideró el carbono aportado por los azúcares que se han tomado como moléculas plataformas del proceso de estudio.

En las diferentes FL estudiadas como medios de cultivo también se determinaron otros ácidos (2-furoico, ferúlico, 4-hidroxibenzoico, etc.), además de fenoles y compuestos de degradación como furfural, hidroximetilfurfural, siringaldehído, vainillina, etc. No obstante, las concentraciones observadas para estos compuestos fueron en todos los casos inferiores a 0,01 g/L. A estas concentraciones, el potencial inhibitorio de los medios es muy bajo para la mayoría de los microorganismos oleaginosos. Además, en la literatura queda reflejado que levaduras oleaginosas como por ejemplo *Yarrowia lipolytica* DSM 3286, *Rhodosporidium toruloides* CGMCC, *Cryptococcus curvatus* UCDFST 76-559, *Wickerhamomyces ciferrii* UCDFST 04-836 y *Trichosporon cutaneum* ACCC 20271, entre otras, crecen y acumulan triacilglicéridos (TAGs) en medios que presentan concentraciones superiores a 0,01 g/L de estos compuestos de degradación (Sitepu y col., 2014b; Hu y col., 2018; Zhang y Bao, 2022). En este sentido, no se consideró realizar el seguimiento del efecto de estos compuestos sobre crecimiento/acumulación en esta Tesis.

4.3. Cultivos de levaduras oleaginosas en medio sintético

El cultivo de levaduras oleaginosas se evaluó en primera instancia utilizando medio mínimo definido. Este estudio se realizó en biorreactores utilizando el medio denominado MLO (Medio de Levaduras Oleaginosas) e inóculos crecidos previamente en medio YPD. Se realizó una primera selección de las cepas disponibles en el laboratorio. Las cepas estudiadas fueron *Cryptococcus curvatus* CL6032, *Yarrowia lipolytica* CECT1240, *Lipomyces lipofer* NRRL-Y-11555 y *Rhodosporidium toruloides* C4.

La Figura 4.1 muestra el consumo de glucosa (A), y crecimiento celular (B), de las diferentes levaduras oleaginosas estudiadas tras el cultivo en dicho medio sintético. El límite de ensayo se fijó en 7 días para todas las levaduras de estudio.

Resultados y Discusión

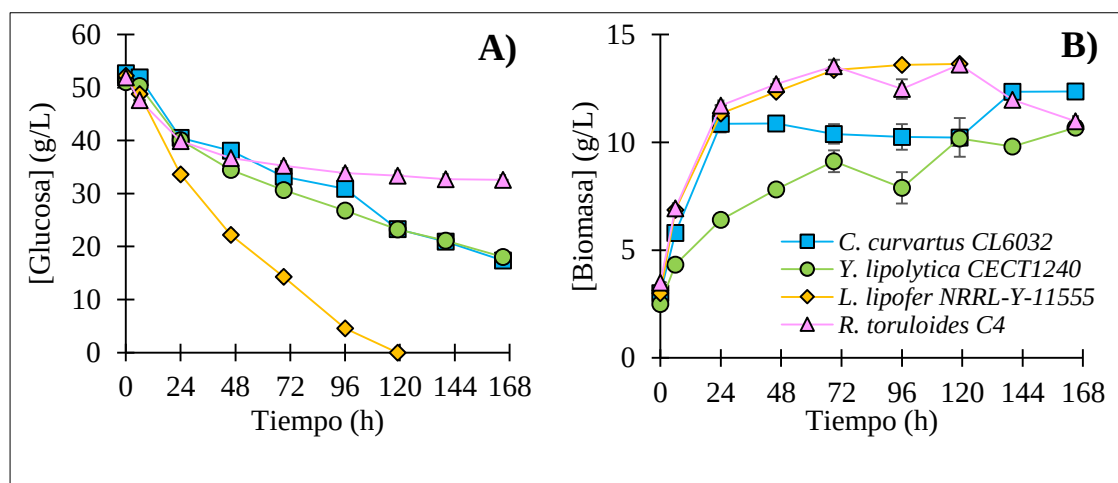


Figura 4.1. A) Consumo de glucosa y B) concentración de biomasa celular (peso seco) de las diferentes levaduras oleaginosas estudiadas en los ensayos en MLO a 28 °C, pH 6 y 1 vvm durante 1 semana.

La levadura *L. lipofer* NRRL-Y-11555 consumió la glucosa por completo en menos de 120 h de cultivo. Sin embargo, su crecimiento fue similar al de *R. toruloides* C4, la cual ralentizó el consumo de glucosa a partir de las 96 h, consumiendo menos de 20 g/L al finalizar el ensayo. Ambas cepas alcanzaron aproximadamente un máximo de 14 g/L de biomasa celular. La cepa *R. toruloides* C4 de la colección del ICIDCA, se trata de una cepa evolucionada para consumir glicerol crudo como fuente de carbono (Faife-Perez y col., 2017). Por tanto, su metabolismo ha sido adaptado a este sustrato y las fuentes de carbono azucaradas, como la glucosa, quizás no sean tan apropiadas para su crecimiento/acumulación lipídica. Esto explicaría que tras 168 h de cultivo sólo consumiese en torno a un 35 % de la glucosa total y presentara un bajo porcentaje de lípidos almacenados, como se muestra en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Porcentajes de lípidos totales y ácidos grasos derivados de TAGs acumulados en las levaduras mencionadas (%) = (g lípido/100 g biomasa celular seca)

Cepas levaduras	Lípidos totales (%) (p/p)	Ácidos grasos (%) (p/p)
<i>C. curvatus</i> CL6032	45,9±0,8	35,0±2,6
<i>Y. lipolytica</i> CECT1240	31,3±0,7	28,8±0,3
<i>L. lipofer</i> NRRL-Y-11555	32,6±0,4	30,1±0,6
<i>R. toruloides</i> C4	25,0±0,4	21,0±1,0

C. curvatus CL6032 y *Y. lipolytica* CECT1240 tuvieron un comportamiento similar respecto al consumo de glucosa, llegando a consumir el 64 % de la concentración

inicial tras 168 h. Sin embargo, *C. curvatus* alcanzó una mayor concentración de biomasa final en comparación con *Y. lipolytica* (12,4 g/L vs. 11,0 g/L) y logró una mayor acumulación lipídica. Este resultado se debe a las menores tasas de crecimiento de *Y. lipolytica* CECT1240 respecto al resto de levaduras en las condiciones estudiadas.

Según la literatura, la especie *Y. lipolytica* es capaz de acumular altos porcentajes de lípidos intracelulares mientras crece en sustratos hidrofóbicos tales como ácidos grasos o alcanos como única fuente de carbono (Mlíčková y col., 2004). El uso de sustratos que contienen ácidos grasos volátiles (AGVs), en contraste con medios azucarados, podría favorecer el metabolismo lipídico en *Y. lipolytica* (Papanikolaou y col., 2007). Por otro lado, en medios con glicerol y glucosa como fuentes de carbono, *Y. lipolytica* ha mostrado mayores tasas de asimilación de glicerol en comparación con la glucosa, produciendo a su vez una mayor concentración de metabolitos secundarios como el ácido cítrico (Papanikolaou y col., 2002). En este estudio se ha perseguido la acumulación de lípidos a partir de fuentes de carbono azucaradas, por lo que no se ha profundizado en la acumulación de aceite microbiano con materiales hidrofóbicos.

Los mejores resultados en términos de acumulación de lípidos (Tabla 4.4.) se obtuvieron con la levadura *C. curvatus* CL6032, alcanzando aproximadamente 46 g de lípidos totales por 100 g de células secas, de los cuales 35 g se acumularon en forma de TAGs. La levadura que le siguió respecto a mejor resultado de acumulación fue *L. lipofer* NRRL-Y-11555, logrando más de 32 g de lípidos totales por 100 g de células secas, de los cuales 30 g se correspondieron con ácidos grasos derivados de TAGs. Las levaduras *Y. lipolytica* CECT1240 y *R. toruloides* C4 presentaron acumulaciones menores siendo esta última cepa la de porcentajes más bajos (31 y 25 %, respectivamente).

La literatura recoge que estas especies son capaces de acumular en torno al 40-70 % de lípidos respecto a su peso seco celular (Caporusso y col., 2021), siendo los géneros *Rhodosporidium*, *Lipomyces* y *Cryptococcus* los de mayor capacidad de acumulación (60-70 %) (Meng y col., 2009), seguidos del género *Yarrowia* que llega a alcanzar en torno al 40-47 % de lípidos acumulados (Papanikolaou y Aggelis, 2002; Bellou y col., 2016; Carsanba y col., 2020).

Hay que destacar que salvo en el cultivo con *L. lipofer*, el consumo de glucosa no fue completo. Esto podría ser indicativo de las condiciones limitantes en nutrientes del

Resultados y Discusión

medio MLO. Además, en el caso de las cepas *Y. lipolytica* CECT1240 y *R. toruloides* C4, es posible que la fuente de carbono no sea la adecuada y se puedan obtener mejores resultados utilizando otros sustratos como los AGVs o glicerol.

El perfil de ácidos grasos que conforman los TAGs se representa en la Figura 4.2, donde puede apreciarse la acumulación mayoritaria de ácido oleico (C18:1) en todas las especies estudiadas en esta primera fase, constituyendo más del 50 % del perfil de ácidos grasos acumulados.

Sin embargo, se observaron diferencias en los perfiles de acumulación respecto al ácido palmitoleico (C16:1). Este ácido graso se determinó sobre el total en un 14 y 16 % en el perfil de *Y. lipolytica* y *L. lipofer*, respectivamente, pero apenas se cuantificó en las otras dos especies estudiadas. En cambio, *C. curvatus* y *R. toruloides* presentaron mayor acumulación del ácido linoleico (C18:2) que las levaduras mencionadas anteriormente. Los ácidos grasos minoritarios cuantificados en las levaduras estudiadas fueron el ácido linolénico (C18:3) y el ácido lignocérico (C24:0), seguidos del ácido behénico (C22:0) detectado sólo en *R. toruloides* que fue la levadura que presentó el perfil más variado, produciendo todos los ácidos grasos recopilados en la Figura 4.2, al igual que se recoge en la literatura con otras cepas de esta especie como *R. toruloides* AS 2.1389 y *R. toruloides* DEBB 5533 (Patel y col., 2017).

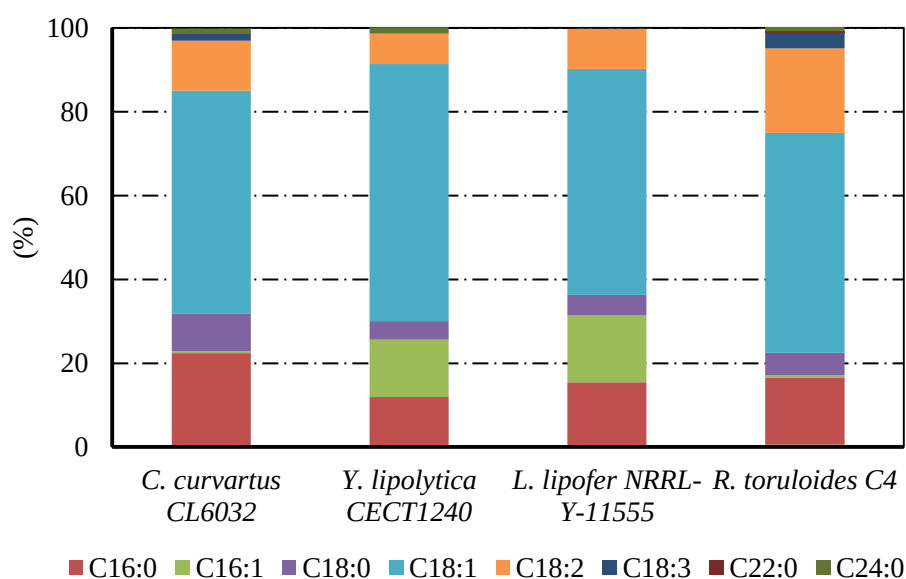


Figura 4.2. Perfil de ácidos grasos determinado en las diferentes levaduras estudiadas en MLO.

4.4. Cultivos en medios derivados de destríos bajo diferentes relaciones C/N

Tras los resultados obtenidos de los cultivos realizados en MLO, se seleccionó la especie *C. curvatus* CL6032 para su cultivo en medios derivados de destríos y establecer las condiciones óptimas de aprovechamiento de los carbohidratos presentes en esta materia prima residual y las condiciones de operación óptimas para la producción de aceite microbiano en forma de TAGs. Además, en paralelo se llevó a cabo el cultivo en estos medios de la cepa *C. curvatus* NRRL-Y-1511 a efectos comparativos.

4.4.1. Estrategia de cultivo fed-batch en medio derivado de destrío de tomate, pimienta y sandía a C/N 15, 30 y 50

El cultivo de levaduras en las fracciones líquidas derivadas del tomate, pimienta y sandía de destrío se evaluó siguiendo una estrategia *fed-batch* con la incorporación de pulsos de glucosa. Mediante el uso de diferentes medios de cultivo se buscó evaluar el impacto que tiene utilizar diferentes materias primas en el marco de una posible futura biorrefinería, donde las materias primas variarán según disponibilidad, temporalidad y composición.

Las relaciones C/N iniciales de los medios de cultivo fueron de 15. También se ensayaron relaciones C/N iniciales de 30 y 50 para estudiar el efecto de partir de cultivos con relaciones C/N más altas. Tras los pulsos de la estrategia *fed-batch* aplicada, las relaciones C/N de los medios se incrementaron como se indica a continuación: 1) en los cultivos de C/N 15, se incrementó a C/N 80 y 97 con un primer y segundo pulso, respectivamente; 2) en los cultivos de C/N 30, se incrementó a C/N 110 con un pulso de glucosa; y 3) en los cultivos de C/N 50, se incrementó a C/N 160 con un pulso de glucosa.

i) Cultivos en medio derivados de destríos de tomate

Las cepas *C. curvatus* CL6032 y *C. curvatus* NRRL-Y-1511 se cultivaron en medio derivado de tomate de destrío con una relación C/N inicial de 15 e incorporando dos pulsos de glucosa a lo largo del estudio. La estrategia de cultivo seleccionada fue la estrategia *fed-batch* (Karamerou y Webb, 2019); empleando medio derivado de tomate de destrío sin suplementar con otra fuente de nutrientes para crecer las levaduras y dos pulsos de glucosa para desencadenar la acumulación lipídica (aumentando relación C/N).

Resultados y Discusión

En las Figuras 4.3 y 4.4 se recogen los consumos de azúcares del medio por las dos cepas, la producción de manitol y el crecimiento celular de ambas.

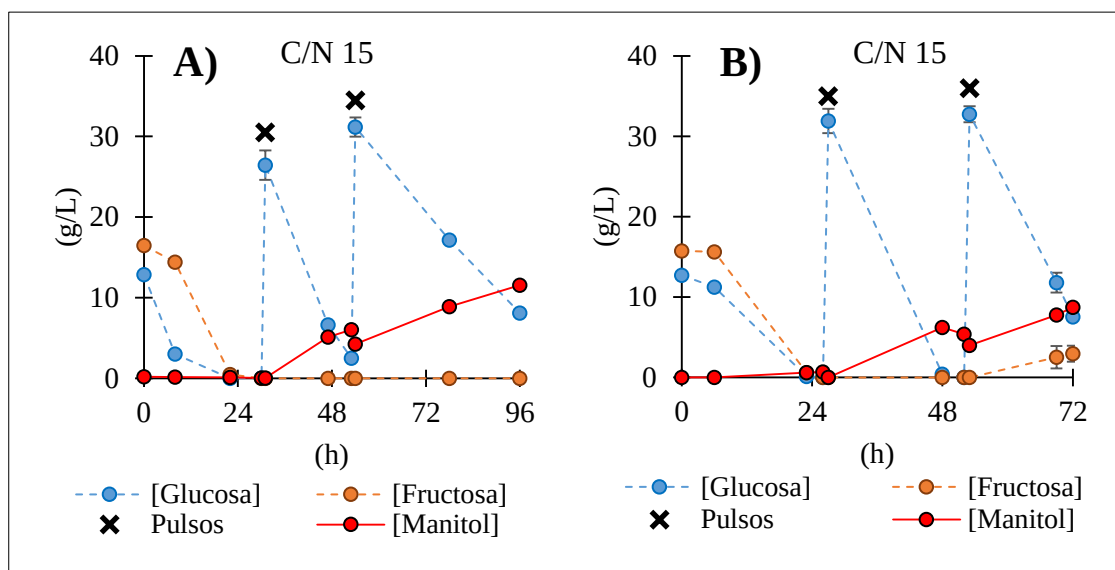


Figura 4.3. Consumo de azúcares y producción de manitol por A) *C. curvatus* CL6032 y B) *C. curvatus* NRRL-Y-1511. Los pulsos de glucosa se representan en las gráficas por "x".

Ambas cepas consumieron la glucosa y fructosa del medio derivado del tomate en las primeras 24 h. Por lo tanto, el medio procedente de tomate de destrío se puede considerar como un medio adecuado para favorecer el crecimiento celular de levaduras oleaginosas. En estos cultivos, también se detectó la presencia de manitol en los medios, cuya concentración aumentó a lo largo del tiempo cuando la fuente de carbono principal estaba presente. Hay que destacar que en el cultivo de *C. curvatus* NRRL-Y-1511 se detectó un pequeño incremento en la concentración de fructosa del medio, hecho que se tratará en el apartado de producción de manitol en mayor profundidad (apartado 4.4.4).

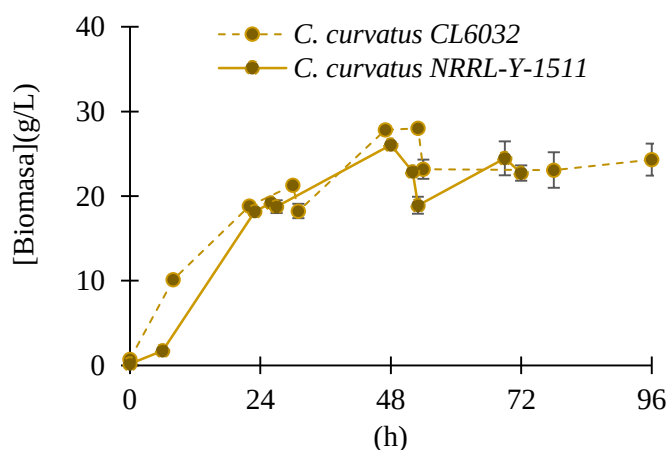


Figura 4.4. Concentración de biomasa celular seca a lo largo del ensayo para ambas cepas.

Tras la adición del segundo pulso, *C. curvatus* CL6032 presentó un consumo más lento de glucosa en comparación con la cepa NRRL-Y-1511. Sin embargo, la cepa CL6032 alcanzó una mayor concentración de biomasa celular al final del cultivo y una mayor acumulación de manitol (11 g/L).

Los ensayos se detuvieron cuando se observó una concentración de glucosa inferior a 10 g/L para ambas cepas, evitando así el consumo de los lípidos de reserva (Papanikolaou y Aggelis, 2011a). Respecto a la acumulación lipídica, en la Tabla 4.5 se recogen los porcentajes finales de lípidos totales y de ácidos grasos acumulados en el medio derivado de tomate siguiendo la estrategia *fed-batch*.

Tabla 4.5. Porcentajes de lípidos totales y ácidos grasos derivados de TAGs acumulados en las levaduras cultivadas en medio derivado de tomate (C/N 15) siguiendo una estrategia *fed-batch*.

Cepas levaduras	Lípidos totales (%) (p/p)	Ácidos grasos (%) (p/p)
<i>C. curvatus</i> CL6032	29,2±1,3	24,3±0,8
<i>C. curvatus</i> NRRL-Y-1511	22,8±0,4	18,4±0,3

C. curvatus CL6032 alcanzó una mayor acumulación que *C. curvatus* NRRL-Y-1511, aproximadamente 29 g de lípidos totales por 100 g de células secas frente a 23 g por 100 g de células secas, de los cuales 24 % son ácidos grasos frente a 18 %, respectivamente. A pesar de estas diferencias respecto al almacenamiento de aceite microbiano, la acumulación de lípidos alcanzada en este estudio fue superior a la reportada por Carota y col. (2020) para la cepa *C. curvatus* NRRL-Y-1511. Estos autores reportaron un contenido final del 15 % de lípidos cuando cultivaron a *C. curvatus* NRRL-Y-1511 en medio derivado de extracto de piel de naranja (relación C/N 33) suplementado con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y siguiendo una estrategia *batch*.

El perfil de ácidos grasos también reflejó diferencias entre ambas cepas. Tal y como se recoge en la Figura 4.5, las dos cepas presentaron una acumulación mayoritaria de ácido oleico (C18:1). Sin embargo, la cepa *C. curvatus* CL6032 fue la única en la que se detectó acumulación de ácido linolénico (C18:3), mientras que en la cepa *C. curvatus* NRRL-Y-1511 se observó la producción de ácido lignocérico (C24:0), ambos ácidos grasos con un porcentaje minoritario respecto al resto.

Resultados y Discusión

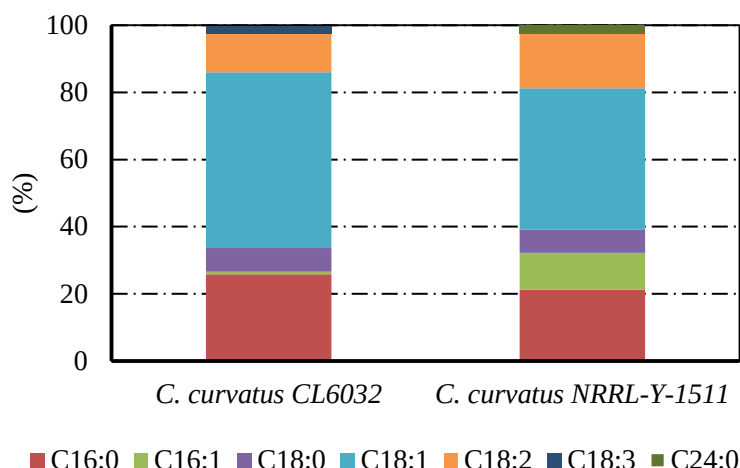


Figura 4.5. Perfil de ácidos grasos determinado en las dos cepas de *C. curvatus* estudiadas.

Tras el análisis de los resultados se concluyó que la cepa *C. curvatus* CL6032 era la más indicada para continuar con los ensayos en diferentes medios derivados de residuos y estudiando diferentes relaciones C/N. Esta cepa fue la que alcanzó el contenido lipídico más elevado de las dos cepas estudiadas y la que sobrepasó el 20 % de acumulación de aceite microbiano en forma de ácidos grasos.

En comparación con el medio MLO, el cultivo de *C. curvatus* CL6032 en medio derivado de tomate con una C/N inicial de 15 disminuyó el contenido intracelular de lípidos en esta cepa desde el 46 % al 30 % (p/p). Esto puede deberse a las diferencias en cuanto a la relación C/N, ya que este parámetro tiene una influencia significativa sobre la acumulación de lípidos intracelulares (Thevenieau y Nicaud, 2013).

Para favorecer la acumulación lipídica, la fracción líquida del tomate se mezcló con una solución rica en azúcar para aumentar la relación C/N inicial de 15 a 30 y 50. Las fracciones líquidas del destrío de tomate se utilizaron mezcladas en proporción 1:1 (C/N inicial de 30) y 1:2 (C/N inicial de 50) con una solución azucarada que contenía fructosa y glucosa manteniendo las mismas concentraciones que en la fracción líquida de la materia prima inicial. Con estas mezclas, elementos como el nitrógeno se diluyeron aumentando la relación C/N. Además, también se diluyeron otros elementos o nutrientes esenciales, con lo cual se favoreció el metabolismo de ácidos grasos para obtener reservas lipídicas en condiciones de limitación de nutrientes (Qin y col., 2017).

Los cultivos en estos medios siguiendo la estrategia *fed-batch* con un solo pulso de glucosa, con la cepa *C. curvatus* CL6032, se reflejan en las Figuras 4.6 y 4.7, recogiendo los consumos de azúcares, la producción de manitol y la biomasa celular generada.

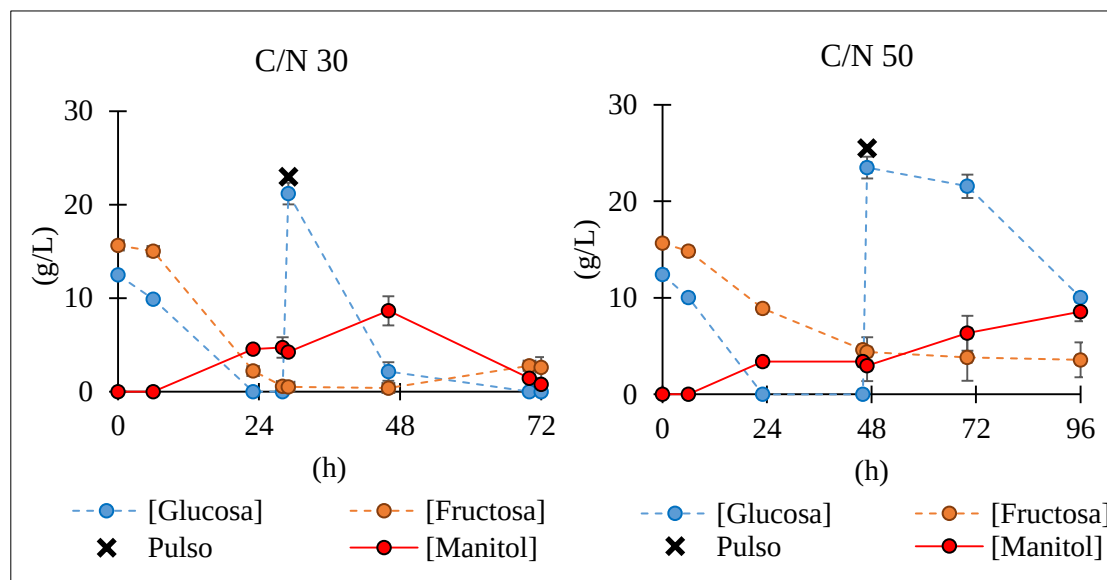


Figura 4.6. Consumo de azúcares y producción de manitol por *C. curvatus* CL6032 en medio derivado de destrío de tomate a C/N 30 y 50. Los pulsos de glucosa se representan en las gráficas por “x”.

En estos cultivos se observó un consumo secuencial de las fuentes de carbono, determinándose la preferencia de *C. curvatus* CL6032 por la glucosa. En el medio con relación C/N inicial de 15, más del 76 % de la glucosa inicial se consumió dentro de las primeras 8 h, mientras que el 86 % de la fructosa inicial todavía estaba presente en este punto (Figura 4.3). En presencia de glucosa, no se observó un consumo significativo de la fructosa como se refleja en la Figura 4.6 de la relación C/N 50, donde, tras el pulso de glucosa, en el medio de tomate aún quedaba fructosa (aproximadamente 4 g/L), concentración que permaneció constante durante el resto del ensayo.

La utilización preferencial de la glucosa frente a la fructosa también ha sido observada en varios estudios con diferentes especies de levaduras, como con *R. toruloides* (Martins y col., 2018), *Rhodotorula glutinis* e incluso en otras cepas de *C. curvatus* (Hassan y col., 1994; Gonzalez-Garcia y col., 2013). El aumento en la relación de C/N 15 a 30 y 50 también influyó en las tasas de consumo de azúcares (Figura 4.6). A las 24 h de cultivo, el consumo de fructosa se redujo del 85 % al 40 % tras aumentar la relación C/N inicial de 30 a 50, respectivamente.

Resultados y Discusión

Otro aspecto destacable observado durante estos ensayos es el aumento en la concentración de fructosa (medio con relación C/N 30), ya observado en ensayos anteriores con la cepa *C. curvatus* NRRL-Y-1511 con el medio derivado de tomate de destrío, y que se discutirá más adelante (apartado 4.4.4).

La Figura 4.7 muestra la evolución del crecimiento celular durante estos ensayos. Como se puede observar, al igual que ocurre con la tasa de consumo de azúcares (Figura 4.6), las tasas de crecimiento fueron inversamente proporcional a la relación C/N inicial. Al final del ensayo con una relación C/N 15 se obtuvo una biomasa celular en torno a 25 g/L (Figura 4.4 – cepa *C. curvatus* CL6032), mientras que con una relación C/N 30 y C/N 50 este parámetro disminuyó a 17 g/L y 14 g/L, respectivamente. Cabe destacar que tras el primer pulso en el ensayo con relación C/N 15 fue donde se registró la mayor concentración de células (28 g/L), la cual disminuyó con el segundo pulso y al final del ensayo, debido a las condiciones limitantes del cultivo.

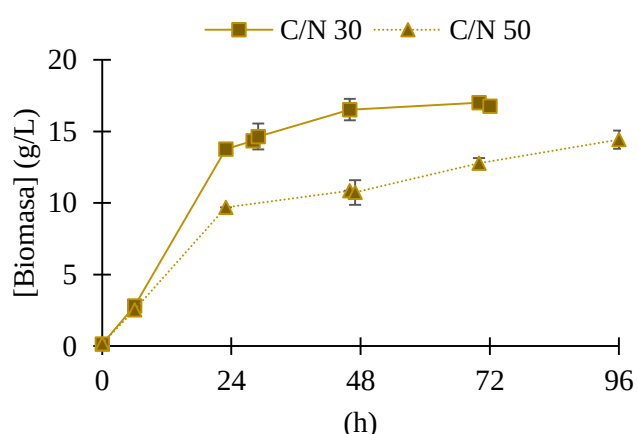


Figura 4.7. Concentración de biomasa celular seca en los medios con relación C/N 30 y C/N 50.

Para llevar a cabo un seguimiento de los cultivos respecto a la acumulación lipídica, se tomaron muestras del cultivo celular antes de cada pulso de glucosa y al final del proceso. En estas muestras se determinaron los lípidos totales acumulados, el porcentaje de estos correspondiente a ácidos grasos derivados de TAGs y el perfil de ácidos grasos. En la Tabla 4.6 se muestran los porcentajes de lípidos totales y de los ácidos grasos acumulados usando la cepa *C. curvatus* CL6032 en los medios derivados de destrío de tomate a diferentes relaciones C/N.

Tabla 4.6. Porcentajes de lípidos totales y ácidos grasos derivados de TAGs acumulados por la levadura *C. curvatus* CL6032 cultivada en medio derivado de tomate (C/N 15, 30 y 50) siguiendo estrategia fed-batch.

MEDIOS DERIVADOS DEL DESTRÍO DE TOMATE		
C/N 15	Lípidos totales (%) (p/p)	Ácidos grasos (%) (p/p)
Antes del 1 ^{er} pulso	9,2±0,1	8,1±0,2
Antes del 2 ^o pulso	14,8±0,3	12,0±0,1
Final	29,2±1,3	24,3±0,8
C/N 30	Lípidos totales (%) (p/p)	Ácidos grasos (%) (p/p)
Antes del 1 ^{er} pulso	14,2±0,2	14,1±0,1
Final	30,2±0,9	26,9±0,3
C/N 50	Lípidos totales (%) (p/p)	Ácidos grasos (%) (p/p)
Antes del 1 ^{er} pulso	21,6±0,8	21,0±0,4
Final	39,6±1,9	38,4±0,5

En las células recolectadas antes del primer pulso, el contenido de lípidos aumentó del medio con relación C/N 15 de 9,2 % a 14,2 % y 21,6 % (p/p) en células cultivadas en medio con relación inicial C/N 30 y 50, respectivamente. Teniendo en cuenta el proceso completo, el mayor porcentaje de acumulación se obtuvo en el medio con una relación C/N 50, lográndose una acumulación del 39,6 % de lípidos totales, de los cuales 38,4 % se identificaron como ácidos grasos derivados de los TAGs. El incremento en la acumulación de lípidos tras la adición de pulsos de glucosa también se ha observado en otras levaduras oleaginosas. Fakas y col. (2008) incrementaron la acumulación de lípidos totales de 9,7 % a 42 % y la producción de lípidos de 2,2 g/L a 8,5 g/L en *Cunninghamella echinulata* tras la adición de glucosa en un hidrolizado de tomate obtenido a partir de tratamientos ácidos. Este resultado vuelve a poner de manifiesto la importancia de aumentar la relación C/N inicial para desencadenar la acumulación de lípidos.

ii) Cultivos en medio derivados de destríos de pimienta

El pimienta, junto con el tomate, representa uno de los principales vegetales descartados en el sector hortofrutícola en España, generándose entre el tomate y el pimienta más del 50 % de los residuos de biomasa de este sector (Duque-Acevedo y col., 2020).

Los resultados de los cultivos llevados a cabo con la cepa *C. curvatus* CL6032 en la fracción líquida de destrío de pimienta siguiendo la estrategia *fed-batch* con pulsos de

Resultados y Discusión

glucosa y a diferentes relaciones C/N (15, 30 y 50) se reflejan en la Figura 4.8 y 4.9, recogiendo los consumos de azúcares, la producción de manitol y la biomasa celular generada.

En estos ensayos se pudo observar la preferencia de la levadura *C. curvatus* por la glucosa frente a la fructosa, al igual que se reportó anteriormente durante los cultivos en medio de tomate de destrío. En los medios con una relación C/N 30 puede apreciarse un consumo más lento de glucosa, lo que facilitó visualizar la preferencia de consumo de este azúcar. En el medio con una relación C/N 50 puede observarse que, tras la adición del pulso de glucosa, la concentración de fructosa (8 g/L) se mantuvo constante durante el resto del proceso debido a la presencia de glucosa.

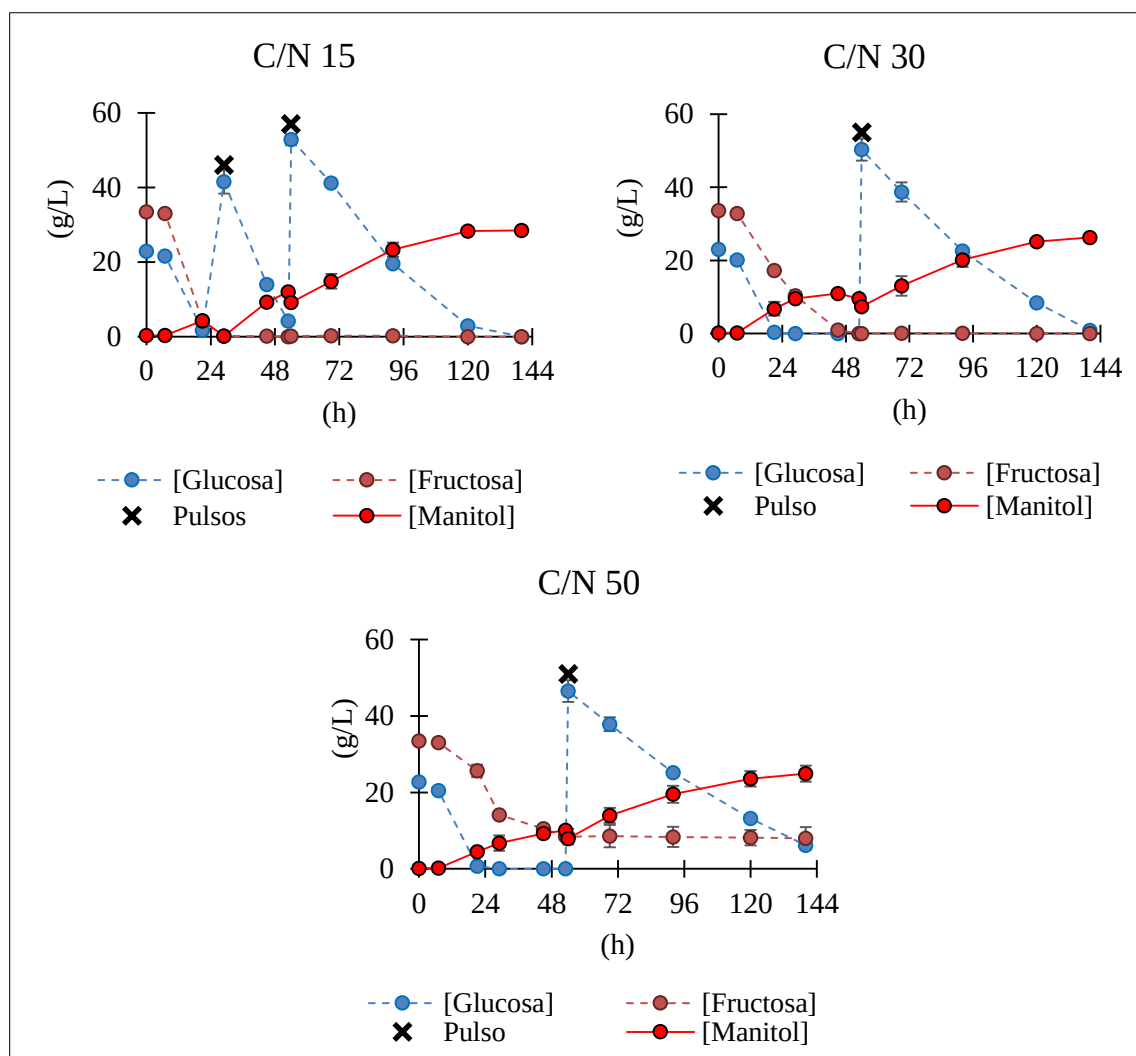


Figura 4.8. Consumo de azúcares y producción de manitol por *C. curvatus* CL6032 en medio derivado de destrío de pimienta a C/N 15, 30 y 50. Los pulsos de glucosa se representan en las gráficas por "x".

En estos cultivos se pudo observar una acumulación en la concentración de manitol a medida que transcurría el proceso de fermentación. En el medio con una relación C/N 15, tras el agotamiento de las fuentes de carbono antes de las 24 h, también se observó una disminución en la concentración de manitol. Sin embargo, con la introducción del pulso de glucosa, la concentración de manitol en el medio fue en aumento, llegando a alcanzar valores superiores a 28,5 g/L.

Al igual que se observó para los cultivos en medio de tomate de destrío, como se muestra en la Figura 4.9, en los medios derivados de pimienta con una menor relación C/N se vio favorecido el crecimiento celular. La mayor concentración de biomasa celular se alcanzó en el ensayo con una relación C/N 15, alcanzando aproximadamente 41 g/L de peso seco celular al final del proceso (140 h). En el caso de los cultivos llevados a

Resultados y Discusión

cabo en medios con una relación C/N inicial de 30 y 50, la concentración de biomasa celular alcanzada al final del proceso fue de 33 g/L y 25 g/L, respectivamente.

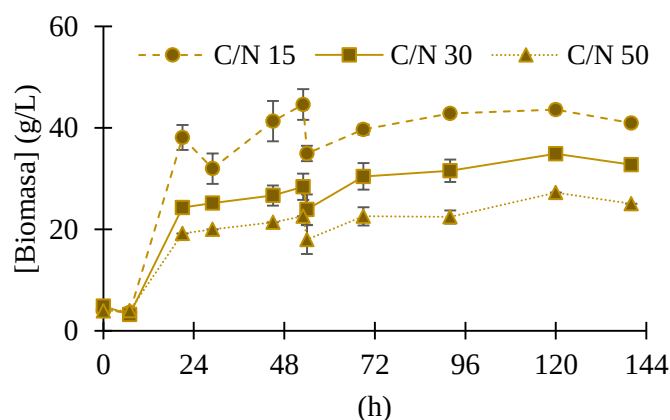


Figura 4.9. Concentración de biomasa celular seca en los medios con relación C/N 15, 30 y C/N 50.

En la Tabla 4.7 se muestran los porcentajes de lípidos totales y de los ácidos grasos acumulados antes de los pulsos y al final del proceso.

Tabla 4.7. Porcentajes de lípidos totales y ácidos grasos derivados de TAGs acumulados por la levadura *C. curvatus* CL6032 cultivada en medio derivado de pimienta (C/N 15, 30 y 50) siguiendo estrategia fed-batch.

MEDIOS DERIVADOS DEL DESTRÍO DE PIMIENTO		
C/N 15	Lípidos totales (%) (p/p)	Ácidos grasos (%) (p/p)
Antes del 1 ^{er} pulso	8,6±0,1	7,3±0,2
Antes del 2 ^o pulso	14,3±0,9	12,5±0,6
Final	32,7±1,1	29,2±1,3
C/N 30	Lípidos totales (%) (p/p)	Ácidos grasos (%) (p/p)
Antes del 1 ^{er} pulso	18,4±0,6	14,8±0,4
Final	36,8±2,3	32,6±1,6
C/N 50	Lípidos totales (%) (p/p)	Ácidos grasos (%) (p/p)
Antes del 1 ^{er} pulso	20,8±1,1	15,9±0,5
Final	40,9±0,4	37,2±0,2

En los ensayos con medio derivado de pimienta de destrío, los porcentajes de acumulación de lípidos fueron superiores a los observados en los ensayos con tomate de destrío. En los medios con una relación C/N 50, se alcanzó un 37,2 % de almacenamiento de ácidos grasos derivados de TAGs, de un total de aproximadamente 41 % de lípidos totales (valor cercano al 46 % registrado en medio MLO con esta cepa). Aunque de forma general el aumento en la relación C/N de los medios favorece la acumulación lipídica, hay que destacar el alto contenido intracelular de lípidos (32,7 % p/p) en el medio de

pimiento con una relación C/N 15. Este resultado pone de relieve el potencial de este tipo de residuo como medio de cultivo para los procesos de producción de aceite microbiano.

iii) Cultivos en medio derivados de destríos de sandía

La cepa *C. curvatus* CL6032 también se cultivó en la fracción líquida procedente de destrío de sandía. Estos cultivos se evaluaron siguiendo las mismas condiciones y estrategia de acumulación que con los medios anteriores. Hay que destacar que los medios derivados de destrío de sandía presentaban junto a la glucosa y la fructosa una cantidad significativa de sacarosa, con una concentración media de 24 g/L como se muestra en la Tabla 4.3.

En las Figuras 4.10 y 4.11 se recogen las cinéticas de los consumos de azúcares, la producción de manitol y el crecimiento celular en este medio a distintas relaciones C/N iniciales (15, 30 y 50) siguiendo una estrategia *fed-batch* con el objetivo de favorecer la síntesis de aceite microbiano como reservorio energético en forma de TAGs. Cabe destacar que el disacárido sacarosa se convirtió completamente durante las primeras horas de cultivo en los monómeros correspondientes, glucosa y fructosa. Este resultado es indicativo de la presencia de la enzima invertasa en la cepa *C. curvatus* CL6032, responsable de hidrolizar la sacarosa en glucosa y fructosa. La secreción de la enzima invertasa por *C. curvatus* se ha informado previamente en la literatura (Tchakouteu y col., 2015), probando la capacidad de este microorganismo para hidrolizar la sacarosa.

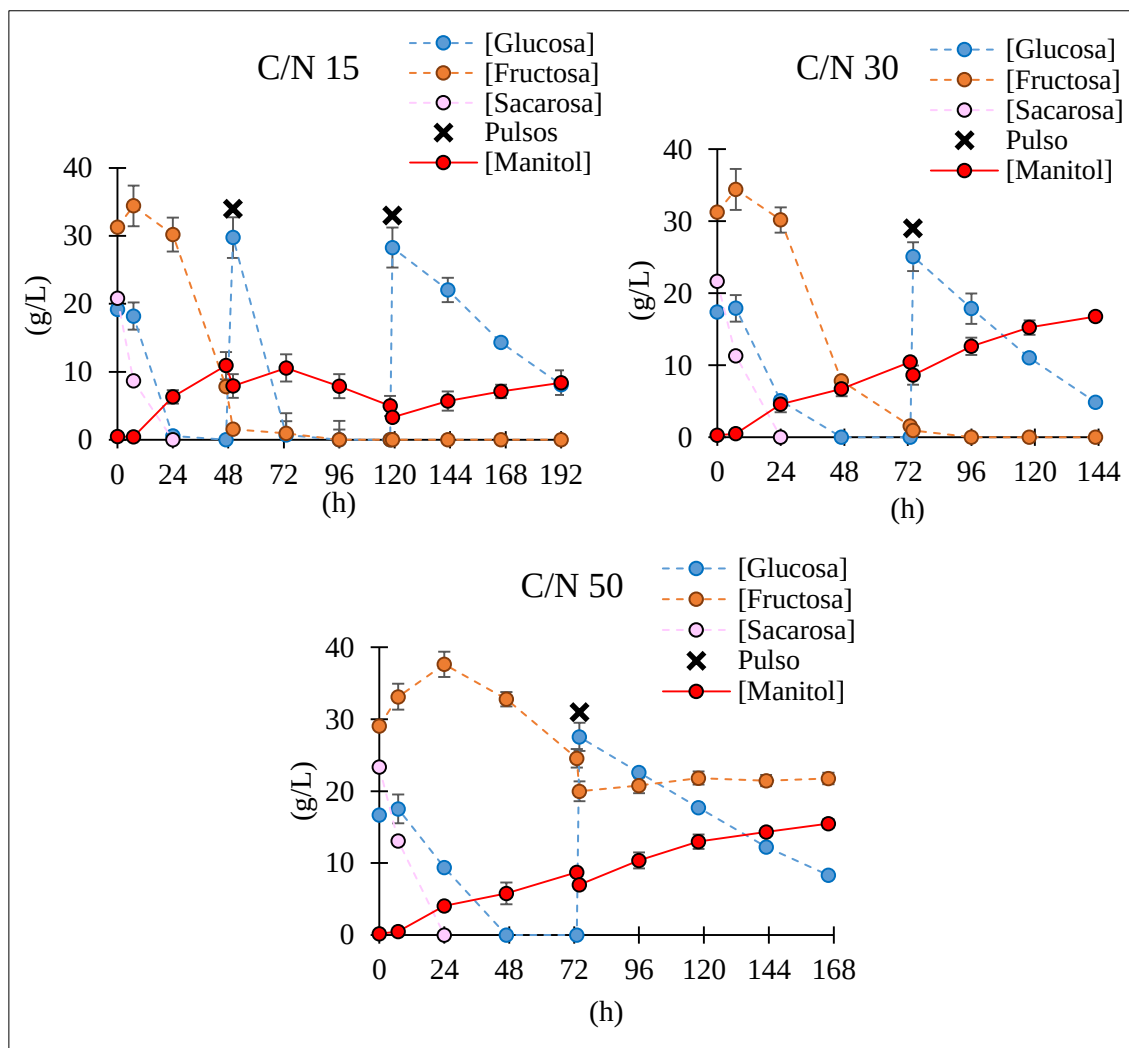


Figura 4.10. Consumo de azúcares y producción de manitol por *C. curvatus* CL6032 en medio derivado de destrío de sandía a C/N 15, 30 y 50. Los pulsos de glucosa se representan en las gráficas por "x".

La hidrólisis de la sacarosa resultó en una acumulación de fructosa, en los casos donde todavía estaba presente la glucosa en el medio. Este efecto fue más visible en los cultivos con relaciones C/N 30 y 50 debido a las menores tasas de consumo de azúcar. Además, en los medios con una relación C/N 50, el pulso de glucosa se realizó cuando la concentración de fructosa era aún alta (en torno a los 20 g/L), limitando el consumo de este azúcar durante el proceso.

Independientemente de la relación C/N, se registró la presencia de manitol en el medio de crecimiento. Además, en la gráfica de relación C/N 15 de la Figura 4.10, puede apreciarse que la concentración de manitol disminuyó en un periodo donde se observó un consumo total de azúcares. De forma simultánea al descenso en la concentración de

manitol, también se observó un aumento en la concentración de la biomasa celular (Figura 4.11), por lo que la levadura *C. curvatus* estaría usando este poliol como fuente de carbono.

La concentración de biomasa celular fue inversamente proporcional a la relación C/N, alcanzándose la máxima de 38,7 g/L en el cultivo de relación C/N inicial de 15, seguido de una concentración de 31,0 g/L y 24,8 g/L en los medios con relación C/N 30 y 50, respectivamente.

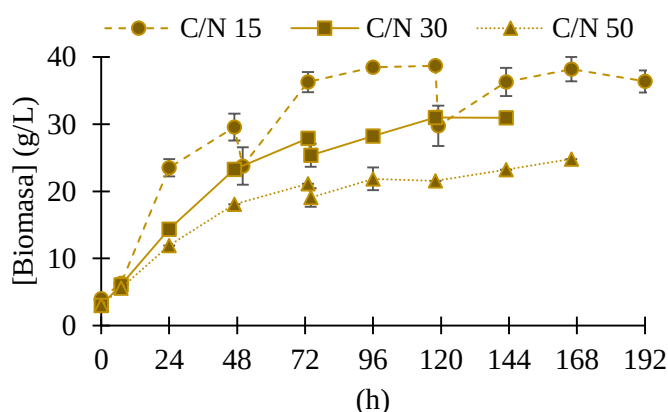


Figura 4.11. Concentración de biomasa celular seca en los medios con relación C/N 15, 30 y C/N 50.

Al igual que en los estudios realizados con tomate y pimiento, se determinaron los lípidos totales acumulados y el porcentaje y perfil de ácidos grasos derivados de TAGs. Los resultados se muestran en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Porcentajes de lípidos totales y ácidos grasos derivados de TAGs acumulados por la levadura *C. curvatus* CL6032 cultivada en medio derivado de sandía (C/N 15, 30 y 50) siguiendo estrategia fed-batch.

MEDIOS DERIVADOS DEL DESTRÍO DE SANDÍA		
C/N 15	Lípidos totales (%) (p/p)	Ácidos grasos (%) (p/p)
Antes del 1 ^{er} pulso	17,3±0,5	14,8±0,1
Antes del 2 ^o pulso	21,6±0,7	19,0±1,0
Final	29,5±0,1	27,3±1,3
C/N 30	Lípidos totales (%) (p/p)	Ácidos grasos (%) (p/p)
Antes del 1 ^{er} pulso	22,4±0,7	21,4±2,6
Final	34,3±0,9	23,8±2,9
C/N 50	Lípidos totales (%) (p/p)	Ácidos grasos (%) (p/p)
Antes del 1 ^{er} pulso	23,8±0,4	22,3±3,3
Final	35,4±0,1	24,8±1,9

Resultados y Discusión

En los ensayos con medio derivado de sandía de destrío, la levadura presentó mayor porcentaje de acumulación antes del primer pulso con respecto a las anteriores experiencias de otros medios. Probablemente, esto fue debido al mayor contenido de azúcares presente en la FL de sandía de destrío (Tabla 4.3). Sin embargo, en este medio no se superaron los datos finales de acumulación obtenidos en las experiencias con tomate y pimienta con una relación inicial de C/N 50, lográndose en el medio de pimienta y tomate de destrío un 40,9 % y 39,6 %, respectivamente, en comparación con el 35,4 % observado para el medio de sandía.

En comparación con otros estudios donde se emplearon medios de desechos de cáscaras de sandía y el hongo oleaginoso *Syncephalastrum racemosum* (Hashem y col., 2020b), en las condiciones de trabajo estudiadas en esta Tesis se han obtenido mejores resultados en términos de concentración de biomasa y de acumulación de lípidos usando un medio de cultivo similar (sandía de destrío que incluyó cáscara y pulpa) y la levadura *C. curvatus* CL6032. De forma particular, el cultivo de *C. curvatus* en medio de sandía ha permitido obtener una concentración de biomasa celular de 25-36 g/L (dependiendo de la relación C/N) frente a los 16,8 g/L reportados en el estudio con cáscaras de sandía y *S. racemosum*. Asimismo, el porcentaje de acumulación de lípidos alcanzados asciende a 29,5-35,4 % (Tabla 4.8), frente a los 28,6% alcanzados por *S. racemosum*.

Respecto a los g de ácidos grasos acumulados por 100 g de peso seco celular, cabe destacar que en los cultivos con el medio de sandía de destrío el porcentaje apenas se incrementó con el aumento de la relación C/N. Esto pudo estar motivado por la diversidad en el flujo de carbono hacia rutas metabólicas alternativas. La interacción entre diferentes rutas metabólicas en las levaduras oleaginosas se ha estudiado con anterioridad en *Y. lipolytica* y *C. curvatus*, observándose una interacción entre la lipogénesis y la biosíntesis de azúcares intracelulares (Dourou y col., 2017; Carota y col., 2020). De hecho, se ha demostrado que al igual que la biosíntesis de lípidos *de novo*, la síntesis y almacenamiento de polisacáridos intracelulares también puede desencadenarse por factores similares, siendo probable que esta última ruta de síntesis de polisacáridos compita con la lipogénesis. Tchakouteu y col. (2015) observaron altas cantidades de azúcares intracelulares a la vez que altas tasas de secreción de la enzima invertasa al comienzo de la fermentación con *C. curvatus* usando sacarosa como fuente de carbono. Estos mismos autores concluyeron en sus estudios que la sacarosa no era una fuente

óptima de carbono para la acumulación de lípidos por esta levadura, ya que el contenido intracelular de lípidos no superó el 20 %, incluso a diferentes relaciones C/N. Otros autores, como Dourou y col. (2018), proponen incluso el bloqueo de la biosíntesis de lípidos por parte de vías competitivas como las rutas implicadas en la acumulación de polisacáridos de almacenamiento, la de producción de ácidos orgánicos como el ácido cítrico y la de polioles como el manitol o el eritritol. La baja variación de acumulación lipídica en los diferentes estudios en medio derivado de sandía de destrío a diferentes relaciones C/N podría explicarse por la presencia de sacarosa en el medio, junto con la expresión de otras rutas metabólicas como la de síntesis de polisacáridos intracelulares, compitiendo con la vía de síntesis y acumulación de aceite microbiano *de novo*.

4.4.2. Perfiles de ácidos grasos

El estudio del perfil de los ácidos grasos acumulados es fundamental para evaluar la aplicación técnica de los lípidos producidos y determinar si se obtiene una composición y concentración adecuada para destinar estos aceites microbianos a la producción de biocombustibles (biodiésel) u a otras industrias. Las Figuras 4.12, 4.13 y 4.14 recogen el perfil de ácidos grasos obtenido de los cultivos llevados a cabo con *C. curvatus* CL6032 en medio derivado de tomate, pimiento y sandía, respectivamente. Como puede observarse en las figuras, en general, el ácido oleico (C18:1) y el ácido palmítico (C16:0) se identificaron como los ácidos grasos dominantes antes de la introducción de pulsos de alimentación por glucosa, representando el 45,9-54,4 % y el 13,5-24,9 % del perfil total de ácidos grasos, respectivamente. Tras la aplicación de la estrategia de cultivo, con la introducción de los pulsos de glucosa, estos rangos aumentaron al 50,7-57,5 % y al 17,0-27,4 %, respectivamente; siguiéndoles en porcentaje el ácido linoleico (C18:2) y el ácido esteárico (C18:0). El ácido palmítico es el producto final de la biosíntesis de ácidos grasos en el citosol, sintetizándose a partir de este ácido graso el resto de ácidos grasos de cadena larga en el retículo endoplasmático (RE), por lo que se explicaría la tendencia de síntesis y acumulación hacia ciertos ácidos grasos en levaduras oleaginosas (bajo ciertas condiciones de cultivo), influyendo en el perfil obtenido (Pham y col., 2021).

Además, para estudiar cómo se van modificando los perfiles a medida que transcurre el proceso de fermentación y se produce la acumulación de TAGs, se analizó el perfil de ácidos grasos que presenta *C. curvatus* CL6032 antes de comenzar el bio-

Resultados y Discusión

proceso (perfil mostrado igualmente en las Figuras 4.12, 4.13 y 4.14 como perfil del inóculo). Se estudió el perfil de esta levadura cultivada en medio YPD, obteniéndose un porcentaje de lípidos totales en torno a 7-8 % (p/p), con un contenido similar entre el ácido oleico (C18:1) y el ácido linoleico (C18:2), siendo los ácidos grasos poliinsaturados linoleico y linolénico (C18:2 y C18:3) los representantes de casi el 50 % de este perfil. Minoritariamente se encontró ácido palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0).

En cambio, en los cultivos en medios derivados de destríos, conforme las condiciones del medio cambiaron y se volvieron más limitantes en nutrientes, el perfil de ácidos grasos se modificó observándose una mayor acumulación del ácido monoinsaturado oleico y del ácido graso saturado palmítico. Es posible que este cambio en el perfil se deba a que los ácidos grasos saturados y monoinsaturados sean más apropiados para formar parte de los TAGs en los cuerpos lipídicos por su conformación estructural, ya que los ácidos grasos insaturados son mayoritarios en lípidos de membrana o fosfolípidos que en lípidos neutros o de reserva (Konno y col., 2009). Asimismo, como se ha mencionado anteriormente, la síntesis de ácidos grasos en el citosol tiene como producto final el ácido palmítico (C16:0), que se esterifica con la coenzima A a palmitoil-CoA, pudiéndose transportar al RE para sintetizar otros ácidos grasos de cadena larga, resultando la siguiente etapa de elongación y desaturación en el ácido oleico (C18:1) (Fakas, 2017). Así pues, por la propia naturaleza del metabolismo de biosíntesis de ácidos grasos (Glosario - Figura i) y las reacciones iniciales de esta vía en el RE, podría explicarse por qué los triacilglicéridos, en levaduras oleaginosas, en su mayoría están compuestos por ácidos grasos de 16 y 18 átomos de carbono como el ácido palmítico o el ácido oleico.

Además, en las figuras relativas al perfil de ácidos grasos (Figuras 4.12, 4.13 y 4.14) se observan diferencias en el perfil de los componentes minoritarios. En el caso del medio de tomate con una relación inicial C/N 30 y 50, se puede observar la presencia del ácido lignocérico (C24:0) independientemente de la etapa de cultivo, mientras que el ácido palmitoleico (C16:1) sólo se registró en las etapas finales. Por su parte, en el cultivo en medio derivado de pimienta de destrío, el ácido lignocérico se acumuló en una menor concentración que en los medios de tomate con las mismas relaciones C/N. En cambio, en el cultivo en medio derivado de sandía de destrío el ácido lignocérico (C24:0) apareció principalmente en el ensayo con una relación C/N 15.

El uso de materias primas diferentes y de composición variable influye en los porcentajes de acumulación de lípidos, en el contenido de TAGs y en los ácidos grasos que los componen y, en definitiva, en los perfiles lipídicos obtenidos, así como en el crecimiento celular de la levadura (Kolouchová y col., 2016).

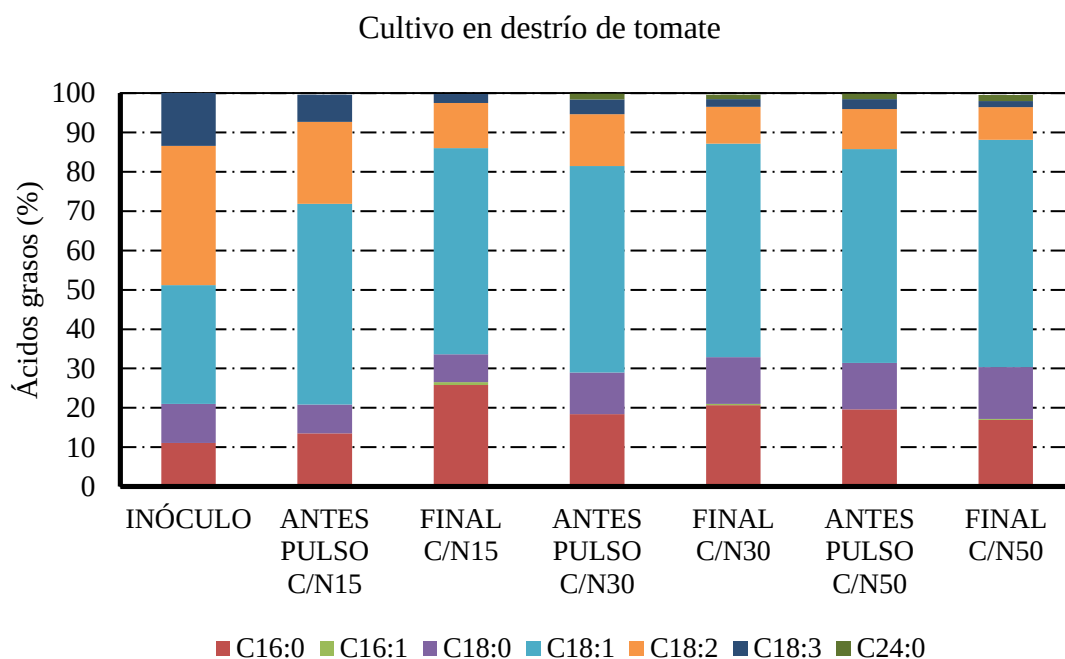


Figura 4.12. Perfil de ácidos grasos determinado en *C. curvatus* CL6032 cultivada en medio derivado de tomate de destrío (C/N 15, 30 y 50) siguiendo una estrategia fed-batch.

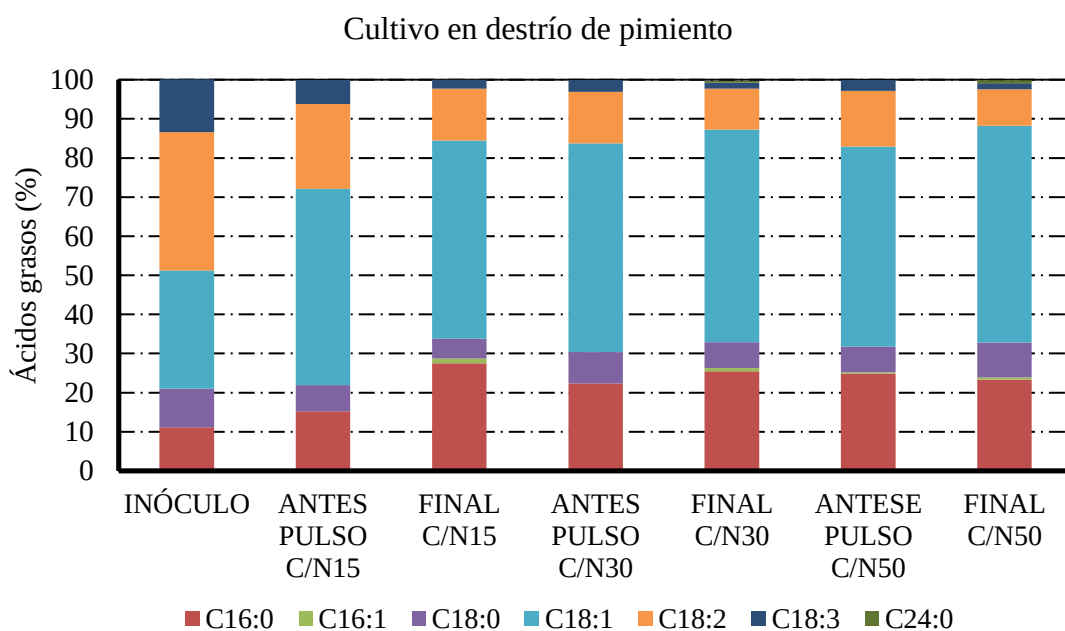


Figura 4.13. Perfil de ácidos grasos determinado en *C. curvatus* CL6032 cultivada en medio derivado de pimienta de destrío (C/N 15, 30 y 50) siguiendo una estrategia fed-batch.

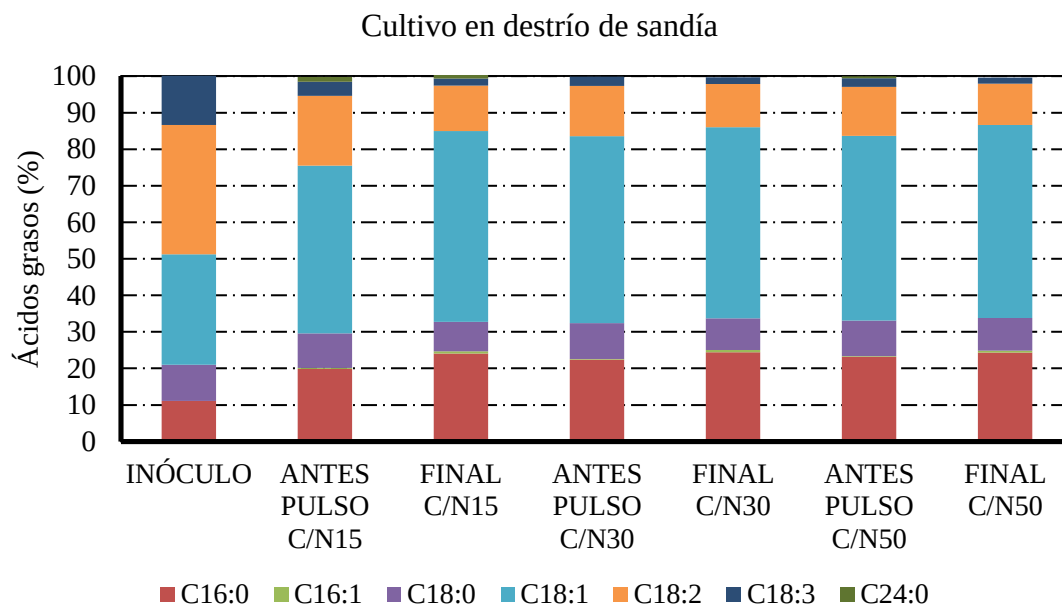


Figura 4.14. Perfil de ácidos grasos determinado en *C. curvatus* CL6032 cultivada en medio derivado de sandía de destrío (C/N 15, 30 y 50) siguiendo una estrategia fed-batch.

4.4.3. Concentración lipídica y rendimientos en los distintos cultivos realizados

Tras el estudio con la cepa *C. curvatus* CL6032 en los diferentes medios derivados de destríos de tomate, pimiento y sandía, a diferentes relaciones C/N siguiendo una estrategia de cultivo *fed-batch*, se determinó la concentración de lípidos (g/L), el rendimiento de lípidos (g lípidos/g azúcar consumido) y el rendimiento en biomasa celular (g células secas/g azúcar consumido) antes del primer pulso de glucosa y al final de los ensayos. Estos datos se reflejan en la Tabla 4.9.

Tabla 4.9. Concentración de lípidos, rendimientos de lípidos y peso seco celular de los cultivos realizados en los diferentes medios derivados de destríos y a diferentes relaciones C/N

CONCENTRACIÓN Y RENDIMIENTOS					
MEDIO DESTRÍO	C/N		Concentración lípidos (g/L)	Rendimiento lípidos (g/g) ^a	Rendimiento peso seco celular (g/g) ^b
TOMATE	15	Antes del 1 ^{er} pulso	2,6±0,02	0,090±0,001	0,78±0,02
		Final	8,8±0,04	0,114±0,000	0,45±0,01
	30	Antes del 1 ^{er} pulso	2,3±0,04	0,082±0,001	0,51±0,03
		Final	4,7±0,1	0,102±0,003	0,36±0,02
	50	Antes del 1 ^{er} pulso	2,6±0,1	0,091±0,003	0,38±0,01
		Final	5,4±0,1	0,156±0,007	0,40±0,00
PIMIENTO	15	Antes del 1 ^{er} pulso	4,3±0,1	0,079±0,001	0,70±0,02
		Final	16,8±0,5	0,115±0,003	0,42±0,01
	30	Antes del 1 ^{er} pulso	5,6±0,2	0,099±0,003	0,43±0,01
		Final	13,1±0,03	0,119±0,000	0,31±0,02
	50	Antes del 1 ^{er} pulso	4,8±0,1	0,086±0,002	0,31±0,02
		Final	11,3±0,01	0,129±0,000	0,28±0,03
SANDÍA	15	Antes del 1 ^{er} pulso	6,6±0,2	0,105±0,003	0,39±0,03
		Final	14,7±0,02	0,123±0,000	0,42±0,01
	30	Antes del 1 ^{er} pulso	7,2±0,2	0,107±0,003	0,36±0,01
		Final	11,7±0,3	0,142±0,003	0,37±0,01
	50	Antes del 1 ^{er} pulso	5,6±0,2	0,085±0,003	0,26±0,02
		Final	9,7±0,03	0,151±0,001	0,36±0,01

^a: g de lípidos por g de azúcar consumido; ^b: g de células secas por g de azúcar consumido

De la Tabla 4.9 hay que destacar que los mejores datos de rendimiento de biomasa celular seca se lograron en los medios con una relación C/N 15 de tomate con 0,78 g/g y de pimienta con 0,70 g/g, antes de los primeros pulsos. El rendimiento teórico de biomasa celular seca para levaduras oleaginosas se ha estimado en 0,68 g/g cuando las células tienen un contenido lipídico en torno a 10 g de lípidos/100 g peso seco celular (condiciones de no acumulación) (Pan y Rhee, 1986). Este rendimiento tiende a disminuir cuando la acumulación de lípidos aumenta, observándose valores de en torno a 0,36 g/g cuando el contenido lipídico celular se acerca a los 50 g/100 g peso seco celular. Los valores de biomasa celular en medios de destrío de tomate y pimienta superaron, por tanto, este valor teórico. El aumento de los rendimientos podría deberse a

Resultados y Discusión

la presencia en el medio de otros metabolitos que pueden actuar como fuentes adicionales de carbono y que se consumen durante las primeras horas de cultivo en ausencia de azúcares, como por ejemplo los ácidos orgánicos que están presentes de forma natural en la materia prima como es el caso del ácido cítrico (Tabla 4.3). A este respecto, Zeng y col. (2020) observaron que la levadura roja no convencional *Sporidiobolus pararoseus* puede usar el ácido cítrico como única fuente de carbono.

Por otro lado, bajo condiciones de acumulación lipídica, el rendimiento teórico de biomasa celular es 0,35-0,36 g/g (Pan y Rhee, 1986). Los valores obtenidos para el rendimiento en biomasa celular durante los cultivos en diferentes medios derivados de desechos se aproximaron a estos valores con un rango de 0,28-0,40 g/g.

Los mejores resultados en cuanto a los rendimientos de lípidos se observaron en el medio derivado de tomate y sandía de desecho alcanzándose un valor de 0,15-0,16 g/g con una relación C/N 50. Estos valores equivalen a un 47-50 % del teórico (0,32 g lípido/g de glucosa) (Juanssilfero y col., 2018). El rendimiento alcanzado en el medio de pimienta con una relación C/N 50 fue menor (0,13 g/g) respecto a los cultivos en los otros medios. Sin embargo, en el medio de pimienta se determinaron los mejores resultados en términos de concentración de lípidos al final de todos los ensayos, obteniéndose 16,8 g/L, 13,1 g/L y 11,3 g/L en los medios con una relación C/N 15, 30 y 50, respectivamente. Además, en el medio de pimienta fue donde se alcanzó el mayor porcentaje de lípidos acumulados, obteniendo en torno a un 41 % en el medio con relación C/N 50 como se muestra en la Figura 4.15.

Comparando con trabajos recogidos en la literatura, los valores de acumulación y concentración de lípidos obtenidos en este estudio fueron superiores a los descritos usando otros organismos oleaginosos y medios derivados de residuos para su cultivo. Por ejemplo, en el estudio de Hashem y col. (2020b) usando el hongo oleaginoso *S. racemosum* cultivado en medio de desechos de cáscaras de sandía, se alcanzó una concentración de 4,8 g/L de lípidos. Este valor fue menor en comparación al obtenido en el presente estudio en medio de sandía con una relación C/N 15 donde se alcanzó una concentración de lípidos de 14,7 g/L. Hashem y col. (2020a) reportaron un contenido lipídico de 39,6 % y una concentración de lípidos de 2,9 g/L usando el hongo oleaginoso *Lichthemia corymbifera* y un medio derivado de cáscaras de sandía. A pesar de que el

contenido lipídico fue similar entre *L. corymbifera* y *C. curvatus* CL6032, la concentración final de lípidos fue superior en *C. curvatus* (9,7 g/L vs. 2,9 g/L).

Fakas y col. (2008) reportaron con la especie *C. echinulata* un rendimiento lipídico de 0,11 g/g en medio derivado de hidrolizado de tomate. Este rendimiento fue similar al obtenido con *C. curvatus* al cultivarse en medio derivado de tomate de destrío con relación C/N 15. Sin embargo, en el medio con una relación C/N 50, *C. curvatus* alcanzó un rendimiento lipídico de 0,16 g/g. Hassan y col. (1994) cultivaron la cepa *C. curvatus* ATCC 20509 en la fracción líquida de higo chumbo diluida al 25 % y suplementada con KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, obteniendo un 46 % de lípidos acumulados, 0,48 g/g de rendimiento de biomasa seca y 0,22 g/g de rendimiento lipídico. Estos resultados son similares en términos de acumulación a los obtenidos con *C. curvatus* CL6032 en MLO. Por otro lado, se han observado concentraciones de lípidos menores a las alcanzadas en este estudio usando hidrolizados de residuos agroalimentarios. En este sentido, Jiru (2020) reportó una concentración de lípidos de 3,9 g/L y una acumulación lipídica final de 35,0 % utilizando la cepa *C. curvatus* PY39 cultivada en hidrolizados de cáscaras de mango y papaya.

En la Figura 4.15 se recoge una comparación de porcentaje de lípidos totales acumulados (g lípido/100 g de peso seco celular) por la levadura *C. curvatus* CL6032 cultivada en los diferentes medios de destríos estudiados siguiendo una estrategia *fed-batch* y con distintas relaciones C/N iniciales. En esta figura se observa que las levaduras cultivadas en el medio de pimienta de destrío son las que alcanzaron porcentajes de acumulación mayores al final de todas las experiencias, seguidas de los cultivos en medio de tomate. Por otro lado, se observa de forma general que el aumento en la relación C/N mejora el contenido lipídico intracelular, excepto en el medio de sandía donde la variación es menor, como ya se discutió anteriormente.

Las concentraciones tanto de biomasa celular (40 g/L) como de lípidos (16,8 g/L) alcanzadas en los medios derivados de pimienta de destrío con una relación C/N 15 fueron las más elevadas. Este resultado podría estar motivado por la presencia de compuestos específicos de estos medios. Los medios de cultivo derivados de los pimientos de destríos se obtuvieron a partir de mezclas de diferentes variedades, entre las que destacan pimientos verdes, amarillos y rojos junto a pimientos del género

Resultados y Discusión

Capsicum, conocidos como pimientos picantes. Los pimientos pertenecientes a este género se caracterizan por presentar un compuesto llamado capsaicina, que es el componente que les confiere el sabor picante. La capsaicina es un alcaloide de baja solubilidad en agua que presenta actividad bactericida y fungicida (Kuczera y col., 2023). La presencia de este compuesto en cultivos de la levadura oleaginoso *Rhodotorula mucilaginosa* mejoró las tasas de crecimiento y el porcentaje de viabilidad en comparación con el medio sin este compuesto (Sánchez-Arreguin y col., 2019). En cambio, en función de la concentración también se puede observar una influencia negativa sobre la viabilidad.

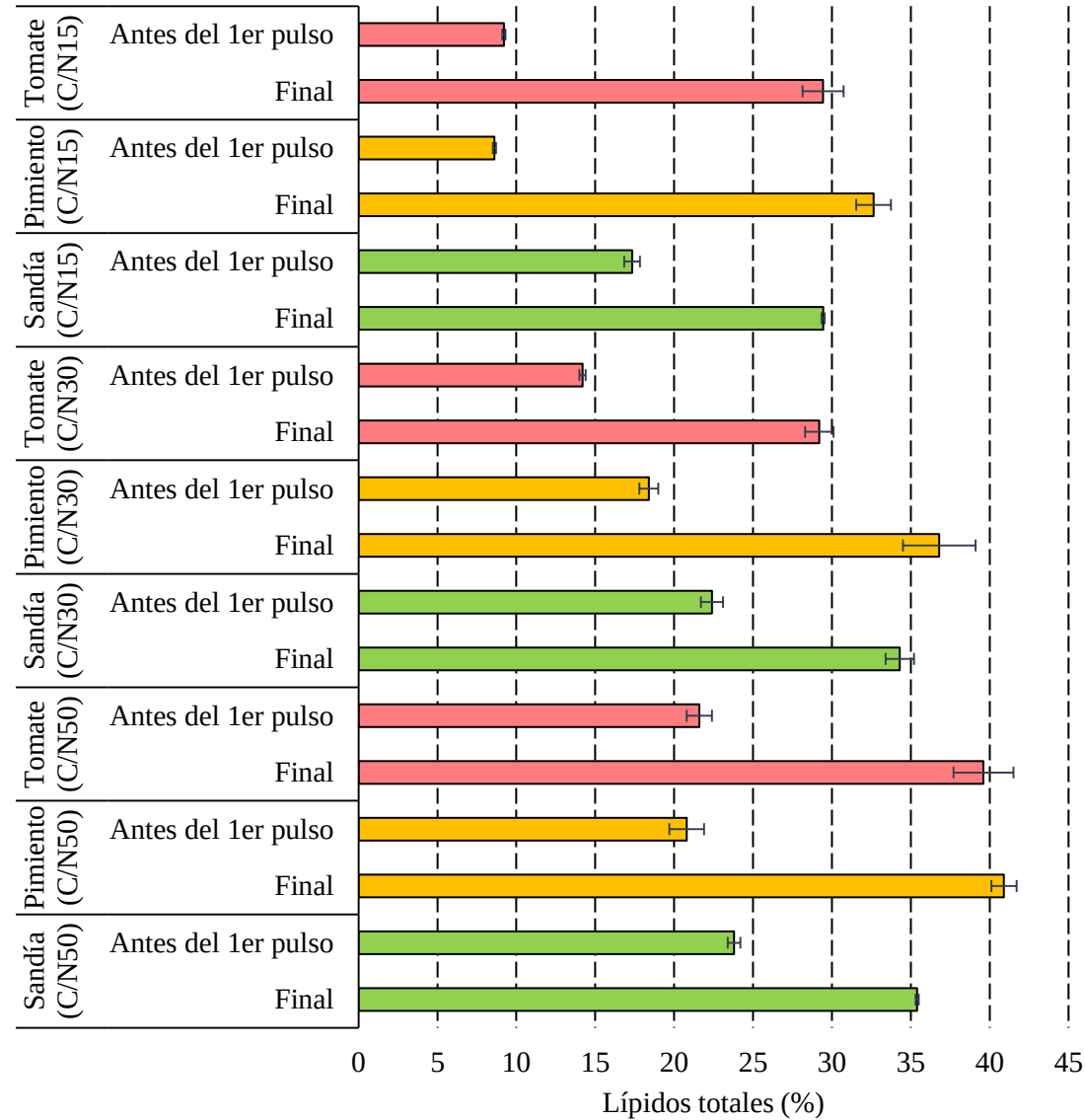


Figura 4.15. Comparación de porcentaje de lípidos totales acumulados (g lípido/100 g de peso seco) por *C. curvatus* CL6032 cultivada en los diferentes medios derivados de desríos siguiendo una estrategia fed-batch con relaciones iniciales de C/N 15, 30 y 50.

Por otro lado, al aumentar la relación C/N inicial de los medios de pimiento de 15 a 50, a pesar de observarse el porcentaje de acumulación más elevado (40,9 %), se registró también el dato más bajo de rendimiento lipídico respecto a los azúcares consumidos (0,13 g/g), en comparación con el tomate y la sandía de destrío. Este menor rendimiento puede estar motivado por una mayor acumulación de manitol en estas condiciones, ya que la levadura estaría destinando fuente de carbono a la síntesis de lípidos y, a su vez, a la producción de manitol.

4.4.4. Producción de manitol durante los cultivos con *C. curvatus* CL6032

En los estudios de apartados anteriores con la levadura *C. curvatus* CL6032 (incluida la cepa *C. curvatus* NRRL-Y-1511), se determinó la presencia de manitol en los sobrenadantes de los cultivos (Figuras 4.3, 4.6, 4.8 y 4.10). Este compuesto se determinó siempre en presencia de glucosa y/o fructosa y su concentración iba incrementándose con el tiempo. En cambio, también se comprobó que en ausencia de las fuentes de carbono azucaradas la concentración de manitol iba en descenso.

Napora y col. (2013) reportaron que en la levadura oleaginosa *Y. lipolytica* se puede producir una conversión directa de fructosa a manitol, conversión en la que participa la enzima manitol deshidrogenasa dependiente de NADPH (Mtdh), enzima que puede actuar de forma bidireccional. Gonçalves y col. (2019) observaron la producción de manitol en presencia de fructosa en levaduras del género *Wickerhamiella* y *Starmerella*, destacando la importancia de esta ruta en el equilibrio redox de la célula para el reciclaje de cofactores. Además, descubrieron una nueva ruta bioquímica que promueve la conversión de glucosa en fructosa, por lo que se podía producir manitol incluso cuando el único azúcar disponible es la glucosa. Además de intervenir en el equilibrio redox celular al regular el exceso de NADPH y regenerar, por tanto, NAPD^+ , estos autores sugirieron el papel potencial del manitol como elemento protector ante un determinando estrés (por ejemplo, estrés oxidativo).

En referencia al equilibrio redox, la producción de manitol podría relacionarse con estudios que demuestran un exceso de actividad de la vía de las pentosas fosfato en levaduras como *Y. lipolytica*, ya que esta ruta proporciona el NADPH necesario para la producción de lípidos (Wasylenko y col., 2015). En este sentido, la producción de manitol aliviaría el desequilibrio redox causado por esa sobreproducción con el reciclaje

Resultados y Discusión

de NADP⁺. Además, este desequilibrio puede verse agravado por una acumulación extra de NADPH motivada por la acción de la enzima ATP-citrato liasa (ACLY), en función de los valores relativos a la constante de Michaelis-Menten o K_m para cada especie. La ACLY interviene en la biosíntesis de ácidos grasos con la conversión de citrato a acetil-CoA, como se ha explicado en el apartado correspondiente de la Introducción (1.3.1 Metabolismo de síntesis de triacilglicéridos en levaduras oleaginosas). La K_m de la ACLY difiere de unas especies a otras. Por ejemplo, la K_m de la ACLY en la levadura *L. starkeyi* es de 0,07 mM mientras que en la levadura *Y. lipolytica* es de 3,6 mM. Un menor valor de K_m resulta en una mayor afinidad por el citrato de esta enzima y por lo tanto en una mayor eficacia para escindirlo, proporcionando más acetil-CoA para la síntesis de ácidos grasos. Sin embargo, valores mayores de K_m para la ACLY permiten la secreción del citrato al medio extracelular (Zhang y col., 2014; Dulermo y col., 2015). Por esta razón, *Y. lipolytica* estaría acumulando NADPH en condiciones de acumulación lipídica a la vez que secretaría citrato al medio y, favorecería la producción de manitol para compensar dicho desequilibrio.

En los cultivos del presente estudio usando *C. curvatus*, podría estar ocurriendo algo similar, produciéndose manitol y consumiéndose NADPH durante su síntesis, lo que permitiría que la levadura mantuviese la homeostasis redox y sobreviviese durante la fase estacionaria, como también ocurre en otras especies de levadura como *Saccharomyces uvarum* con la síntesis de eritritol en lugar de manitol (Albillos-Arenal y col., 2023).

En este trabajo, se determinó mayor concentración de manitol en los cultivos llevados a cabo en medios derivados de pimiento de destrío. En medio con relación C/N 15 la concentración de manitol alcanzada fue de 28,5 g/L, con relación C/N 30 de 26,3 g/L y con relación C/N 50 de 25,9 g/L (Figura 4.8).

En medio de tomate a C/N 30 (Figura 4.6) y en medio de sandía a C/N 15 (Figura 4.10) puede apreciarse como hay un descenso en la concentración de manitol cuando se agotan las fuentes de carbono. Este hecho también pudo observarse en el medio de pimiento a relación C/N 15, pero tras el pulso de glucosa se vuelve a recuperar la producción del polirol (Figura 4.8). El hecho de que el manitol se produzca y se secrete al medio en presencia de glucosa o, en ausencia de esta se consuma, también se recoge

en la literatura con la levadura *Y. lipolytica*, la cual tras el agotamiento de la glucosa consume el manitol previamente producido (Dulermo y col., 2015).

En dos de los cultivos la presencia de manitol en el medio vino acompañada del aumento de la concentración de fructosa cuando ya se había consumido por completo del medio. En el caso de la cepa *C. curvatus* CL6032, en medio de tomate con relación C/N 30 (Figura 4.6), a las 48 h se determinaron 2,2 g/L de glucosa, 0,3 g/L de fructosa y 8,6 g/L de manitol. Tras el consumo de la glucosa a las 70 h, se registró un descenso en la concentración de manitol hasta los 1,4 g/L, y un aumento en la concentración de fructosa a 2,6 g/L. Al final del ensayo, 2 h después, se siguió registrando el descenso en la concentración de manitol, 0,8 g/L, junto con el aumento de la concentración de fructosa, 2,8 g/L.

En el caso de la cepa *C. curvatus* NRRL-Y-1511, en medio de tomate con relación C/N 15 (Figura 4.3), a las 52 h se registró que en el medio no había ni glucosa ni fructosa, pero si manitol (5,4 g/L) que estaba comenzando a disminuir su concentración (a las 48 h se observó una concentración de 6,2 g/L). Finalmente, la concentración de manitol aumentó a 7,8 g/L tras el segundo pulso de glucosa introducido, registrándose también presencia de fructosa en el sobrenadante (2,5 g/L). Tras 72 h de cultivo, con 7,5 g/L de glucosa presente en el medio se determinaron 8,7 g/L de manitol y 3,0 g/L de fructosa. Estos resultados sugieren que, tras el agotamiento de las fuentes de carbono, el manitol se empieza a consumir. También se puede estar destinando a la producción de fructosa ya que este azúcar se identificó en el medio tras haberse consumido previamente. Incluso en presencia de glucosa, en el caso de la cepa *C. curvatus* NRRL-Y-1511, el manitol fue en aumento junto con la aparición de fructosa nueva en el medio. Los resultados alcanzados en esta Tesis demuestran por primera vez la capacidad de *C. curvatus* de acumular manitol y/o producir fructosa. Aunque se desconocen los mecanismos reguladores que podrían estar favoreciendo la acumulación de fructosa en la levadura, cabe destacar que se ha descrito un comportamiento similar en otras levaduras como *Y. lipolytica* o *Cryptococcus neoformans*, donde también el manitol podría tener funciones de almacén de energía o actuar como protector frente a estrés térmico, osmótico u oxidativo en esta última especie (Wong y col., 1990; Chaturvedi y col., 1996).

4.4.4.1. Determinación de la actividad de la enzima manitol deshidrogenasa

Para determinar la actividad manitol deshidrogenasa (Mtdh) en *C. curvatus*, se llevó a cabo un cultivo de esta levadura en la FL de medio de pimiento de destrío (C/N 15), siguiéndose una estrategia *fed-batch* con dos pulsos de glucosa. Las células de levadura se recolectaron durante la fase de producción de manitol cuando la concentración de este compuesto alcanzó los 15 g/L aproximadamente (Figura 4.16).

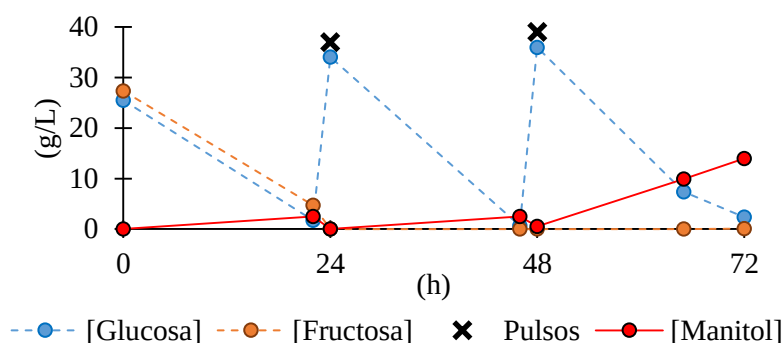


Figura 4.16. Consumo de azúcares y producción de manitol en un cultivo con la cepa *C. curvatus* CL6032.

Las células recolectadas se utilizaron para obtener un extracto celular y determinar la capacidad de *C. curvatus* CL6032 para reducir la fructosa y/u oxidar el manitol a través de la actividad específica de la enzima Mtdh (Figura 4.17).

La actividad enzimática medida para la reducción de fructosa fue de 0,3 U/mg de proteína, mientras que la actividad enzimática para la oxidación del manitol fue 1,1 U/mg de proteína. La absorbancia de las concentraciones de NADP^+ y NADPH para determinar la actividad enzimática, se refleja en la Figura 4.17. Como cofactor se usó NADPH/ NADP^+ y NADH/ NAD^+ , pero sólo se detectó actividad en el primer caso.

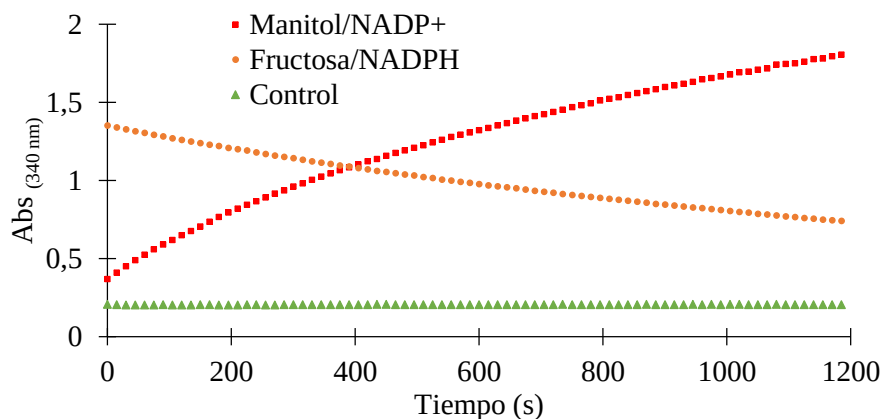


Figura 4.17. Seguimiento por absorbancia de las concentraciones de NADP^+ y NADPH durante 20 min usando Manitol/ NADP^+ , Fructosa/NADPH y un extracto celular de *C. curvatus* CL6032 en fase de producción de manitol.

Estos resultados confirman por tanto la presencia de la enzima Mtdh en la levadura *C. curvatus* CL6032, y apoyan los resultados en cuanto a la acumulación de manitol y fructosa durante los cultivos estudiados en esta Tesis.

4.4.5. Análisis tecno-económico

La producción de aceite microbiano usando la levadura *C. curvatus* CL6032, a partir del medio de pimiento de destrío con relación C/N 15, se seleccionó para llevar a cabo un análisis tecno-económico del proceso. Se optó por este cultivo debido a que fue con este residuo donde, en general, se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a concentración de lípidos, biomasa celular, acumulación y rendimientos lipídicos. Se alcanzó una concentración de lípidos de 16,8 g/L, con un contenido de aceite microbiano acumulado del 32 %, lográndose un perfil de ácidos grasos, con predominancia de 16 y 18 átomos de carbono, apto para producir biodiésel (Papanikolaou y Aggelis, 2011b). El rendimiento de lípidos determinado fue de 0,12 g lípidos/g azúcar consumido.

Estos resultados experimentales se utilizaron para evaluar la viabilidad técnico-económica de una planta de aceite microbiano propuesta utilizando el software *Aspen Plus* v12.0. La Figura 4.18 muestra un diagrama en el que se especifica la configuración del proceso simulado para la obtención de TAGs a partir de levaduras oleaginosas y destrío de pimiento como materia prima. La capacidad de planta se fijó en 100.000 toneladas anuales de este destrío, teniendo en cuenta la cantidad de destrío producido anualmente en Almería.

Resultados y Discusión

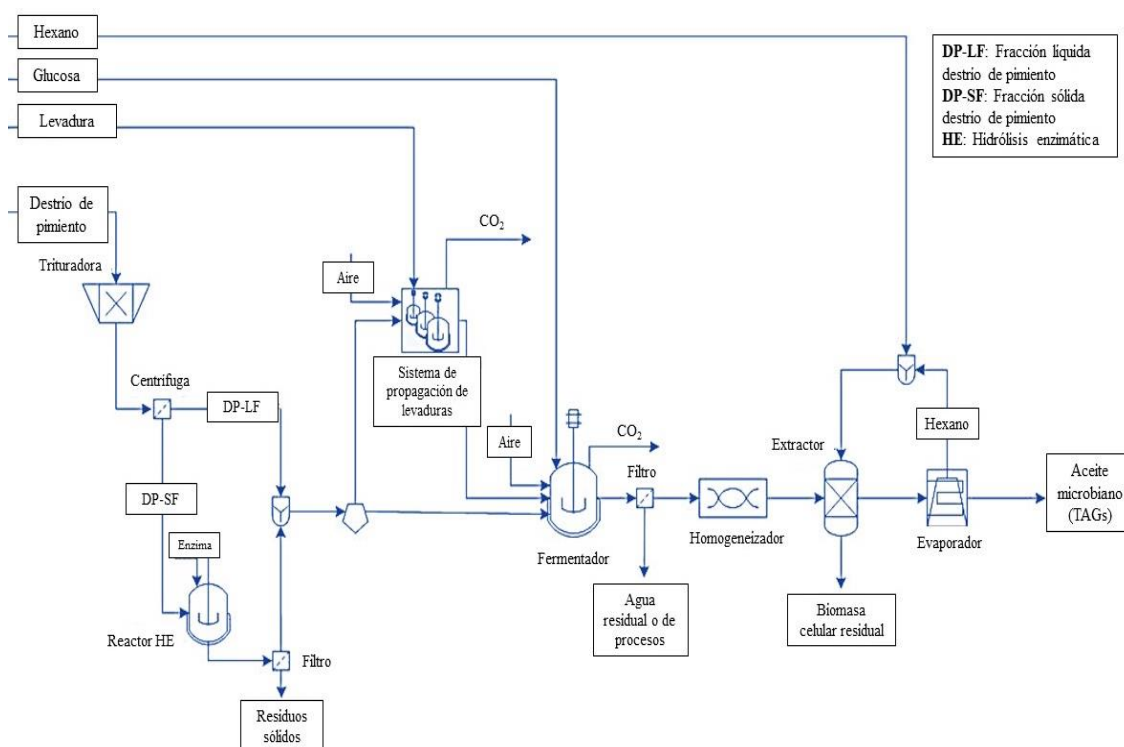


Figura 4.18. Esquema simplificado de una planta de producción de aceite microbiano en forma de TAGs a partir de pimientos de destrío como materia prima.

La primera etapa en la planta de procesamiento es la trituración del destrío empleado como materia prima. La corriente resultante se somete a una centrifugación y decantación obteniéndose por separado una DP-LF (Fracción líquida de destrío de pimienta) y una DP-SF (Fracción sólida de destrío de pimienta). La fracción sólida se traslada a un reactor de HE, donde se realiza el proceso de HE, obteniéndose los azúcares monoméricos derivados de los carbohidratos que la componen. El proceso de HE se simuló con una concentración de sólidos del 20 % (p/p), a 50 °C con una mezcla de enzimas celulasas con una dosis de enzima de 150 mg/g de glucanos durante 72 h. Se alcanzó un rendimiento de HE del 65 % del teórico (Álvarez y col., 2019; Negro y col., 2020; Moreno y col., 2021). La fracción líquida del hidrolizado se mezcla junto con la DP-LF inicial, rica en glucosa y fructosa. Esta mezcla de corrientes se usa como medio de cultivo en un fermentador para crecer a la levadura oleaginosa seleccionada (*C. curvatus* CL6032), que previamente fue crecida en un 10 % del flujo resultante de ese mismo medio para su propagación celular.

En este modelo la levadura fue definida como $C_4H_{6.5}O_{1.9}N_{0.7}$ y sus propiedades físicas se calcularon según Popovic (2019), ya que en el software empleado se trabaja con la composición química y propiedades físico-químicas de los elementos que

intervienen en el proceso. Las fuentes de carbono empleadas, al tratarse de glucosa y fructosa que tienen la misma fórmula molecular ($C_6H_{12}O_6$), se definieron atendiendo a los elementos C, H y O que las conforman. El nitrógeno orgánico presente en el destrío se modeló como el aminoácido lisina ($C_6H_{14}N_2O_2$). La composición elemental de los TAGs se definió en base a los ácidos grasos primarios obtenidos en el perfil lipídico del estudio a escala laboratorio. Todos estos TAGs se definieron considerando cada ácido como el único de cada TAG, es decir, TAGs formados por los mismos tres ácidos grasos: triglicérido a base de ácido oleico, trioleína ($C_{57}H_{104}O_6$) (Figura 4.19), triglicérido a base de ácido palmítico, tripalmitina ($C_{51}H_{98}O_6$), triglicérido a base de ácido linoleico, trilinoleína ($C_{57}H_{98}O_6$) y triglicérido a base de ácido esteárico, triestearina ($C_{57}H_{110}O_6$).

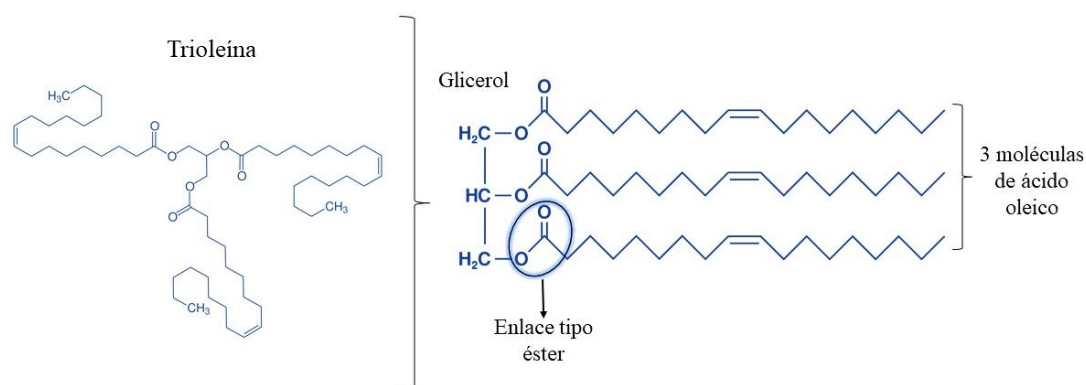


Figura 4.19. Triglicérido del ácido oleico – trioleína. Se representa la molécula de glicerol unida mediante enlaces tipo éster a tres moléculas de ácido oleico formando el TAG correspondiente con un solo tipo de ácido graso.

En el cultivo del fermentador se aplicaron las condiciones de 28 °C y 0,4 vvm durante 140 h para un crecimiento adecuado, siguiendo una estrategia inicial en modo discontinuo con la posterior incorporación de glucosa pura (1,7 g de glucosa/g de azúcares del destrío de pimiento) (modo *fed-batch*), simulando la experiencia en laboratorio de *C. curvatus* CL6032 en medio de destrío de pimiento con relación C/N 15 y dos pulsos de glucosa, para aumentar la relación C/N y favorecer la acumulación de ácidos grasos.

Tras el crecimiento en el fermentador y agotamiento de las fuentes de carbono a las 140 h, las células se recolectan y se someten a una ruptura mecánica en un homogeneizador. Tras esto, la corriente resultante se somete a una extracción con hexano (25 % (p/p) de levadura en hexano), el cual se puede recuperar en un evaporador y volver a emplear en un nuevo ciclo de extracción. En el extractor permanecen finalmente los

Resultados y Discusión

restos celulares y en el evaporador, tras reciclar el hexano, se encuentran los aceites microbianos en forma de TAGs, siendo el rendimiento de recuperación de lípidos de aproximadamente del 67,3 % (Kruger y col., 2018).

En la Tabla 4.10 se muestran los costes de la materia prima empleada (destrío de pimienta), los costes de los compuestos químicos y recursos usados (glucosa, hexano, agua, enzima, etc.) y los costes laborales; mostrándose en la Tabla 4.11 los insumos principales de materiales y energía y la cantidad de aceite microbiano producido en el proceso simulado.

La materia prima aparece en la Tabla 4.10 con un precio negativo, como coste que habría que restar al total, ya que el destrío de pimienta es un residuo del cual se obtendría beneficio económico por su gestión y aprovechamiento como recurso. No se incluye el precio de la levadura (€/t) ni el coste (€/año) porque el proceso de simulación se llevó a cabo con un inóculo celular procedente de un cultivo de propagación, es decir, de un reactor cuyo fin es el mantenimiento, propagación y generación de nuevos inóculos celulares sin necesidad de comprar la levadura cada vez que se vaya a realizar el proceso biológico de obtención de TAGs.

Tabla 4.10. Precios de mercado de la materia prima (residuo), productos químicos, servicios públicos y mano de obra.

Compuestos/Recursos	Precio	Unidad	Referencias
Destrío de pimienta	-6,6	€/t	(Reciclados Almerienses, 2005)
Glucosa	384,0	€/t	(IndexBox, 2022)
Hexano	491,5	€/t	(ICIS, 2021)
Enzima	284,0	€/t	(Joelsson y col., 2016)
Agua de proceso	1,3	€/m ³	(Consortio de Aguas, 2022)
Agua de refrigeración	3,9	€/GJ	(Turton y col., 2013)
Vapor	14,1	€/GJ	(Turton y col., 2013)
Electricidad	80,0	€/MWh	(EUROSTAT, 2022)
Personal/Mano de obra	2874,0	€/mes·trabajador	(INE, 2022)

Partiendo de una cantidad de 100.000 t/año de destrío de pimienta se obtendría en torno a 1150 t/año de aceite microbiano según la simulación, por lo tanto, una planta

que use aproximadamente 300 t/día de destrío de pimienta generaría sobre 3,2 t/día de aceite microbiano, lo que se correspondería con un rendimiento total de 96 kg de aceite microbiano por tonelada de materia prima seca de destrío de pimienta.

Tabla 4.11. Principales entradas y salidas de materia y energía en el proceso de obtención de aceite microbiano a partir de destrío de pimienta como materia prima

Compuestos/Recursos	Cantidad	Unidad
Destrío de pimienta	100.000	t/año
Glucosa	8496	t/año
Hexano	257	t/año
Enzima	68	t/año
Agua de proceso	9096	m ³ /año
Agua de refrigeración	220.250	GJ/año
Vapor	3673	GJ/año
Electricidad	44.063	MWh/año
Aceite microbiano (TAGs)	1153	t/año

Este valor de rendimiento de la planta de aproximadamente 96 kg de aceites microbianos/tonelada de pimienta de destrío seco, tendría un precio mínimo de venta estimado de 17 €/kg de aceite; valor sustancialmente más alto que el precio de los aceites vegetales comunes (0,6–2 €/kg) (Parsons y col., 2018; Karamerou y col., 2021). Además, la glucosa pura añadida en los pulsos en el fermentador representó aproximadamente el 94 % del costo total de los insumos, dominando los costos totales de los mismos, ya que el resto de los insumos empleados en el proceso, como por ejemplo las enzimas o el hexano, contribuyeron individualmente con porcentajes por debajo del 5 %. Comparando entre las Tablas 4.10 y 4.11 se puede observar que, aunque el precio del hexano fuese mayor que el de la glucosa (491,5 € frente a 384 €), al emplearse más cantidad de esta última como materia de entrada en el proceso, este insumo tuvo mayor repercusión en el coste final.

En otros estudios recogidos en la literatura se han alcanzado valores más próximos al de los aceites vegetales, como en el de Koutinas y col. (2014), donde se estimó en 5,5 \$/kg de aceite microbiano ($\approx$ 5,1 €/kg) empleando glucosa pura como materia prima. Este buen resultado también se debe a los mayores rendimientos alcanzados (0,23 g/g) respecto a los del presente estudio. En otro estudio de Parsons y

Resultados y Discusión

col. (2018) se reportó un precio mínimo de venta de entre 4 y 14 €/kg, dependiendo de la escala de la planta, usando paja de trigo y sacarosa. Además, se asumió que toda la fuente de carbono del medio se destinó a la síntesis de aceite microbiano.

Estas cifras señalan la necesidad de aumentar el rendimiento de la producción de aceite microbiano y considerar la utilización de posibles bio-productos como el manitol producido por la levadura, que no se tuvo en cuenta en este análisis, o subproductos como los restos celulares, para mejorar el desempeño económico del proceso y aplicar el concepto completo de biorrefinería a las levaduras oleaginosas. El sustituir los pulsos de glucosa, en las estrategias *fed-batch*, por pulsos derivados de materias primas económicas, como residuos, o usar microorganismos más robustos y/o con la capacidad de coproducir compuestos de alto valor añadido junto con los lípidos, serían otras vías para abaratar los costes del proceso u obtener más beneficios.

Respecto al manitol, el aprovechamiento de este poliol implicaría diversas ventajas puesto que es un compuesto con importantes funciones fisiológicas y es muy valorado en la industria alimentaria y farmacéutica, entre otras. Entre algunas de sus numerosas aplicaciones o propiedades, se destacan las siguientes: 1) es un compuesto seguro, reconocido por la Administración de Alimentos y Medicamentos como GRAS (*Generally Recognized As Safe* en inglés), 2) tiene utilidad como alimento funcional y es muy adecuado para personas diabéticas ya que su índice glucémico y de insulina es cero, 2) no causa reacciones de *Maillard* por lo que mantiene la apariencia del color de productos, 3) activa la enzima superóxido dismutasa por lo que puede usarse para eliminar radicales libres y disminuir la peroxidación lipídica que, por ejemplo, daña las membranas celulares, 4) es un diurético osmótico usado en clínica y, 5) sus grupos hidroxilo son propensos a reacciones de sustitución, condensación y esterificación por lo que puede generar derivados biológicamente activos (Dai y col., 2017; Meng y col., 2017; Chen y col., 2020).

Por otro lado, del aprovechamiento de los restos celulares tras la extracción lipídica también se pueden obtener compuestos de interés y, de este modo, mejorar la sostenibilidad de los biocombustibles derivados de aceite microbiano, valorizando todas las fracciones de la biomasa celular, desde la fracción oleaginosa hasta la fracción libre de aceites. Los restos celulares contienen proteínas y carbohidratos que pueden usarse

posteriormente, por ejemplo, como alimento en la industria de piensos. Kumar y col. (2017) en uno de sus estudios, además de obtener un contenido lipídico del 52,1 % con uso potencial para producir biodiésel con la levadura *Pichia guilliermondii*, también estimaron que la biomasa celular tras la extracción de lípidos contenía hasta 24,6 % y 44,2 % de proteínas y carbohidratos, respectivamente, lo que reveló su potencial para usarse como alimento para animales. Asimismo, la biomasa celular restante también puede convertirse en un precursor de combustible líquido, denominado biocrudo (equivalente renovable al petróleo crudo), mediante licuefacción hidrotermal. De este modo, valorizando todas las fracciones de la biomasa celular (lipídica y no lipídica) podría obtenerse un proceso más rentable y sostenible, minimizando el impacto ambiental y la generación de residuos haciendo más eficientes los procedimientos de trabajo de una biorrefinería (Lopes da Silva y col., 2023).

Para evaluar cómo afectaría la mejora del rendimiento de la producción de TAGs, la Figura 4.20 muestra la influencia del rendimiento de aceite microbiano sobre el precio mínimo de venta. Según esta gráfica, si se lograsen alcanzar rendimientos cercanos al valor teórico (Papanikolaou y Aggelis, 2011a), $\approx 0,32$ g lípidos/g azúcar consumido, se obtendría un precio mínimo de venta inferior a 7€/kg de aceite. Si a eso le sumamos la obtención de otros productos de alto valor añadido en el mismo cultivo, podría obtenerse un proceso más económico o de mayores beneficios para aplicar en una futura biorrefinería.

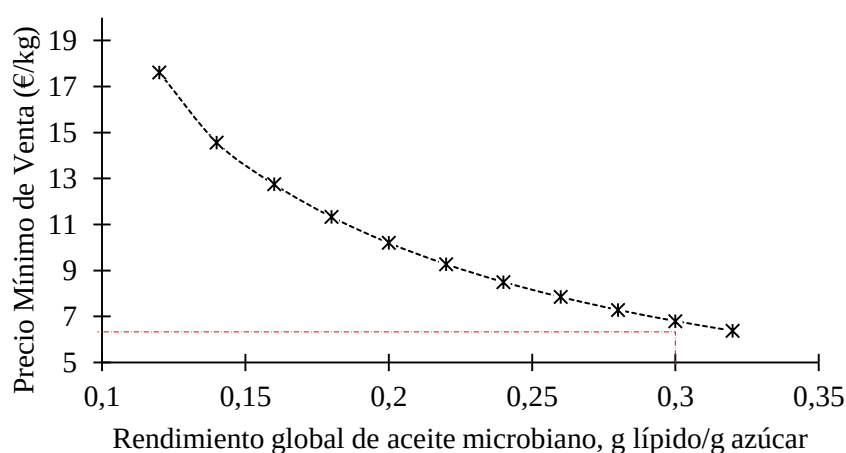


Figura 4.20. Representación de la relación inversa entre el rendimiento de aceite microbiano producido sobre el precio mínimo de venta de este, usando valores aportados por el análisis en Aspen Plus.

Resultados y Discusión

Tras los datos obtenidos en esta simulación de escalado con el software *Aspen plus*, este estudio evolucionó hacia la coproducción de diferentes compuestos de alto valor añadido en el mercado, como son los carotenoides; empleando sólo residuos para obtener los medios de crecimiento y acumulación, como se muestra en los siguientes apartados.

4.5. Cultivo de la especie *Rhodosporidium toruloides* en medio sintético

Existen varios géneros de levaduras oleaginosas denominadas rojas o rosas, como *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Xanthophyllomyces* (*Phaffia*), *Sporidiobolus* y *Sporobolomyces*, por su capacidad natural para producir carotenoides. Los carotenoides son pigmentos lipofílicos naturales que pueden llegar a coproducirse junto a los lípidos en levaduras oleaginosas, compartiendo el acetil-CoA como metabolito intermediario para su biosíntesis (Luqueño-Bocardo y col., 2021). En los últimos años, ha habido una creciente demanda de mercado de recursos de carotenoides naturales para superar los inconvenientes sobre la salud y medio ambiente que derivan de la síntesis química de carotenoides. Entre los candidatos para la síntesis natural de estos pigmentos se encuentran las levaduras oleaginosas rojas, representando una opción muy prometedora para la producción de carotenoides, pudiendo crecer usando como fuente de carbono residuos agroindustriales y alcanzar altas tasas de crecimiento en cultivos de alta densidad, además de coproducir TAGs (Kanamoto y col., 2021; Segal-Kischinevsky y col., 2022; Lopes da Silva y col., 2023).

En este sentido, se llevaron a cabo diferentes ensayos con la especie *R. toruloides* en medios derivados de residuos y aplicando diferentes estrategias para favorecer la acumulación lipídica y estudiar la producción simultánea de carotenoides. Debido a los bajos porcentajes de acumulación lipídica y a las bajas tasas de asimilación de glucosa observadas para la cepa *R. toruloides* C4 con el medio MLO, se decidió llevar a cabo un estudio con medio definido YNB (Yaegashi y col., 2017) y utilizar la cepa de colección *R. toruloides* ATCC 204091 a efectos comparativos. Estas levaduras se cultivaron en modo *batch* para estudiar y comparar su crecimiento a distintas relaciones C/N (33, 43 y 66). Las condiciones de cultivo para esta especie se fijaron según lo establecido en el apartado 3.4 de materiales y métodos. La Figura 4.21 muestra el consumo de glucosa (A) y el crecimiento celular (B) de las dos cepas cultivadas en YNB.

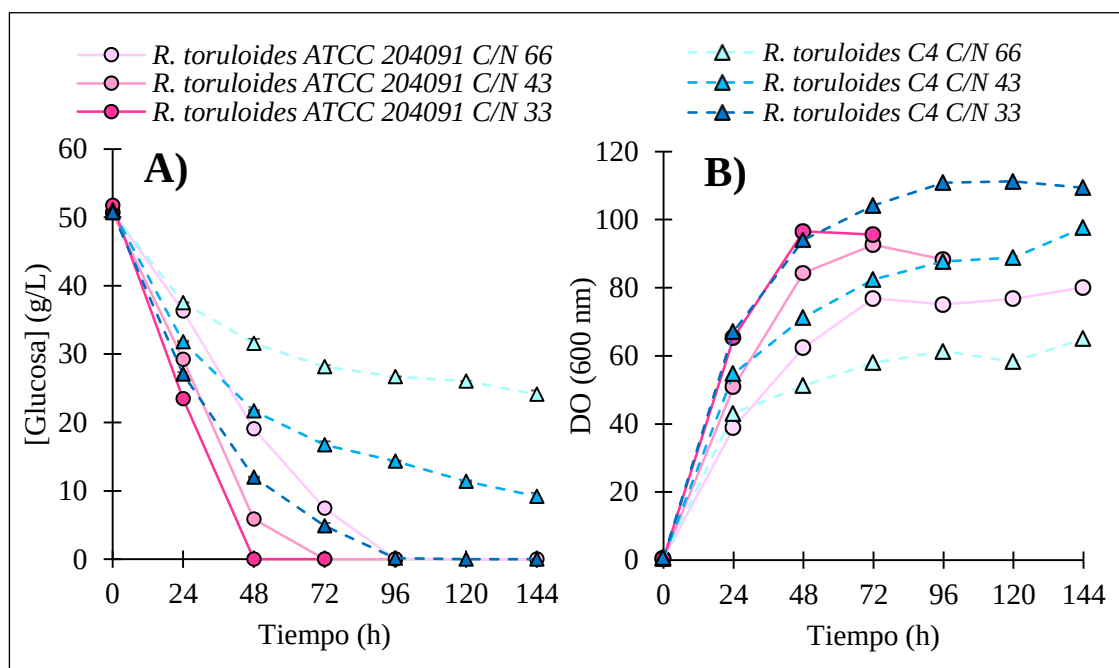


Figura 4.21. A) Consumo de glucosa y B) crecimiento celular (DO_{600nm}) de las levaduras oleaginosas *R. toruloides* ATCC 204091 y C4, estudiadas en medio YNB a 30 °C, pH 6 y 1 vvm.

La cepa *R. toruloides* ATCC 204091 presentó una tasa de consumo de glucosa y de crecimiento celular más alta respecto a la cepa *R. toruloides* C4 independientemente de la relación C/N. Este resultado, como se ha comentado con anterioridad durante la descripción de los ensayos con medio MLO, puede estar motivado por la mejora a la que se ha sometido la cepa C4 para que pueda asimilar de forma más eficiente el glicerol.

Además, se encontró que a mayor relación C/N el consumo de azúcar se ralentiza y el crecimiento celular también, alcanzándose densidades ópticas menores debido a la mayor limitación de nitrógeno en los cultivos con relación C/N más altas (por ej.: C/N 66 frente a C/N 33). Al tratarse de un medio más limitante, la levadura necesita más tiempo para adaptar su metabolismo y crecer en condiciones de estrés por escasez de nutrientes.

Respecto a la acumulación de aceite microbiano, en la Tabla 4.12 se muestran los resultados de acumulación de ácidos grasos totales derivados de los TAGs almacenados por cada una de las cepas crecidas en las diferentes relaciones C/N.

Resultados y Discusión

Tabla 4.12. Porcentaje de ácidos grasos derivados de TAGs acumulados en las levaduras mencionadas (%) = (g lípidos/100 g biomasa celular seca)

Cepa	Relación C/N	Ácidos grasos (%), (p/p)
<i>R. toruloides</i> ATCC 204091	33	32,0±0,3
	43	38,9±0,1
	66	47,5±0,7
<i>R. toruloides</i> C4	33	17,6±0,0
	43	17,0±0,2
	66	17,4±0,1

La cepa *R. toruloides* ATCC 204091 es la que mostró mejores resultados de acumulación de ácidos grasos respecto a la C4. Además, a medida que se incrementaba la relación C/N, el porcentaje de acumulación lipídica también aumentó, alcanzando un valor de 47,5 % de ácidos grasos en el medio de relación C/N 66. Sin embargo, con la cepa C4 el porcentaje de acumulación permaneció constante y en un porcentaje inferior al 20 % (p/p) en todas las relaciones C/N estudiadas. Estos datos también apoyan la hipótesis de que la cepa *R. toruloides* C4 no utiliza de forma eficiente la glucosa como fuente de carbono para la acumulación de aceite microbiano al tener un metabolismo adaptado a la utilización de glicerol.

4.6. Cultivo en medios derivados de destríos y residuos lignocelulósicos o celulósicos

Una vez analizados los resultados de los cultivos en el medio sintético YNB, la cepa *R. toruloides* ATCC 204091 se cultivó en medios derivados de residuos y bajo diferentes estrategias de cultivo, ya que fue la que presentó resultados más prometedores en el medio YNB respecto al almacenaje de ácidos grasos y consumo de azúcares. Como medio de cultivo para el crecimiento celular se utilizó el medio derivado de pimienta de destrío. Por otro lado, para la acumulación de lípidos se utilizaron los hidrolizados procedentes de la HE de poda urbana pretratada (HPO) y del residuo de papel no reciclado pretratado (HPA) (apartado 4.2.1).

4.6.1. Estrategia de cultivo *fed-batch* en medio derivado de destrío con pulsos HPO o HPA

En el estudio llevado a cabo con la especie *R. toruloides* ATCC 204091, en medio derivado de pimienta de destrío, se siguió una estrategia *fed-batch* al igual que la aplicada con *C. curvatus* CL6032 en los estudios recogidos en el apartado 4.4.1. Sin embargo, en vez de usar los pulsos de glucosa para desencadenar la síntesis lipídica, se emplearon pulsos de medio concentrado de HPO o pulsos de medio concentrado de HPA. Los azúcares derivados de la lignocelulosa/celulosa presentan ventajas como fuentes de carbono alternativas no alimentarias, ecológicas y sostenibles, para la producción de precursores de combustibles de base biológica como los aceites microbianos (Fei y col., 2016). Además, en los cultivos se evitó el uso de medio con glucosa pura, debido al impacto observado por este componente durante el análisis tecno-económico del apartado 4.4.5.

i) Cultivo con pulsos de medio HPO

Los estudios en medio derivado de residuos orgánicos con *R. toruloides* ATCC 204091 se llevaron a cabo en medio derivado de pimienta de destrío aplicando la estrategia *fed-batch* con pulsos de medio HPO (A). La relación C/N inicial del medio fue de 15, incorporándose dos pulsos concentrados de medio HPO aportando una concentración final de entre 50 y 55 g/L de glucosa. Hay que destacar que los pulsos con medio HPO, al contrario que ocurría con los pulsos de glucosa pura, también incorporan otros nutrientes al sistema, como por ejemplo fuentes de nitrógeno (véase Tabla 4.3), lo que puede dar lugar a un comportamiento diferente de los procesos de acumulación. La relación C/N del medio HPO se estimó en 46, mayor que la del medio derivado de pimienta que se encuentra normalmente entre 15. De esta manera, la relación C/N se incrementó a lo largo del ensayo con los pulsos de medio HPO para promover la acumulación lipídica.

ii) Cultivo con pulsos de medio HPA

Esta levadura también se estudió en medio derivado de pimienta de destrío aplicando la estrategia *fed-batch*, sustituyendo los pulsos con medio HPO por

Resultados y Discusión

pulsos con medio HPA (B). La relación C/N inicial del medio fue de 15, incorporándose dos pulsos concentrados de medio HPA que aportaron una concentración final de entre 50 y 55 g/L de glucosa. La relación C/N del medio HPA se determinó en 140, mayor que la de pulsos de medio HPO. Esto se debe al menor contenido en nitrógeno (0,2 g/L vs. 0,6 g/L) del medio HPA frente al medio HPO y al mayor contenido en carbono del medio HPA (además de glucosa, el medio de HPA también contiene 10-11 g/L de xilosa).

La Figura 4.22 recoge el consumo de azúcares, el crecimiento celular y la incorporación de los pulsos durante los ensayos. Durante las primeras 20 h, se observó una fase de latencia o fase *lag* por parte de *R. toruloides* para adaptarse al medio y ajustar su metabolismo a las condiciones de este. Una vez superada esta fase de adaptación, se pudo observar un crecimiento celular continuado en el tiempo que permitió alcanzar una concentración de biomasa celular en peso seco de 43 g/L en la estrategia con pulsos con medio HPO A), y en torno a 53 g/L en la estrategia con pulsos con medio HPA B). Este resultado destaca el potencial de utilizar estos medios residuales para la producción de biomasa celular por parte de *R. toruloides*.

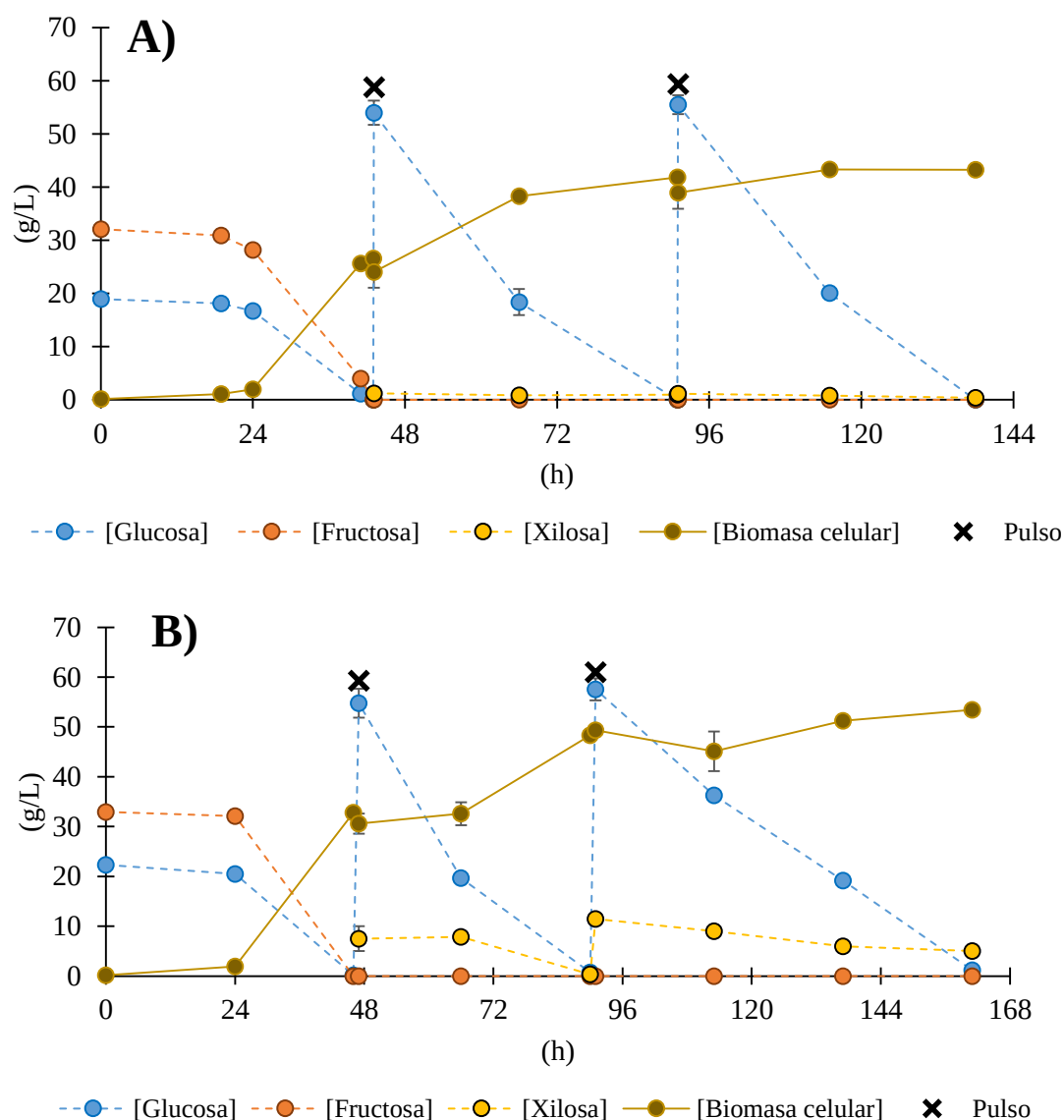


Figura 4.22. Consumo de azúcares y crecimiento de *R. toruloides* ATCC 204091 en medio derivado de destrío de pimienta a C/N 15. Los pulsos de medio HPO (A) y HPA (B) se representan en las gráficas con el símbolo “x”.

En la gráfica 4.22 A) se puede observar la capacidad de *R. toruloides* ATCC 204091 para asimilar de forma simultánea la fructosa y la glucosa, al contrario que ocurría con *C. curvatus* que presentó una asimilación secuencial de estas fuentes de carbono. El consumo simultáneo de glucosa y fructosa en *R. toruloides* también ha sido descrito por Matsakas y col. (2015), encontrando que la glucosa y la fructosa se co-utilizaban casi a la misma velocidad. Sin embargo, como se puede apreciar en la gráfica 4.22 B) con pulsos de medio HPA, las tasas de asimilación de glucosa y xilosa fueron diferentes en presencia de ambos azúcares. Asimismo, las tasas de consumo de xilosa se incrementaron en ausencia de glucosa, como se puede observar entre las 72-96 h de

Resultados y Discusión

proceso. Este resultado demuestra la capacidad de esta cepa de *R. toruloides* para asimilar este azúcar.

Carota y col. (2020) reportaron que las cepas de *R. toruloides* DMS 4444 y NRRL 1091 pudieron metabolizar simultáneamente carbohidratos como fructosa, glucosa y galactosa. Por otro lado, Saini y col. (2021) observaron que la cepa *R. toruloides* 1588 podía consumir glucosa y xilosa de residuos de madera con tasas diferentes de asimilación. Singh y col. (2018) comprobaron que *R. toruloides* ATCC 204091 presenta un patrón de crecimiento triaúxico, usando preferiblemente glucosa, xilosa y glicerol, respectivamente. Aunque se utilizó la misma cepa para este estudio, los resultados observados en esta Tesis no apoyan la hipótesis del crecimiento diáuxico en presencia de glucosa y xilosa, pero sí se observan diferencias significativas en las tasas de asimilación de estos azúcares.

Viabilidad celular

Durante los cultivos de *R. toruloides* ATCC 204091 en *fed-batch* con adición de pulsos de medio HPO y HPA se realizó un seguimiento de las células viables y del porcentaje de viabilidad. Estos parámetros celulares se muestran en la Figura 4.23. Independientemente del medio de adición empleado, el porcentaje de viabilidad se vio afectado de forma significativa tras los pulsos de medio de HPO o HPA. Este resultado pone de relieve el estrés que generan estos pulsos para el metabolismo celular de *R. toruloides*. Entre las principales causas de estrés podrían estar la alta relación C/N de los medios, la falta de nutrientes, o la presencia de algunos componentes que podrían actuar como inhibidores (como ciertos fenoles), así como otros compuestos no identificados que pudieran generarse durante la HE. El medio de HPO es el que deriva de unas condiciones de pretratamiento más severas, por lo tanto, es el que puede presentar más variedad de compuestos fenólicos. La presencia de compuestos fenólicos, incluso en bajas concentraciones, puede resultar inhibitoria para los microorganismos fermentativos durante los procesos de conversión de la biomasa lignocelulósica. Por su parte, la presencia de tintas y tintes en los medios de HPA también podría fomentar la inhibición microbiana.

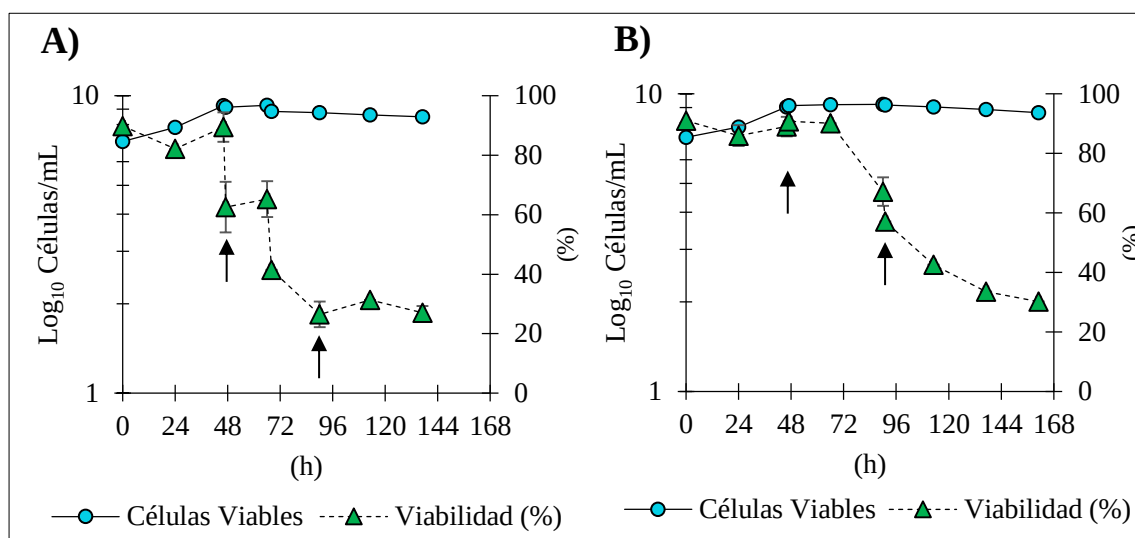


Figura 4.23. Porcentaje de viabilidad celular y células viables por mL (Log_{10} células/mL) de los cultivos realizados en medio derivado de destrío de pimienta con pulsos HPO A) y HPA B). Las flechas negras indican la incorporación de los pulsos.

Acumulación de lípidos y carotenoides

Una vez finalizados los procesos de cultivo, tras recolectar las células antes de los pulsos y al final de los ensayos, se procedió a la determinación de lípidos totales acumulados, el porcentaje de estos correspondiente a ácidos grasos derivados de TAGs y los carotenoides totales acumulados. En la Tabla 4.13 se recogen los porcentajes de lípidos totales y ácidos grasos junto con los μg de carotenoides totales por g de célula seca.

Tabla 4.13. Porcentajes de lípidos totales y de ácidos grasos derivados de TAGs y de contenido de carotenoides totales acumulados por la levadura *R. toruloides* ATCC 204091 cultivada en medio derivado de pimienta siguiendo una estrategia fed-batch con pulsos de medio HPO o HPA

ESTRATEGIA DE CULTIVO FED-BATCH EN MEDIO DERIVADO DE DESTRÍO DE PIMIENTO			
Pulsos HPO	Lípidos totales (%) (p/p)	Ácidos grasos (%) (p/p)	Carotenoides totales ($\mu\text{g/g}$)*
Antes del 1 ^{er} pulso	22,0 $\pm$ 0,4	16,5 $\pm$ 0,2	1043,5 $\pm$ 1,0
Antes del 2 ^o pulso	40,3 $\pm$ 0,4	34,2 $\pm$ 0,4	931,0 $\pm$ 1,2
Final	52,1 $\pm$ 0,1	51,9 $\pm$ 0,1	969,6 $\pm$ 2,1
Pulsos HPA	Lípidos totales (%) (p/p)	Ácidos grasos (%) (p/p)	Carotenoides totales ($\mu\text{g/g}$)*
Antes del 1 ^{er} pulso	26,6 $\pm$ 2,7	17,3 $\pm$ 0,2	941,4 $\pm$ 1,1
Antes del 2 ^o pulso	43,8 $\pm$ 1,0	37,8 $\pm$ 0,8	1099,9 $\pm$ 2,0
Final	56,5 $\pm$ 1,8	52,4 $\pm$ 0,3	885,0 $\pm$ 1,5

(*): μg de carotenoides por g de células secas

Resultados y Discusión

Comparando las dos estrategias empleando pulsos diferentes, no se observaron diferencias destacables en la acumulación de lípidos. Ambos cultivos superaron el 50 % de acumulación tanto de lípidos totales como de ácidos grasos derivados de los TAGs acumulados, alcanzándose un contenido total de 52-56 g de lípidos extraídos por 100 g de células secas.

La acumulación de carotenoides tampoco presentó diferencias relevantes. Además, cabe destacar que el valor de la producción de carotenoides fue constante durante todo el tiempo de cultivo, al contrario que los lípidos que se acumularon en función del tiempo y de la relación C/N. La acumulación de carotenoides sufrió pequeñas variaciones de incrementos y descensos durante los diferentes puntos muestreados. Estas diferencias de acumulación durante los cultivos pueden deberse a que la concentración de carotenoides totales se calculó mediante una curva patrón de β -caroteno en etanol, por lo tanto, se podría estar subestimando la concentración de otros carotenoides diferentes al utilizado para la curva patrón. También pudo interferir en estas fluctuaciones de concentraciones las diferencias en las relaciones C/N entre unos pulsos y otros e incluso la presencia de otros compuestos no determinados. Destacar que estas especies químicas son muy sensibles/inestables frente a procesos oxidativos, la exposición a la luz y variaciones de temperatura, debido al grado de insaturaciones que presentan (Reyes-González y Franco Correa, 2006). Estos factores, presentes tanto durante los cultivos como en las etapas de procesamiento (extracción y cuantificación), pueden interferir en la medida final. Tada y Shiroishi (1982) identificaron una enzima fotoinducible (EC. 1.1.1.34) en *Rhodotorula minuta* implicada en el metabolismo de biosíntesis de carotenoides y que no está involucrada en la biosíntesis lipídica. En este contexto, Kong y col. (2019) observaron en *R. mucilaginosa* la mejora de síntesis de carotenoides con el aumento de la intensidad de luz, lo que implicaba que la fotomorfogénesis y el estrés oxidativo también constaban bajo iluminación en *R. mucilaginosa*, teniendo la biosíntesis de carotenoides un papel importante en la función antioxidante. Por el contrario, una intensidad de luz alta provoca ciertos efectos inhibidores sobre el crecimiento celular, la acumulación lipídica, etc. Por lo tanto, evitar someter a las células a cambios lumínicos bruscos o duraderos es esencial para no cometer errores significativos en la determinación de estos terpenos, debiéndose mantener las mismas condiciones de exposición a la luz durante los ensayos y en los procesos de extracciones y análisis de los pigmentos.

Otro de los motivos de fluctuación en la acumulación de carotenoides en los diferentes tiempos registrados durante los cultivos pudo ser el papel antioxidante que tienen estos compuestos en las células, variando su concentración en función del estrés oxidativo, de la luz, o de la necesidad de dirigir el flujo de carbono hacia otras rutas metabólicas. En un estudio con *R. glutinis*, la concentración de carotenoides sufrió variaciones según la relación C/N y según la presencia o no de glucosa en el medio. A relaciones C/N 20-50, se consumió toda la glucosa y se estimuló la formación de carotenoides mientras que a una C/N 70-100 se favoreció la acumulación de lípidos frente a la biosíntesis de carotenoides. En cambio, se determinó que los niveles de ácido oleico disminuyeron drásticamente tras agotarse la glucosa del medio. Esto podría estar relacionado con la obtención de carotenoides a partir del precursor acetil-CoA proveniente de la degradación de los lípidos intracelulares (Tkáčová y col., 2017).

Una situación similar podría estar ocurriendo en los estudios realizados, cuyos resultados están reflejados en la Figura 4.22, donde se ha podido potenciar la acumulación lipídica frente a la síntesis de carotenoides conforme se han ido incrementando las relaciones C/N al incorporarse los pulsos. Sin embargo, al consumirse por completo toda la glucosa del medio antes de los pulsos y al final de los ensayos, las células podrían haber empleado lípidos intracelulares para metabolizar el acetil-CoA resultante de la degradación de los lípidos en carotenoides y por ello no se verían fluctuaciones muy drásticas en las concentraciones de estos últimos.

Saini y col. (2021) alcanzaron una acumulación de lípidos del 43 % con la levadura *R. toruloides* 1588 y una estrategia *fed-batch*, utilizando hidrolizado de madera no detoxificado a una relación C/N 70. Estos autores reportaron además un consumo superior al 95 % y al 70 % de los azúcares glucosa y xilosa, respectivamente. Los ensayos realizados en esta Tesis mostraron un mayor porcentaje de acumulación de lípidos (56 %) con la cepa *R. toruloides* ATCC 204091 siguiendo una estrategia *fed-batch* con pulsos de medio HPA, observándose además un consumo total de glucosa y de más de un 60 % de la xilosa.

Tinción Rojo de Nilo

La producción de lípidos durante los cultivos también se monitorizó mediante la visualización de *R. toruloides* ATCC 204091 por microscopía de fluorescencia con el

Resultados y Discusión

tinte fluorescente Rojo de Nilo. Para ello se tomaron muestras antes de cada pulso de HPO y HPA y al final de cada ensayo. Con este procedimiento fue posible el seguimiento visual de la producción de lípidos con la estrategia *fed-batch*, observándose el incremento en la intensidad lumínica a medida que la relación C/N se iba incrementando en los medios. En la Figura 4.24 puede observarse como a mayor tiempo de cultivo (mayor relación C/N) la fluorescencia emitida por la muestra fue mayor. En su mayor parte, la fluorescencia fue intracelular, ya que se tiñeron lípidos de reserva (TAGs) que se acumulan en vesículas o cuerpos lipídicos. Maza y col. (2020) también utilizaron este método de microscopía de fluorescencia con tinción Rojo de Nilo para confirmar la presencia de cuerpos lipídicos en las cepas de levaduras *R. glutinis* R4 y *R. toruloides* Y-1091, usando *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 32051 como control negativo. Estos autores lograron una emisión de color amarillo dorado sólo en las cepas de levaduras oleaginosas estudiadas, confirmando la acumulación de lípidos neutros intracelulares.

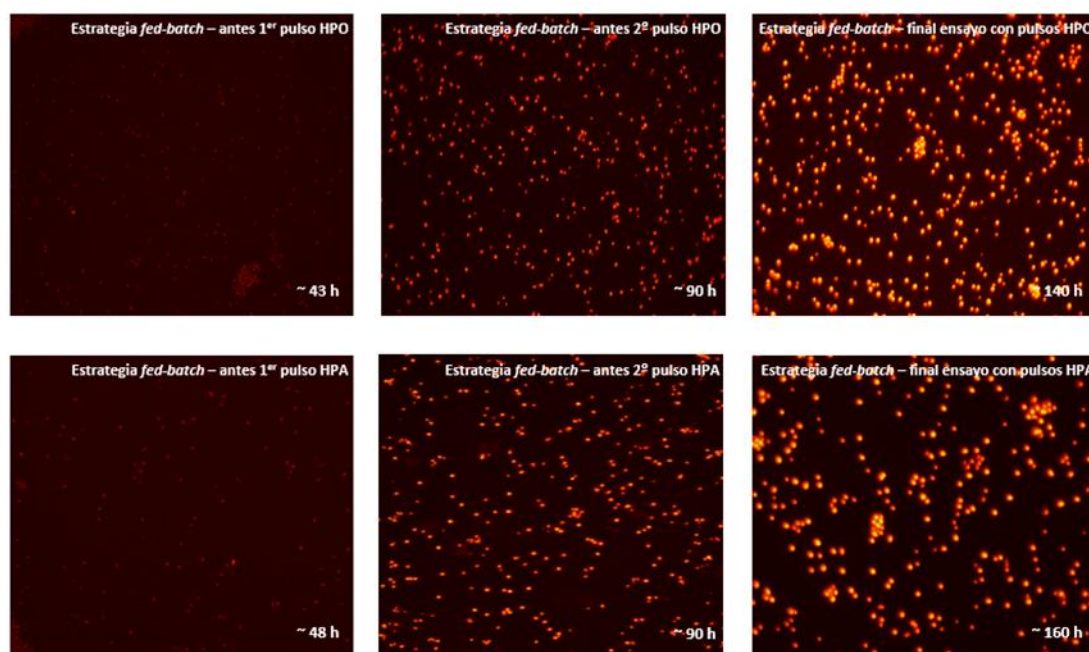


Figura 4.24. Evolución de la acumulación lipídica en los cultivos de *R. toruloides* ATCC 204091 siguiendo una estrategia *fed-batch* con pulsos HPO (Imágenes superiores) y pulsos HPA (Imágenes inferiores).

4.6.2. Estrategia de cultivo batch en dos etapas en medio derivado de destrío y de HPO o HPA

Con el objetivo de comparar el potencial de producción de aceite microbiano con diferentes configuraciones de proceso, la levadura *R. toruloides* ATCC 204091 se cultivó

posteriormente siguiendo una estrategia de proceso *batch* en dos etapas utilizando los mismos medios descritos con anterioridad (medio derivado de pimiento de destrío como medio de crecimiento de la levadura, y medio HPO o HPA para favorecer la acumulación de lípidos). Esta estrategia, se diferencia de la estrategia *batch* de una etapa en que mantiene las relaciones C/N altas al cambiar las células de un medio a otro tras el agotamiento de las fuentes de carbono durante la primera etapa (Saini y col., 2021).

i) Cultivo en dos etapas: Medio de destrío y medio HPO

En la primera etapa, se creció a *R. toruloides* ATCC 204091 en el medio derivado de destrío de pimiento (relación C/N 15), hasta agotar las fuentes de carbono. Después, en una segunda etapa, la biomasa celular generada se recuperó por centrifugación y se inoculó al medio HPO (C/N 40) para favorecer la acumulación lipídica debido a la mayor relación C/N. El ensayo se completó cuando se agotaron las fuentes de carbono.

ii) Cultivo en dos etapas: Medio de destrío y medio HPA

La cepa *R. toruloides* ATCC 204091 se cultivó en una primera etapa en el medio derivado de destrío de pimiento (C/N 15). En la segunda etapa del cultivo en *batch*, la biomasa celular se recuperó por centrifugación y se inoculó en medio HPA. La relación C/N del medio HPA se determinó en 135. Además, el medio HPA presentó una mayor concentración de carbono en comparación con el medio HPO y una menor cantidad de nitrógeno. En el medio HPA se determinó una concentración de nitrógeno unas tres veces menor que la del medio HPO, 0,2 g/L de nitrógeno total *Kjeldahl* frente a 0,6 g/L, respectivamente.

La Figura 4.25 recoge los resultados del consumo de azúcares, el crecimiento celular y el cambio de un medio a otro durante la estrategia *batch* en dos etapas aplicada a los cultivos A) medio destrío y medio HPO y B) medio destrío y medio HPA. Al igual que ocurrió con los cultivos en modo *fed-batch*, *R. toruloides* presentó una fase de latencia de al menos 24 h a partir de la cual empezó a registrar incremento en la concentración celular. La biomasa celular final alcanzada en las últimas etapas en *batch* de ambos estudios fue en torno a 50 g/L. El consumo de las fuentes de carbono del medio de destrío de pimiento,

Resultados y Discusión

fructosa y glucosa, fue del 100 % en un máximo de tiempo de 48 h en ambos casos. Sin embargo, en la segunda etapa en medio HPO, la glucosa se consumió en menos de 24 h, correspondiéndose con menos de 4 días del proceso general completo; mientras que en la segunda etapa en medio HPA se necesitó más de 24 h (completando 4 días de cultivo entre ambas etapas) para consumir la glucosa y la xilosa del medio como muestra la Figura 4.25.

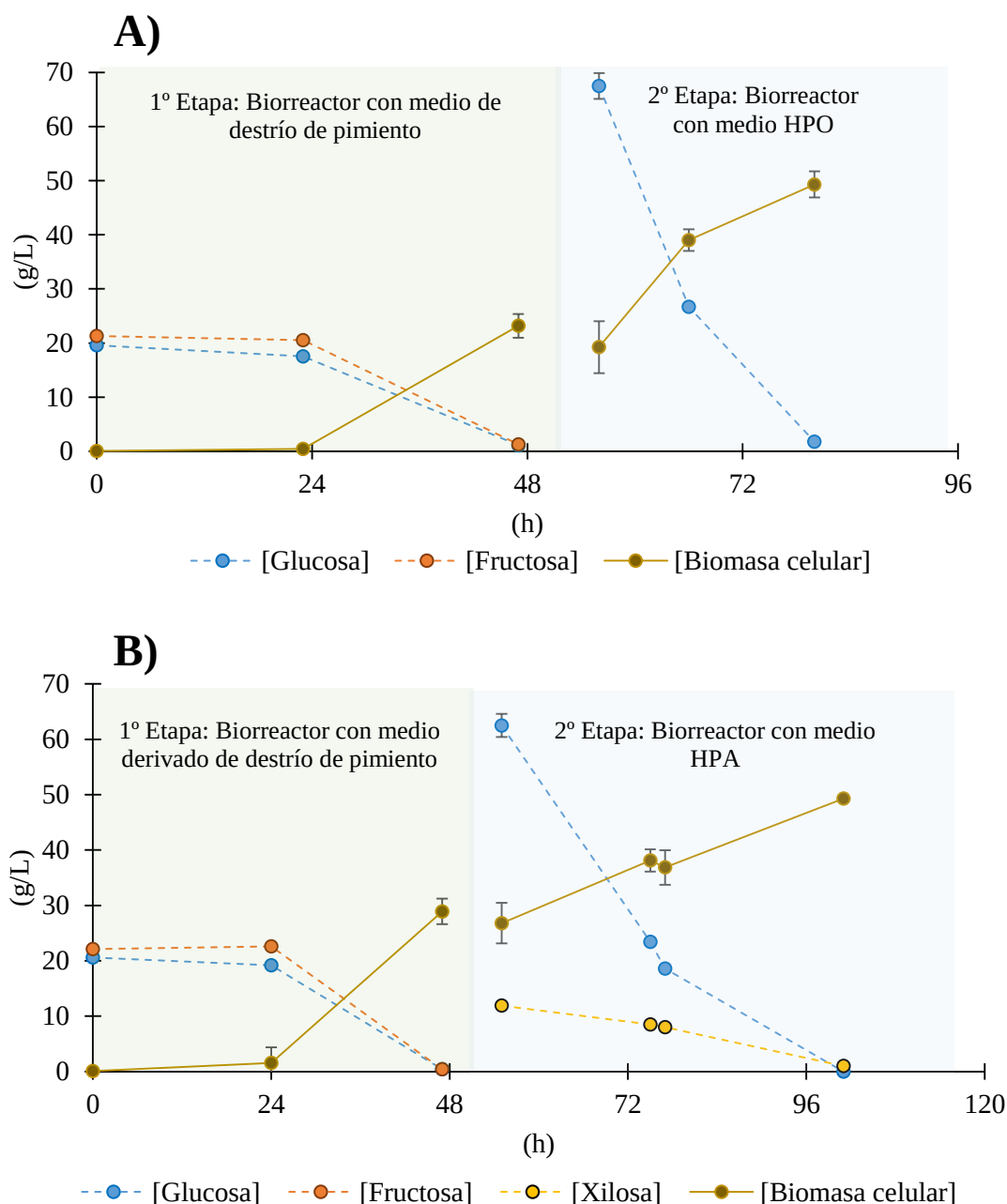


Figura 4.25. Consumo de azúcares y crecimiento de la biomasa celular por *R. toruloides* ATCC 204091 en dos etapas. Primera etapa: cultivo en batch en medio derivado de destrío de pimienta a relación C/N 15. Segunda etapa: cultivo en batch en medio HPO A) a relación C/N 40 o en medio HPA B) a relación C/N 135.

Viabilidad celular

Durante los cultivos en *batch* en dos etapas, como se observa en la Figura 4.26 los valores de viabilidad se redujeron tras inocular las células en el medio de acumulación (HPO o HPA), al igual que se observó durante las estrategias *fed-batch*.

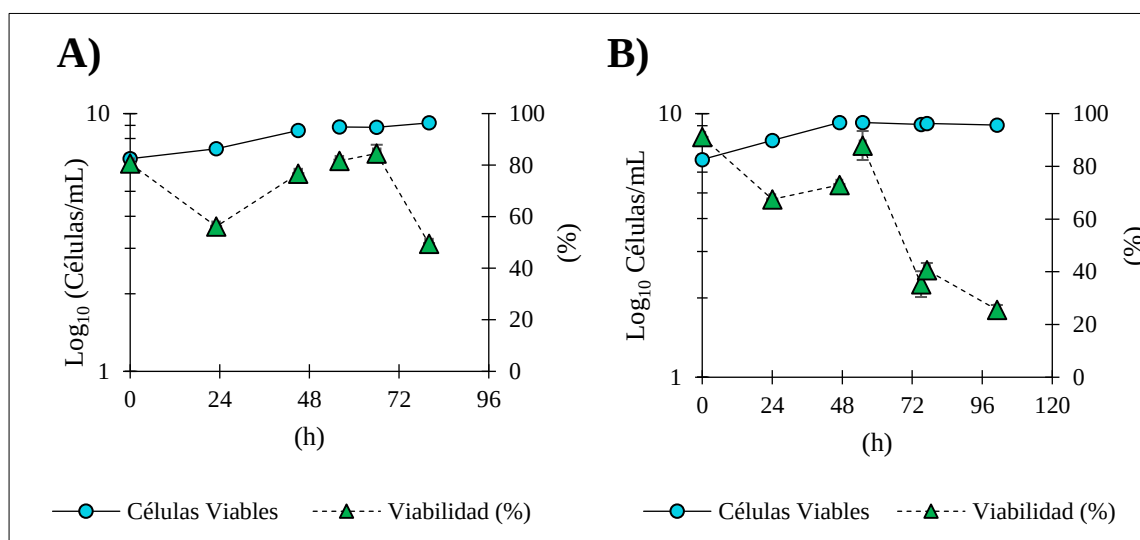


Figura 4.26. Porcentaje de viabilidad celular y células viables por mL (Log₁₀ células/mL) de los cultivos realizados en una primera etapa en medio derivado de destrío de pimienta y en una segunda etapa en medio HPO A) y HPA B). La interrupción entre los puntos representados indica el cambio de medio de cultivo.

Acumulación de lípidos y carotenoides

Una vez finalizados los cultivos se procedió a la determinación de lípidos totales acumulados, el porcentaje de estos correspondiente a ácidos grasos derivados de TAGs y los carotenoides totales acumulados. En la Tabla 4.14 se recogen los porcentajes de lípidos totales y ácidos grasos junto con los µg de carotenoides totales por g de célula seca.

Resultados y Discusión

Tabla 4.14. Porcentajes de lípidos totales y de ácidos grasos derivados de TAGs y de contenido de carotenoides totales acumulados por la levadura *R. toruloides* ATCC 204091 cultivada en batch en dos etapas (medio derivado de destrío de pimienta y medio HPO o HPA, respectivamente).

ESTRATEGIA DE CULTIVO BATCH EN DOS ETAPAS				
1 ^{er} etapa: Cultivo en medio de destrío	2 ^o etapa: Cultivo en medio HPO	Lípidos totales (%) (p/p)	Ácidos grasos (%) (p/p)	Carotenoides totales (µg/g)*
Inicio cultivo	-	8,5±1,5	-	1043,5±1,0
-	Final	27,4±0,6	24,7±0,6	1142,1±1,2
1 ^{er} etapa: Cultivo en medio de destrío	2 ^o etapa: Cultivo en medio HPA	Lípidos totales (%) (p/p)	Ácidos grasos (%) (p/p)	Carotenoides totales (µg/g)*
Inicio cultivo	-	8,5±1,5	-	969,6±2,1
-	Final	42,2±1,7	38,3±0,6	1140,4±3,7

(*): µg de carotenoides por g de células secas

En estos estudios se observan diferencias notables en la acumulación de lípidos totales y de ácidos grasos, al contrario de lo que ocurrió en los estudios aplicando la estrategia *fed-batch* por pulsos. En la estrategia con medio HPA se superó el 40 % (p/p) de acumulación lipídica, en cambio en la estrategia con medio HPO no se llegó al 30 % (p/p) de lípidos totales. Este resultado podría estar motivado por las diferencias en las relaciones C/N (40 vs. 135) y a la mayor concentración en nitrógeno (0,6 g/L vs. 0,2 g/L) del medio HPO, lo que pudo no ser limitación suficiente para fomentar la acumulación lipídica.

Otros compuestos, como el ácido acético, no se tuvieron en cuenta como fuentes de carbono en este estudio, ya que sólo se estudiaron fuentes de carbono azucaradas y los rendimientos se calcularon en base a éstas. Aun así, el medio HPA presentaba al menos 10 g/L de ácido acético, por lo que pudo ser usado como fuente de carbono por la levadura. Huang y col. (2016) demostraron que levaduras de esta especie, como *R. toruloides* AS 2.1389, pueden crecer usando ácido acético (hasta una concentración de 20 g/L) como única fuente de carbono, obteniendo un buen crecimiento y acumulación de lípidos. Por lo tanto, las levaduras crecidas en la estrategia con medio HPA podrían haberse visto beneficiadas por este compuesto para la acumulación lipídica respecto a las crecidas en la estrategia en la que se utilizó medio HPO.

Por otro lado, se observó una misma concentración de carotenoides totales por g de células secas, independientemente del medio utilizado para la estrategia en *batch* en dos etapas, observándose un total aproximado de 1,1 mg/g células secas.

4.6.3. Perfiles de ácidos grasos y carotenoides

El perfil de ácidos grasos y de carotenoides se determinó en cada uno de los cultivos realizados con *R. toruloides* ATCC 204091. Las Figuras 4.27 y 4.28 recogen estos datos, respectivamente.

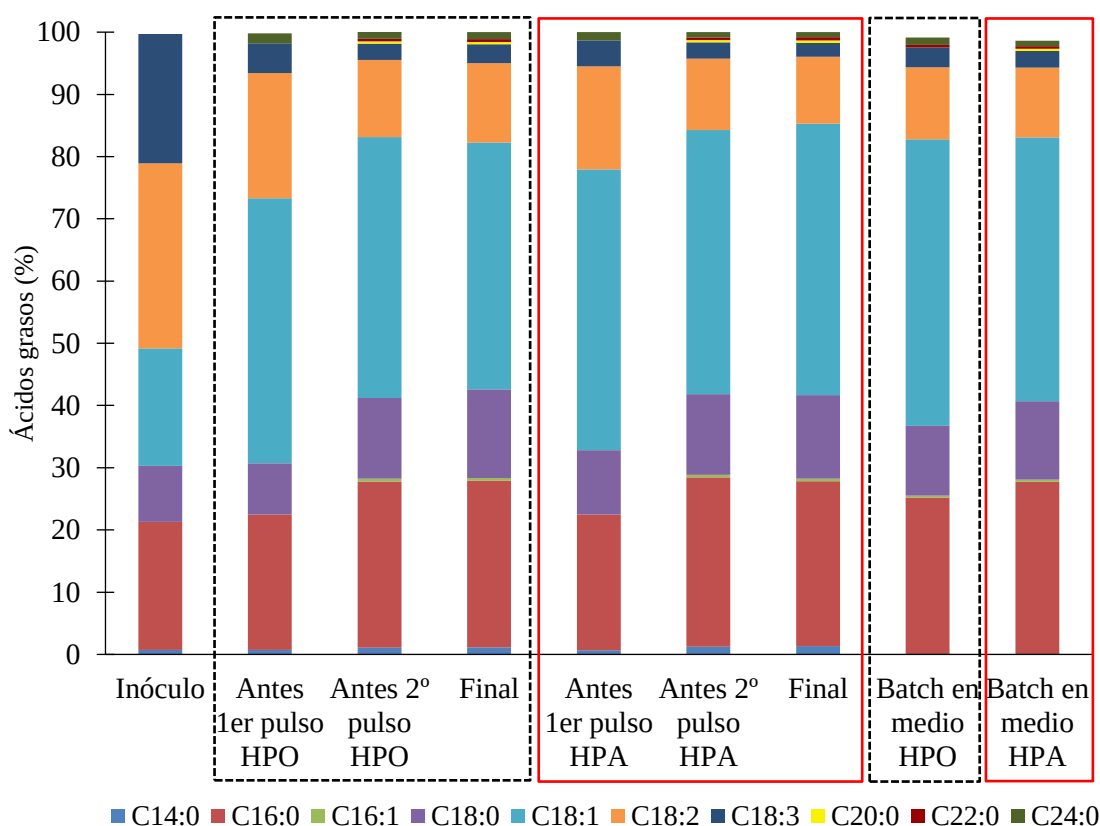


Figura 4.27. Comparación del perfil de ácidos grasos de *R. toruloides* ATCC 204091 crecida en medio YPD (inóculo) y crecida en destrío siguiendo las estrategias fed-batch usando pulsos HPO y HPA y batch en dos etapas usando medio HPO y HPA para acumular lípidos. En línea discontinua negra: ensayos con HPO; en línea roja: ensayos con HPA.

Respecto al perfil del inóculo (0 h), *R. toruloides* presentó un reparto similar entre los ácidos grasos palmítico (C16:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3), seguidos de los minoritarios esteárico (C18:0) y mirístico (C14:0). Este reparto entre ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados en *R. toruloides* se debe a que, entre las fracciones de lípidos, las de fosfolípidos y glicolípidos más

Resultados y Discusión

esfingolípidos presentan mayor contenido en ácidos grasos insaturados respecto a la de lípidos neutros (Papanikolaou y col., 2017) y el contenido en ácidos grasos antes de la acumulación de reservas lipídicas, presenta diferentes grados de insaturación.

Sin embargo, a lo largo de los cultivos y mientras tiene lugar la acumulación lipídica, se pudo observar un cambio de tendencia en este perfil. El ácido oleico y palmítico se observaron en mayor proporción, seguido del ácido linoleico y esteárico. A medida que aumentó el porcentaje de lípidos se vieron reducidos los ácidos grasos linoleico y linolénico, apareciendo nuevos ácidos en el perfil de acumulación entre los que se encuentran el ácido palmitoleico (C16:1), el ácido araquídico (C20:0), el ácido behénico (C22:0) y el ácido lignocérico (C24:0) (Patel y col., 2017). No obstante, estos últimos ácidos grasos representaron un porcentaje por debajo del 2 % respecto al total. El ácido mirístico (C14:0) sólo se identificó al inicio del cultivo y en los cultivos en modo *fed-batch*.

El perfil obtenido al final de las estrategias *fed-batch* fue muy parecido al obtenido en las estrategias *batch*, por lo que se puede deducir que el medio de cultivo y la estrategia aplicada tienen un impacto bajo en el perfil lipídico en estas experiencias, salvo en lo relativo a los ácidos grasos minoritarios como el ácido mirístico (C14:0), ácido araquídico (C20:0) y el ácido lignocérico (C24:0). Sin embargo, otros autores han obtenido resultados diferentes. En el estudio realizado con *R. toruloides* NRRL Y-27012 y *R. kratochvilovae* FMCC Y-43 se encontró que el perfil de ácidos grasos variaba según la composición del medio (melaza de caña de azúcar con y sin adición de una fuente externa de nitrógeno, sales de fosfato y oligoelementos) y según la fuente de carbono. Aun así, los ácidos grasos mayoritarios fueron el ácido oleico con valores entre 40,2-63,4 % y el ácido palmítico con valores entre 20,9-32,4 % (Boviatsi y col., 2020).

Como se observó durante los ensayos con *C. curvatus* CL6032, la composición del medio puede influir en el perfil de ácidos grasos en general, pero los ácidos grasos predominantes suelen ser los mismos, al igual que la ruta de síntesis de lípidos en la acumulación de TAGs, que tiene un flujo de formación de compuestos semejante como se mencionó en el apartado 4.4.2 y como se recoge en la Figura i del Glosario, lográndose tras la acumulación un alto contenido de ácido oleico y palmítico apto para la síntesis de biodiésel (Maza y col., 2020).

Tkáčová y col. (2017) observaron que los ácidos grasos mayoritarios en *R. glutinis* originariamente son el ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) y ácido linolénico (C18:3). Sin embargo, a altas relaciones C/N esta levadura acumula de forma mayoritaria el ácido oleico, al igual que se ha observado para *R. toruloides* en esta Tesis. Uno de los motivos que podría explicar la acumulación de ácido oleico en mayores proporciones es su rápida utilización por parte de la célula en ausencia de una fuente externa de carbono a través del proceso de β -oxidación de ácidos grasos. Esta hipótesis está respaldada por el hecho de que tras el agotamiento de la fuente de carbono en los cultivos con *R. glutinis*, se observó un rápido descenso de los niveles de ácido oleico (Tkáčová y col., 2017).

Kolouchová y col. (2016) observaron que las levaduras oleaginosas *Y. lipolytica*, *R. glutinis*, *Trichosporon cutaneum* y *Candida sp.*, mostraron una disminución en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados a partir de una relación C/N de 30. En las levaduras *Y. lipolytica* y *T. cutaneum* se observó que a medida que disminuía el perfil de ácidos grasos poliinsaturados crecía el de saturados, en cambio, en las levaduras *R. glutinis* y *Candida sp.* el perfil de ácidos grasos saturados descendía al igual que los ácidos grasos poliinsaturados. La acumulación de ácidos grasos monoinsaturados se vio, en general, favorecida por esta relación C/N, siendo el ácido graso más representativo el ácido oleico.

La aparición de nuevos ácidos grasos saturados como el ácido lignocérico (C24:0) y la predominancia de ácidos grasos con una sola insaturación o saturados (ácido oleico (C18:1) y palmítico (C16:0)), tienen lugar de forma general durante la producción/acumulación de lípidos neutros en levaduras oleaginosas (véanse Figura i y Figura ii del Glosario).

Con respecto a los carotenoides, la Figura 4.28 muestra una comparativa del perfil de carotenoides entre las diferentes estrategias de cultivo y los diferentes medios empleados. Los terpenos principales que se identificaron fueron los siguientes: toruleno, torularodina, γ -caroteno y β -caroteno, pudiéndose clasificar todos ellos dentro de la categoría de carotenos, excepto la torularodina que pertenece al grupo de las xantofilas (Kot y col., 2018) (Figura 4.29).

Resultados y Discusión

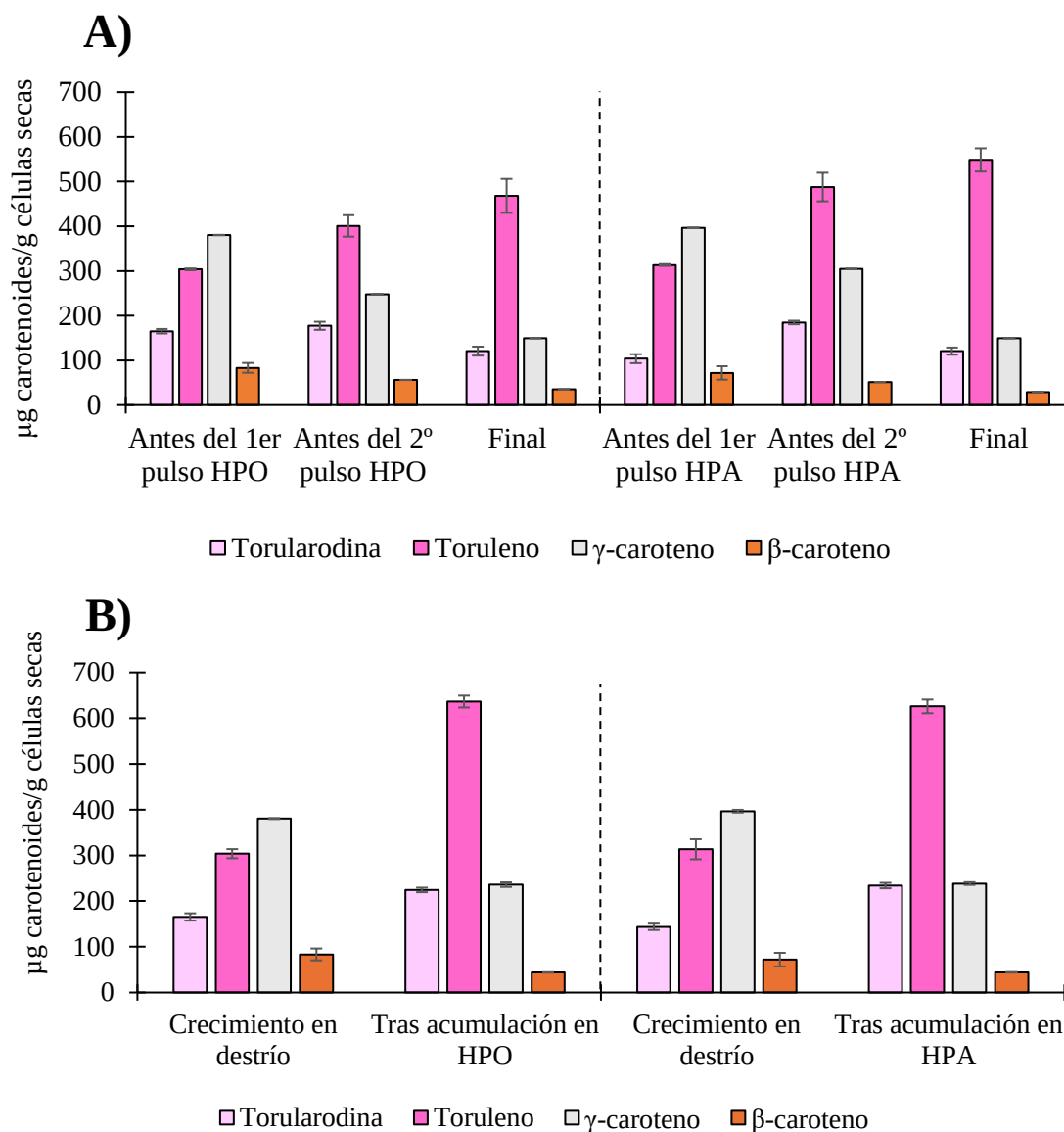


Figura 4.28. Comparación del perfil de carotenoides acumulado durante las estrategias fed-batch A) usando medio derivado de destrío de pimienta y pulsos HPO y HPA y batch en dos etapas B) usando medio derivado de destrío de pimienta para crecer y medio HPO y HPA para acumular lípidos.

De forma general, el toruleno fue el carotenoide mayoritario al final de los cultivos, seguido del γ -caroteno, la torularodina y el β -caroteno. El perfil de estos compuestos fue variando a lo largo de los procesos. De esta manera, el β -caroteno y el γ -caroteno fueron disminuyendo en concentración a lo largo del cultivo, mientras que el toruleno se fue acumulando. Por su parte, la torularodina no mostró una tendencia clara, observándose unas concentraciones finales parecidas al γ -caroteno. El β -caroteno fue

disminuyendo a medida que avanzaban las experiencias ya que la síntesis de carotenoides a partir del γ -caroteno se dirigió sobre todo a la producción de toruleno (Figura 4.29).

El γ -caroteno también puede ser precursor de la plectanixantina, una xantofila determinada en este estudio, pero a una concentración muy baja, por lo que no se tuvo en cuenta como producto final. Madhour y col. (2005) observaron en la levadura roja *Dioszegia* sp. que una aireación reducida puede suprimir la biosíntesis de plectanixantina, acumulándose γ -caroteno. Esto puede ser indicativo del papel antioxidante de la plectanixantina, como ocurre en otras levaduras de los géneros *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cystofilobasidium*, etc. (Ávalos y Limón, 2017) que aumentan el contenido de torularodina o astaxantina frente al estrés oxidativo.

Los cultivos llevados a cabo en este estudio con *R. toruloides* ATCC 204091 dirigieron la ruta de carotenogénesis (Zoz y col., 2015) principalmente hacia la producción de toruleno a partir de γ -caroteno, como se ha comentado anteriormente (Figura 4.28), siendo este pigmento uno de los responsables del color rojo rosado característico de la levadura de estudio (Smith, 2000; Kot y col., 2018). Los valores de toruleno alcanzados en esta Tesis se encontraron en un rango de 460-640 $\mu\text{g/g}$ peso seco, alcanzando el valor más alto (636,3 $\mu\text{g/g}$ peso seco) con el medio HPO y una estrategia de cultivo en *batch* en dos etapas. La menor acumulación fue registrada con este mismo medio siguiendo la estrategia *fed-batch*, llegando a obtenerse al final del ensayo un máximo de 468,0 $\mu\text{g/g}$ peso seco de toruleno. Las concentraciones de toruleno alcanzadas en esta Tesis son ligeramente superiores a las obtenidas por Qi y col. (2020) con la cepa mutante *R. toruloides* RM18, que alcanzó un máximo de 501 μg de toruleno por g peso seco.

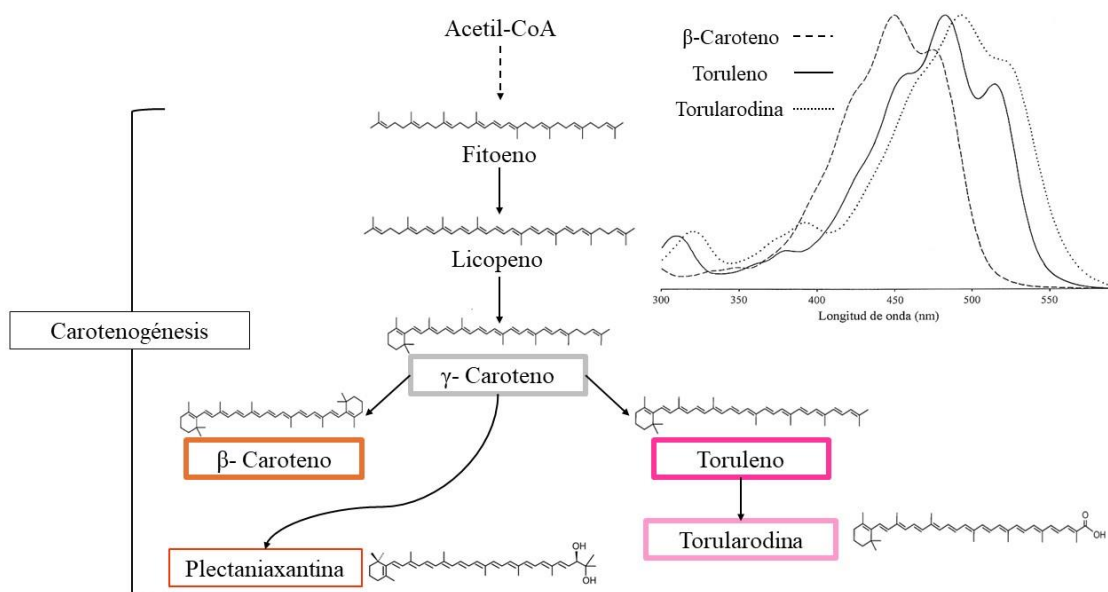


Figura 4.29. Ruta simplificada de producción de los carotenoides γ -caroteno, β -caroteno, toruleno y torularodina desde el precursor o molécula base acetil-CoA. Resaltados en cuadros de color se destacan los carotenoides obtenidos principalmente en el perfil final de *R. toruloides* ATCC 204091 de este estudio. También se muestran los espectros de absorción de los principales pigmentos, empleándose en este estudio una curva patrón de β -caroteno para cuantificar los carotenoides acumulados.

4.6.4. Concentración lipídica y rendimientos en los distintos cultivos realizados

Tras el estudio con la cepa *R. toruloides* ATCC 204091 crecida en el medio de pimiento de destrío y siguiendo diferentes estrategias de acumulación, *fed-batch* y *batch* en dos etapas, empleando residuos de HPO y HPA, se calcularon la producción de lípidos (g/L), el rendimiento de lípidos (g lípidos/g azúcar consumido) y el rendimiento en peso seco celular (g células secas/g azúcar consumido) al final de los ensayos. Estos datos se reflejan a continuación en la Tabla 4.15.

Tabla 4.15. Concentración de lípidos y rendimientos de lípidos y peso seco celular de la levadura de *R. toruloides* ATCC 204091 crecida en medio de pimienta de destrío y siguiendo diferentes estrategias de acumulación, fed-batch y batch en dos etapas, usando pulsos HPO o HPA y medio HPO o HPA, respectivamente

CONCENTRACIÓN Y RENDIMIENTOS					
MEDIO DESTRÍO	Estrategia <i>Fed-Batch</i>	C/N	Concentración lípidos (g/L)	Rendimiento lípidos (g/g) ^a	Rendimiento peso seco celular (g/g) ^b
PIMIENTO (C/N 15)	Pulsos HPO	46	35,1±0,01	0,21±0,001	0,41±0,03
	Pulsos HPA	140	33,4±0,03	0,22±0,001	0,50±0,01
	Estrategia <i>Batch</i>	C/N	Concentración lípidos (g/L)	Rendimiento lípidos (g/g) ^a	Rendimiento peso seco celular (g/g) ^b
	Medio HPO	40	13,5±0,02	0,18±0,002	0,46±0,01
	Medio HPA	135	20,9±0,1	0,22±0,003	0,35±0,02

^a: g de lípidos por g de azúcar consumido; ^b: g de células secas por g de azúcar consumido

Los mejores resultados en términos de concentración de lípidos y de rendimientos se observaron en la estrategia *fed-batch*. Por otro lado, el medio HPA fue el que presentó generalmente mejores resultados. El medio HPA contenía ácido acético lo que lo diferencia del medio HPO que contenía ácido cítrico. La presencia de ácido acético pudo beneficiar la acumulación de estos bio-productos ya que se puede emplear como fuente de carbono por *R. toruloides*. Las levaduras oleaginosas son capaces de asimilar el ácido acético a acetil-CoA, que puede emplearse en el ciclo de Krebs o como precursor de ácidos grasos y carotenoides, entre otras funciones. El exceso de acetato en los medios podría impulsar el flujo de carbono hacia los ácidos grasos y la acumulación de lípidos tras convertirlo en acetil-CoA (Qin y col., 2017).

En la estrategia *fed-batch* con pulsos de medio HPA se obtuvo un rendimiento de lípidos de 0,22 g/g, un rendimiento de peso seco celular de 0,5 g/g y una concentración de lípidos de 33,4 g/L. Por lo general, en comparación con otras estrategias, la estrategia en *fed-batch* permite alcanzar concentraciones superiores de lípidos y de biomasa celular, lo cual es de suma importancia durante los procesos de producción de aceite microbiano puesto que las tasas de producción y concentración tienen un papel fundamental en el precio final del producto (Lopes y col., 2020).

El rendimiento teórico para la producción de TAG a partir de glucosa se ha estimado en 0,58 Cmol TAG/Cmol glucosa, empleando herramientas de predicción y cálculos de rendimientos sobre el mapa metabólico de *R. toruloides* (Bommareddy y col.,

Resultados y Discusión

2015; Castañeda y col., 2017). Este rendimiento equivale a 0,3 g TAG/g glucosa, fijando como referencia de TAG a la molécula formada por tres ácidos palmíticos y el glicerol 3-fosfato. También se ha reportado un rendimiento máximo teórico de 0,32 g/g, teniendo en cuenta la conversión de 1 mol de glucosa en 2 moles de acetil-CoA y considerando el uso de todo el acetil-CoA en la ruta de síntesis de lípidos (Papanikolaou y Aggelis, 2011a; Caporusso y col., 2021).

El rendimiento alcanzado de 0,22 g/g en algunos de los ensayos con *R. toruloides* ATCC 204091 se sitúa por tanto en torno al 69 % del teórico, mientras que el rendimiento máximo alcanzado con *C. curvatus* (0,16 g/g) en ensayos anteriores fue del 50 %. Bommarreddy y col. (2015) observaron un rendimiento experimental de 0,15 g/g usando *R. toruloides* en medio de glucosa y condiciones limitantes de nitrógeno. Este rendimiento aumentó hasta 0,17 g/g al cultivar *R. toruloides* en un hidrolizado de biomasa más glicerol (glucosa:xilosa:glicerol = 10:20:30).

Cabe resaltar que las pequeñas variaciones encontradas en las relaciones C/N entre los medios HPO y HPA utilizados en la estrategia en *fed-batch* y la estrategia en *batch* de dos etapas, se deben a que los medios utilizados en la estrategia por pulsos se concentraron previamente para poder aportar una concentración de glucosa final al biorreactor de 50-55 g/L. Durante la etapa de concentración por evaporación, el medio pudo sufrir alteraciones en la relación C/N y verse influenciado por otros compuestos presentes en el cultivo no determinados.

Respecto a la coproducción de lípidos y carotenoides, la Figura 4.30 representa gráficamente las diferencias de acumulación obtenidas de las diferentes estrategias de cultivo usando tanto residuos de HPO como de HPA.

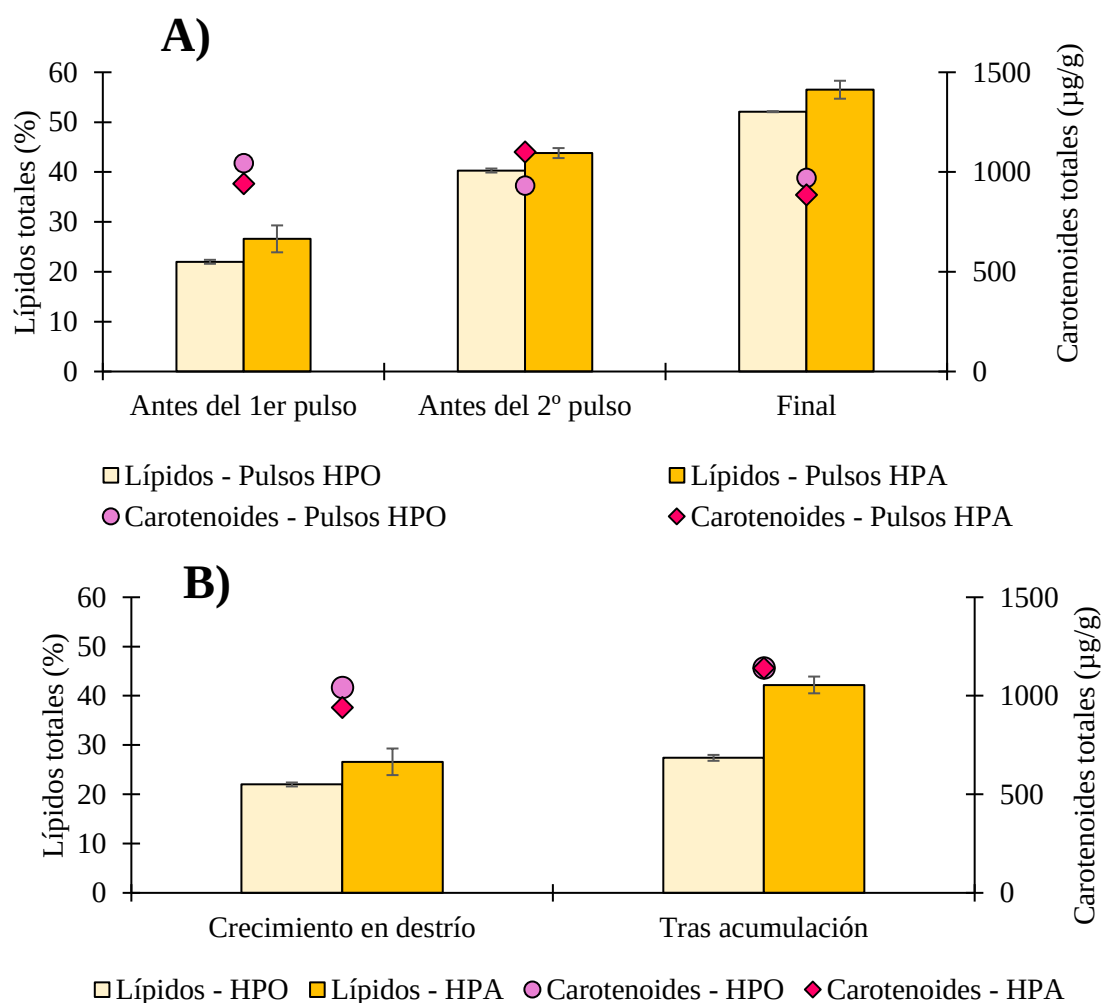


Figura 4.30. Comparación de porcentajes de lípidos acumulados (g/100 g peso seco celular) y carotenoides totales (µg/g peso seco celular) en la levadura *R. toruloides* ATCC 204091 crecida en medio de pimienta de destrío y siguiendo diferentes estrategias de acumulación, A) fed-batch usando pulsos de medio HPO o HPA y B) batch en dos etapas, usando medio HPO o medio HPA.

Como puede observarse en la Figura 4.30, *R. toruloides* mostró de forma general mayores porcentajes de acumulación lipídica y de carotenoides con el residuo de HPA. El porcentaje de lípidos alcanzado fue de 42 % y de 56 % en el modo *batch* en dos etapas y en el modo *fed-batch* con pulsos de HPA, respectivamente. Las diferencias entre los diferentes modos de operación observadas podrían deberse a la falta de optimización de las condiciones de cultivo en el modo *batch* en dos etapas. Nair y Sivakumar (2022) desarrollaron un modelo para optimizar la producción de biomasa celular y de lípidos en *R. toruloides* DSM 4444 utilizando un hidrolizado de papel de oficina como medio de cultivo y siguiendo una estrategia en *batch*. La optimización del proceso se llevó a cabo a través de un diseño de superficie de respuesta *Box-Behnken*, considerando como

Resultados y Discusión

parámetros principales la relación C/N, el tiempo de fermentación y el volumen de inóculo. Mediante este modelo, el cultivo de *R. toruloides* DSM 4444 alcanzó un contenido intracelular de lípidos del 58 % (p/p) tras 116 h de cultivo, utilizando una concentración de inóculo inicial del 9,67 % (v/v) y una relación C/N del medio de 60.

Con respecto a la producción de carotenoides, al contrario que los resultados de acumulación lipídica, se obtuvieron mayores concentraciones durante los cultivos en modo *batch* en dos etapas con más de 1,1 mg de carotenoides/g biomasa celular seca. Estos resultados fueron similares a los obtenidos (1,5 mg/g) por Qi y col. (2020) utilizando un hidrolizado de residuos de té y la levadura *R. toruloides* ACCC20341. Estos valores de acumulación de carotenoides podrían mejorarse mediante la modificación genética de las cepas productoras. Qi y col. (2020) obtuvieron el mutante *R. toruloides* RM18 tras someter la cepa ACCC20341 a mutagénesis con una técnica de radio frecuencia a presión atmosférica (*Atmospheric and Room-Temperature Plasma*) y un proceso posterior de evolución adaptativa en un hidrolizado de residuos de té. Este mutante RM18 aumentó la concentración intracelular de carotenos en un 50 % con respecto a la cepa parental ACCC20341.

Cabe destacar que en la estrategia *fed-batch* no se observó una tendencia clara en la acumulación de carotenoides a lo largo del proceso y la concentración fue variando en función del punto del cultivo muestreado. Esto pudo deberse a las variaciones en la composición del medio como se comentó con anterioridad, generándose un mayor o menor estrés en las células y haciendo que se promueva en mayor o menor medida la síntesis de carotenoides, ya que estos juegan un papel esencial en la protección frente al estrés oxidativo y otras condiciones ambientales desfavorables (Li y col., 2017).

Un futuro análisis tecno-económico como el llevado a cabo con *C. curvatus* CL6032 cultivada en destrío de pimiento, podría mostrar el potencial de usar residuos agrícolas junto con residuos lignocelulósicos o celulósicos para el cultivo de levaduras oleaginosas rojas, como *R. toruloides* ATCC 204091. Este tipo de análisis permite evaluar el impacto de las diferentes etapas del proceso en términos económicos, evaluando a su vez los recursos empleados y los rendimientos de la planta en estudio. La importancia de usar residuos como materias primas para aportarles un valor, a la vez que se contribuye a la disminución de los costes de procesos, se informa también en la

bibliografía. Maza y col. (2024) en su estudio de acumulación de lípidos intracelulares en la levadura *R. glutinis* R4 cultivada en medios derivados de vinaza suplementados con glucosa, evaluaron a asimismo la sustitución de la glucosa por glicerol como estrategia de integración de las industrias del bioetanol y del biodiésel, valorizando ambos residuos agroindustriales y obteniendo un proceso más económico al reemplazar la glucosa por el glicerol.

En base a esto y en relación con el presente estudio, uno de los principales aspectos a evaluar en un nuevo análisis tecno-económico sería la sustitución de la glucosa (comercial) por azúcares derivados de los residuos de lignocelulosa o de papel, ya que cómo se demostró en el análisis tecno-económico realizado (apartado 4.4.5), la glucosa incorporada en el caso de estudio representa el 94 % del costo total de los insumos. No obstante, a este respecto es importante determinar el gasto económico del pretratamiento de las materias primas en términos energéticos, identificar los requisitos operacionales (uso de catalizadores, agua, electricidad, enzimas, etc.) y evaluar el impacto ambiental del proceso global, para poder establecer una comparativa y determinar los beneficios potenciales al usar estos residuos.

Asimismo, la coproducción de lípidos junto con carotenoides (compuestos de alto valor añadido), así como el aumento de los rendimientos y de concentración intracelular de lípidos en los cultivos de *R. toruloides* ATCC 204091 con respecto a los cultivos de *C. curvatus* CL6032, podrían representar a su vez una ventaja económica en referencia al precio mínimo de venta estimado (€/kg lípidos). Tomando como referencia el estudio sometido a análisis tecno-económico de *C. curvatus* CL6023 en destrío de pimienta con pulsos de glucosa y comparando con el estudio de *R. toruloides* ATCC 204091 en destrío de pimienta con pulsos de medio HPA, los rendimientos de lípidos por consumo de azúcar aumentaron de 0,12 g/g a 0,22 g/g, los rendimientos de biomasa celular seca por consumo de azúcar incrementaron de 0,42g/g a 0,50 g/g, la acumulación de lípidos totales mejoró del 32,7 % al 56,5 %, la acumulación de TAGs en forma de ácidos grasos aumentó del 29,2 % al 52,4 % y la concentración de lípidos se duplicó de 16,8 g/L a 33,4 g/L, respectivamente. Además, es importante destacar el posible impacto en la economía del proceso que tiene la coproducción de carotenoides, ya que un rendimiento de producción de carotenoides del 0,1 %, podría representar más del 90% de los ingresos totales en una futura planta industrial, debido al alto valor que presentan en el mercado,

Resultados y Discusión

con un precio variable entre 300 \$/kg y 3000 \$/kg dependiendo del tipo de carotenoide (Liu y col., 2021).

4.7. Cultivo de levaduras oleaginosas modificadas genéticamente en medios derivados de residuos

Tras los resultados alcanzados en este estudio, la obtención de un proceso rentable a escala industrial a partir de residuos vegetales (agrícolas y urbanos) como materias primas y el uso de levaduras oleaginosas para obtener un producto de valor en el mercado, implica, entre otros factores, mejorar los rendimientos y concentración de producto. Además, sería conveniente disminuir los costes de otras etapas como las pertenecientes al proceso “*downstream*”, por ejemplo, simplificando la extracción y separación de los compuestos. También sería interesante aplicar estrategias de cultivo más sencillas y usar materias primas de fácil tratamiento para la obtención de medios de cultivos con el fin de mejorar los beneficios económicos y simplificar el esquema de proceso de una futura planta. Con este objetivo, en la presente Tesis se llevaron a cabo estudios en *batch* (una etapa) con levaduras oleaginosas modificadas genéticamente, de forma que se pudiese potenciar la producción de un compuesto deseado y de alto valor para alcanzar mejores resultados de producción y rendimientos; así como aplicar el uso de estrategias de cultivo más sencillas y de menos tiempo de ejecución. Estos estudios se llevaron a cabo con diferentes cepas de la levadura oleaginosa *Y. lipolytica*. Esta levadura está considerada como un organismo de alto potencial biotecnológico como factoría celular, ya que puede usar una gran variedad de sustratos (hidrofílicos e hidrofóbicos), puede producir diferentes tipos de bio-productos con altos rendimientos, es un organismo robusto, seguro y de modificaciones genéticas estables, para el cual, además hay un gran conocimiento de diferentes herramientas para su manipulación genética (Abghari y Chen, 2014; Park y Ledesma-Amaro, 2023).

4.7.1. Estrategia batch en medios derivados de destríos y de HPO

Con el objetivo de aumentar la coproducción de compuestos de valor añadido durante los procesos de producción de aceite microbiano, se estudiaron las cepas de *Y. lipolytica* denominadas S114, modificada para la producción de β -caroteno (Larroude y col., 2018), S2542 (denominada también cepa JMY7019), modificada para la producción del pigmento violaceína (Kholany y col., 2020) y PHS32, modificada para la

producción del pigmento azul indigoidina (Maresca di Serracapriola y col., Artículo *enviado-Bajo revisión*). Estas cepas, además de producir los compuestos mencionados, tienen la capacidad intrínseca de acumulación de TAGs en cuerpos lipídicos. En referencia a esta capacidad de acumulación de aceite microbiano, cabe destacar que la cepa S114 se construyó a partir de una cepa “superproductora” de lípidos (denominada cepa obesa). Esta cepa obesa es capaz de acumular lípidos en torno a un 30-35 %, a la vez que produce β -caroteno intracelularmente, en condiciones de no acumulación en medio definido YPD. En las mismas condiciones de no acumulación, la cepa silvestre W29 (ATCC20460) que se empleó como cepa parental para construir la cepa final modificada genéticamente, alcanzó un contenido de aproximadamente 5 % de lípidos (Larroude y col., 2018).

En este estudio, los ensayos con las diferentes cepas modificadas genéticamente se llevaron a cabo en: 1) medio derivado de pimiento de destrío (C/N 15); 2) medio derivado de las mezclas de destríos de tomate, pepino y berenjena (C/N 15); y 3) medio HPO (C/N 55). Además, a efectos comparativos, estas cepas microbianas también se cultivaron en medios definidos que simulaban la composición y concentración de los principales componentes (azúcares, ácidos orgánicos y nitrógeno) de cada medio de estudio.

i) Cultivo de las cepas productoras de β -caroteno y violaceína

En las gráficas 4.31 y 4.32 se recogen los resultados del crecimiento de las cepas de *Y. lipolytica* S114 (A) y S2542 (B) en los diferentes medios de estudio.

Resultados y Discusión

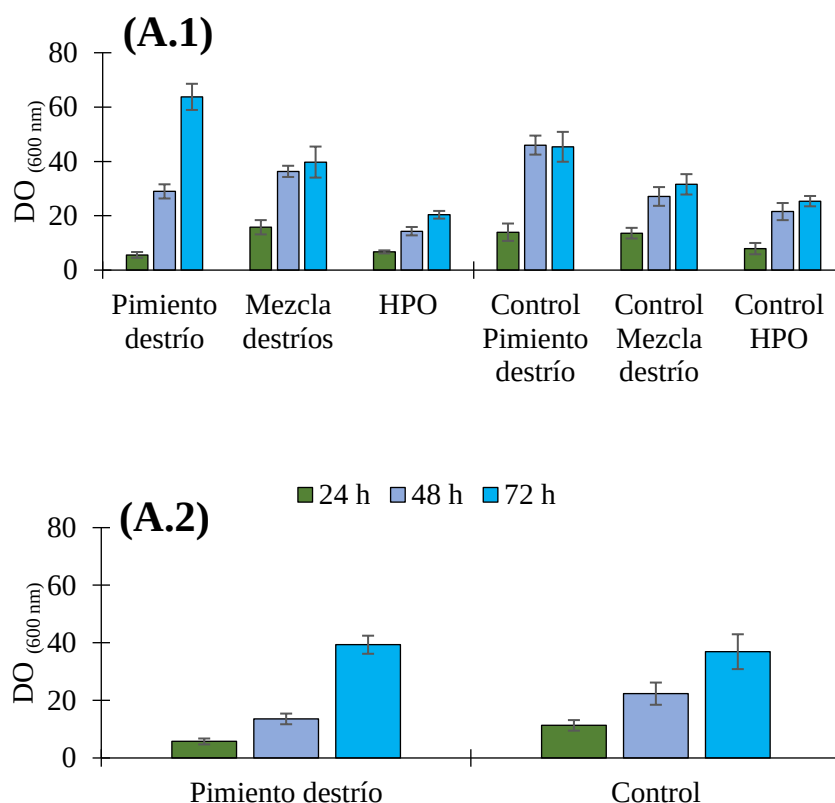


Figura 4.31. (A.1) DO_{600nm} de *Y. lipolytica* S114 crecida en los distintos medios de estudio (derivados de residuos y controles) usando placa de cultivo de 48 pocillos. (A.2) DO_{600nm} de *Y. lipolytica* S114 crecida en matraz Erlenmeyer con medio de pimiento junto con el respectivo medio control.

Teniendo en cuenta el crecimiento de la levadura en los diferentes medios de cultivo estudiados en placa de cultivo de 48 pocillos, el medio derivado del pimiento de destrío fue el que permitió alcanzar una mayor concentración celular en términos de DO_{600nm} , independientemente de la cepa utilizada. Estas condiciones se ensayaron a su vez en matraces sin hendiduras usando 20 mL de medio, observándose unos valores menores de DO_{600nm} , probablemente motivado por una menor oxigenación de los cultivos (Rakicka y col., 2015).

El medio HPO fue el que presentó los resultados más bajos de densidad óptica. El menor crecimiento en este medio podría deberse a la diferencia de composición de nutrientes respecto a las FL de los destríos. Por ejemplo, los medios obtenidos a partir de destríos pueden presentar compuestos antioxidantes propios de estos residuos como los carotenoides, así como otro tipo de nutrientes, vitaminas, etc. que pudieron influir positivamente en el crecimiento celular. En este sentido, la menor concentración de nitrógeno y otros nutrientes en el medio HPO, también pudo influir en el metabolismo celular resultando en un menor crecimiento celular (Kolouchová y col., 2016).

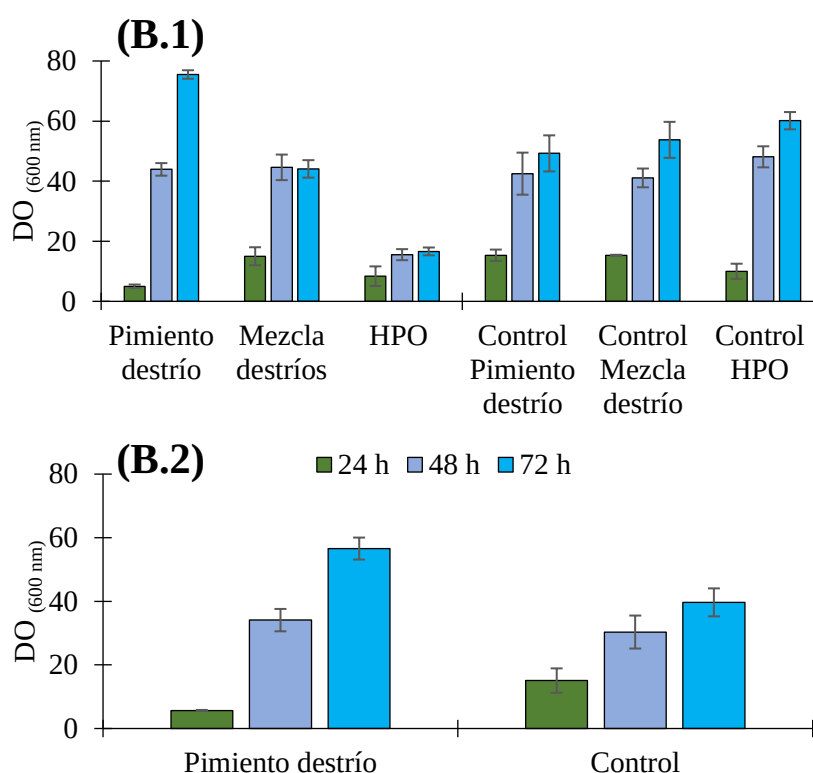


Figura 4.32. (B.1) DO_{600nm} de *Y. lipolytica* S2542 crecida en los distintos medios de estudio (derivados de residuos y controles) usando placa de cultivo de 48 pocillos. (B.2) DO_{600nm} de *Y. lipolytica* S2542 crecida en matraz Erlenmeyer con medio de pimiento junto con el respectivo medio control.

ii) Cultivo de la cepa productora de indigoidina

El seguimiento del crecimiento de la cepa *Y. lipolytica* PHS32 (C) se llevó a cabo mediante el análisis del peso seco celular al final del cultivo (72 h), ya que la presencia del pigmento azul interfiere en la medida espectrofotométrica para determinar la densidad óptica del cultivo. La Figura 4.33 recoge la concentración de biomasa celular obtenida al final de cada cultivo en los medios derivados de residuos y en los controles de medio definido.

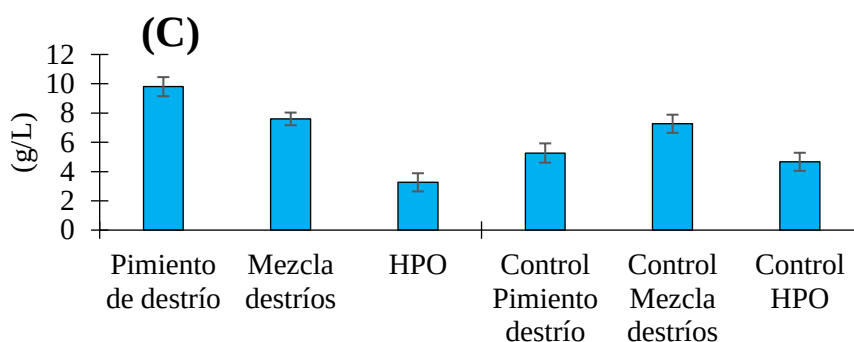


Figura 4.33. Biomasa seca celular de *Y. lipolytica* PHS32 (C) crecida en los distintos medios de estudio (derivados de residuos y controles) usando matraces Erlenmeyer.

Al igual que en los ensayos anteriores con las cepas S114 y S2542, *Y. lipolytica* PHS32 alcanzó una mayor concentración celular en el medio de pimiento de destrío, seguido del medio derivado de la mezcla de destríos. En el medio de HPO es donde se obtuvieron los resultados de peso seco más bajos.

4.7.2. Determinación de la concentración de los diferentes productos (β -caroteno, violaceína e indigoidina)

Además del seguimiento del crecimiento durante los cultivos, también se evaluó la producción de los compuestos deseados en los diferentes medios. Las Figuras 4.34, 4.35 y 4.36 muestran las concentraciones de β -caroteno, violaceína e indigoidina extraídos, respectivamente, de las diferentes cepas al final de los cultivos en los medios correspondientes.

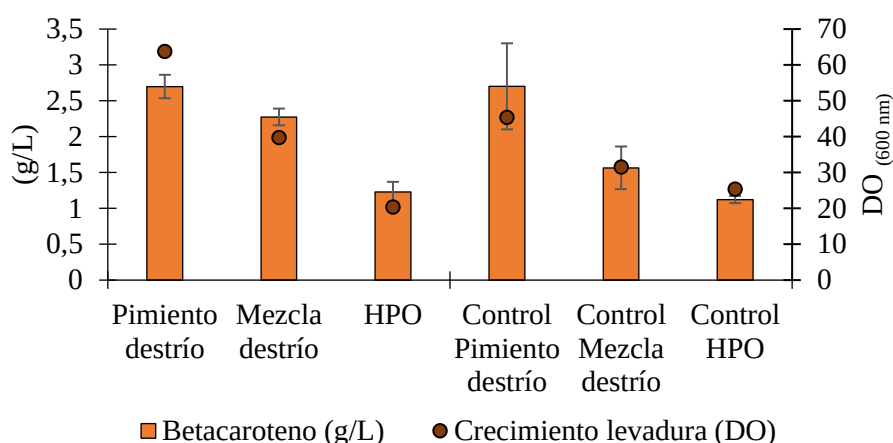


Figura 4.34. Concentración de β -caroteno y DO_{600nm} tras del cultivo de *Y. lipolytica* S114 en diferentes medios.

La mayor concentración de β -caroteno se observó en el medio de pimiento de destrío seguido del de mezcla de destrío, con 2,7 g/L y 2,3 g/L, respectivamente. El medio de HPO fue en el que se registró la concentración más baja de β -caroteno por parte de *Y. lipolytica* S114, con una media de 1,2 g/L. En comparación con los medios definidos, las concentraciones de los productos de interés en los medios de destríos fueron similares o incluso superiores. Este resultado destaca la riqueza de nutrientes de los medios de destríos y el potencial de uso de estos medios para el crecimiento de cepas modificadas genéticamente para maximizar la producción de compuestos de interés industrial. Asimismo, se destaca el potencial de utilizar *Y. lipolytica* como factoría celular para la obtención de pigmentos, sumándose a la lista de productos de valor (lípidos intracelulares, ácido cítrico, manitol) estudiados con anterioridad (Silverman y col., 2016; Qin y col., 2017).

Resultados y Discusión

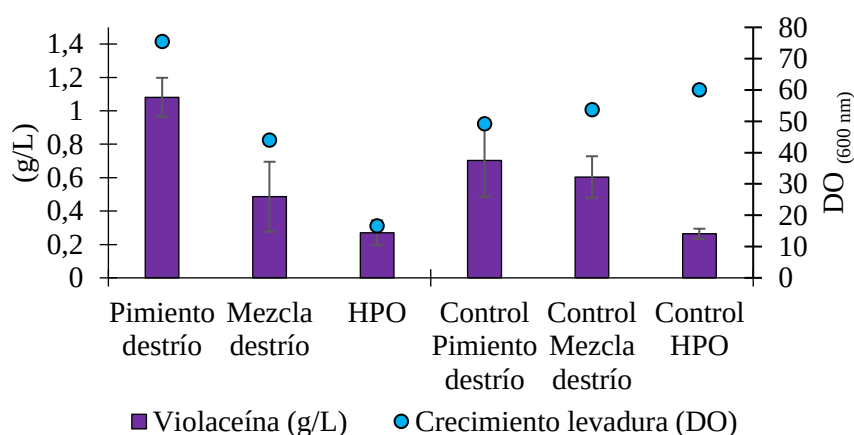


Figura 4.35. Concentración de violaceína y DO_{600nm} tras del cultivo de *Y. lipolytica* S2542 en diferentes medios.

El cultivo de *Y. lipolytica* S2542 en medio de pimiento de destrío también registró la concentración más alta de violaceína, con más de 1 g/L (Figura 4.35). Le siguió la concentración obtenida en el medio derivado de mezclas de destríos y en último lugar la obtenida en el medio de HPO, con valores de 0,5 y 0,3 g/L, respectivamente.

Kholany y col. (2020) reportaron una concentración de 0,13 g/L de violaceína con la levadura *Y. lipolytica* JMY7019, utilizando como medio de cultivo medio mínimo YNB enriquecido con glucosa (30 g/L), extracto de levadura (0,5 g/L) y peptona (0,5 G/L) y suplementado con triptófano (25 mg/L). Los resultados obtenidos en los cultivos con medio derivado de destríos y medio HPO fueron superiores a los obtenidos por estos autores, alcanzándose en los estudios de esta Tesis concentraciones de violaceína de entre 0,3 y 1,1 g/L, poniendo de manifiesto el gran potencial que tienen estos residuos como materias primas para el cultivo de levaduras oleaginosas modificadas genéticamente.

Al igual que en los casos anteriores, el cultivo de *Y. lipolytica* PHS32 en medio derivado del pimiento de destrío permitió alcanzar mayores concentraciones de indigoidina, con un valor medio de 5,4 g/L (Figura 4.36). Sin embargo, al contrario que en los estudios anteriores, la concentración de indigoidina obtenida en medio HPO fue superior a la alcanzada con la mezcla de destríos (4,4 g/L vs. 2,7 g/L). Teniendo en cuenta que la concentración celular en el medio de HPO fue inferior a la alcanzada con la mezcla de destríos, los rendimientos de producto por cantidad de biomasa celular son por tanto muy superiores en el medio HPO. Esto pone de manifiesto la necesidad de llevar a cabo

ensayos adicionales que permitan identificar las condiciones y/o los componentes que están beneficiando la producción de indigoidina en estos cultivos.

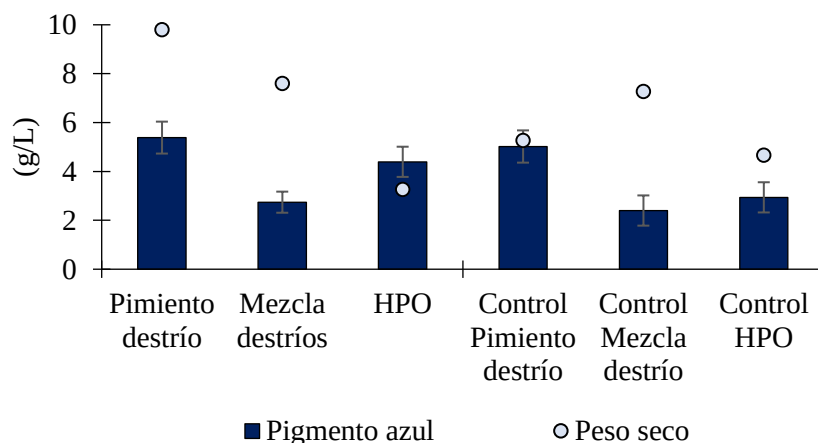


Figura 4.36. Concentración de indigoidina y peso seco celular de *Y. lipolytica* PHS32 tras el cultivo en diferentes medios.

Comparación de diferentes métodos de extracción de β -caroteno en la levadura *Y. lipolytica* S114

Con el objetivo de poder comparar los resultados de acumulación de carotenoides obtenidos en esta Tesis con la levadura *R. toruloides* ATCC 204091 y con la levadura *Y. lipolytica* S114 modificada genéticamente para producir β -caroteno, se estudió a esta última cepa, en matraces Erlenmeyer con hendiduras con un volumen final de 200 mL de medio derivado de pimienta de destrío, aplicando tras el cultivo el mismo protocolo de extracción y cuantificación de carotenoides que el usado con *R. toruloides* ATCC 204091 en ensayos anteriores. La Figura 4.37 recoge el crecimiento de la cepa cultivada en el medio derivado de pimienta de destrío.

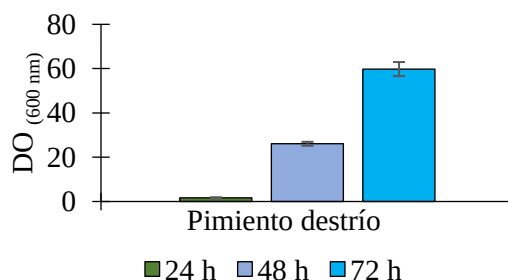


Figura 4.37. DO_{600nm} de *Y. lipolytica* S114 cultivada en el medio derivado de destrío de pimienta en matraces Erlenmeyer

Resultados y Discusión

El crecimiento celular fue similar al de los cultivos llevados a cabo en placas de cultivo de 48 pocillos usando esta cepa y este medio derivado de pimiento de destrío. Se alcanzó un mayor crecimiento que en el ensayo en el que se utilizaron matraces Erlenmeyer sin hendiduras, por lo que la presencia de hendiduras en los matraces aportaría una mejor oxigenación en el medio que pudo influir en un mejor crecimiento celular.

La Figura 4.38 muestra la concentración de β -caroteno obtenido durante los cultivos con 200 mL de medio. Además, se muestran los mg de β -caroteno por g de célula seca, para poder comparar los resultados con los obtenidos durante los cultivos con *R. toruloides* ATTC204091.

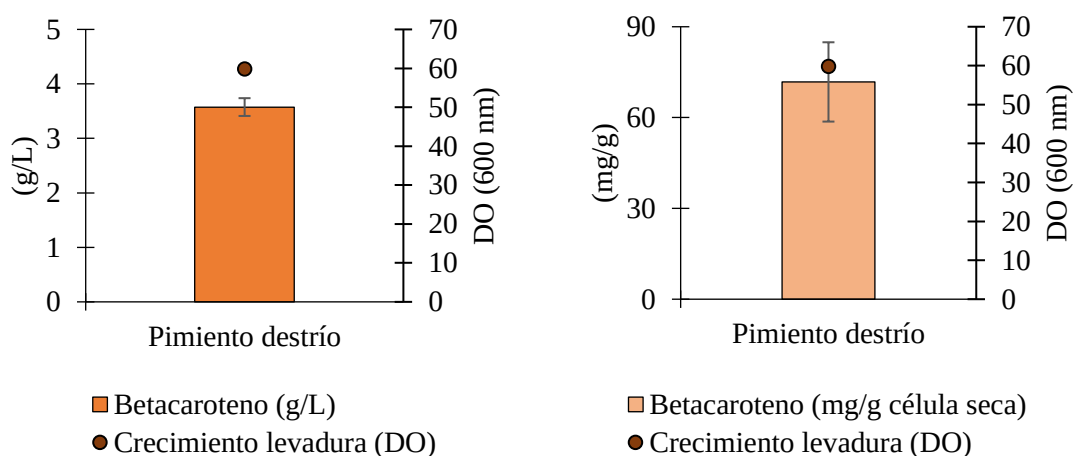


Figura 4.38. Concentración de β -caroteno (g/L) y β -caroteno total obtenido (mg/g)* tras el cultivo de *Y. lipolytica* S114 en medio derivado de pimiento de destrío. *(mg de β -caroteno/g de célula seca).

La concentración final de β -caroteno fue de 3,6 g/L, algo superior a la obtenida en los trabajos en matraces sin hendiduras (menor oxigenación del medio). Estas diferencias podrían deberse también a la interacción entre los diferentes flujos metabólicos (como la producción de lípidos) como se mencionó con anterioridad (Tkáčová y col., 2017). En este caso, se observó un contenido lipídico intracelular del 38 %. En función de los flujos metabólicos, los porcentajes de acumulación lipídica y las concentraciones del pigmento pueden variar en favor de uno u otro producto. Con respecto a los mg de pigmento por g de célula seca, en las condiciones estudiadas se han alcanzado más de 70 mg/g (Figura 4.38), superando de forma muy significativa los valores obtenidos con *R. toruloides* ATCC 204091 (véase Tabla 4.14).

Utilizando la cepa *Y. lipolytica* S114, Larroude y col. (2018) obtuvieron en medio sintético (20 g/L extracto de levaduras, 40 g/L peptona, 6 g/h glucosa en pulsos) una concentración de β -caroteno de 6,5 g/L (equivalentes a 89,6 mg del pigmento/g de célula seca) y 40 g/L de lípidos tras 122 h de cultivo y siguiendo una estrategia *fed-batch*. Este resultado pone de manifiesto el potencial de mejora para la producción de aceite microbiano y β -caroteno utilizando esta cepa y optimizando las condiciones de cultivo (Gonçalves y col., 2014; Lv y col., 2020), al igual que se observó con la levadura *R. toruloides* ATCC204091 en ensayos anteriores.

Aun así, hay que destacar que el empleo en este estudio de una estrategia de cultivo en *batch* con un tiempo de cultivo de 72 h, ha mostrado resultados muy prometedores al utilizar medios de cultivo derivados de residuos hortofrutícolas y cepas microbianas capaces de producir compuestos de alto valor añadido. Respecto a esto último, cabe destacar que levaduras modificadas como las utilizadas en este estudio, pueden disponer de la maquinaria necesaria para la síntesis de compuestos relevantes, además de acumular TAGs. La cepa S114 de *Y. lipolytica* alcanzó un contenido de lípidos similar al reportado en la literatura en condiciones de no acumulación, y sin modificar la relación C/N inicial del medio derivado del pimiento de destrío, pudiéndose sintetizar tanto lípidos como, en este caso, β -caroteno, en organismos seguros y con gran potencial biotecnológico.

4.7.3. Producción de manitol con las cepas modificadas de *Y. lipolytica*

Otro bio-producto de valor añadido que puede obtenerse durante los cultivos con diferentes cepas de *Y. lipolytica* es el manitol. En este contexto, se llevó a cabo un seguimiento de la producción de manitol durante el cultivo de las cepas S114 y S2542 en medio derivado de pimiento de destrío. La Figura 4.39 muestra la acumulación de manitol durante los cultivos de S114 y S2542. Como se puede observar, las concentraciones de manitol alcanzaron la concentración máxima al final del cultivo con valores de 1,1 g/L y 8,3 g/L para las cepas S114 y S2542, respectivamente.

La menor concentración de manitol se observó durante los cultivos de la cepa S114 modificada para producir β -caroteno. Por su parte, la concentración más alta de manitol se observó en la cepa S2542, modificada genéticamente para la producción de violaceína. Este dato podría motivar la menor concentración de violaceína observada en

Resultados y Discusión

los ensayos anteriores, en comparación con la concentración de β -caroteno alcanzada por la cepa S114 (2,7 g/L de β -caroteno vs. 1,1 g/L de violaceína) (Figura 4.34 y 4.35).

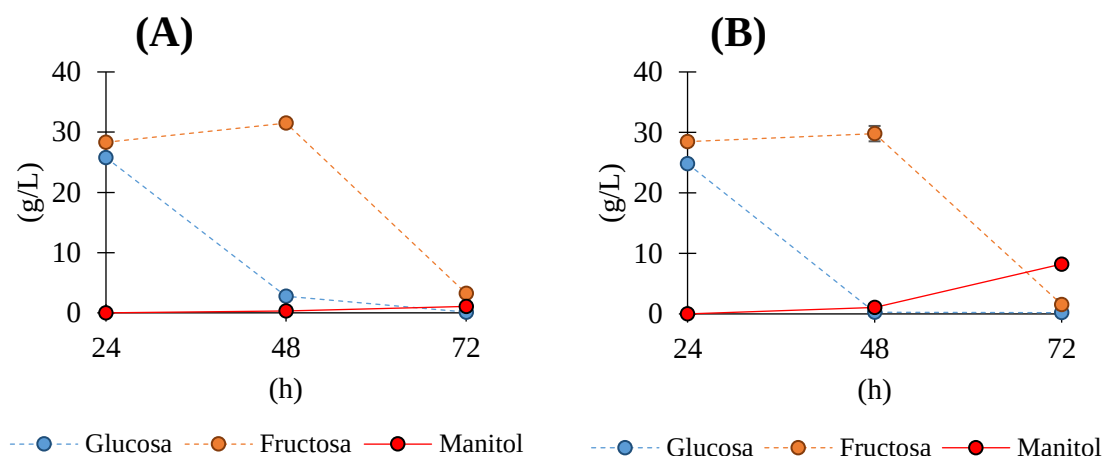


Figura 4.39. Determinación de manitol en los medios de cultivo derivados de pimienta de destrío con la cepa *Y. lipolytica* productora de β -caroteno (A) y la cepa productora de violaceína (B).

La menor concentración de manitol en la cepa S114, podría deberse a la capacidad antioxidante del β -caroteno, evitando la necesidad de síntesis de compuestos alternativos con propiedades protectoras como el manitol (Chen y col., 2020).

4.8. Número de cetano como indicador de calidad del perfil lipídico para producir biodiésel

Por último, ya que el objetivo general de la presente Tesis es la producción de aceite microbiano en forma de TAGs a partir de residuos para su destino final como biocombustible (biodiésel), se tuvo en cuenta el perfil obtenido de ácidos grasos derivados de TAGs de todos los estudios con *C. curvatus* CL6032 y *R. toruloides* ATCC 204091 para calcular una de las propiedades que tendría el biodiésel logrado a partir de estos.

El perfil de ácidos grasos obtenido, en todas las estrategias estudiadas, fue muy similar al de los aceites vegetales que hoy en día se utilizan como biodiésel de primera y segunda generación (cultivos de plantas oleaginosas y aceites de cocina usados, respectivamente) (Galafassi y col., 2012). Conociendo el perfil de ácidos grasos se pueden calcular algunas de las propiedades del biodiésel resultante en función de esta composición, como el número de cetano (CetN). El CetN es una medida que informa

sobre la calidad de la combustión e ignición de los combustibles. La Tabla 4.16 muestra los diferentes valores de CetN estimados en función de los diferentes perfiles de ácidos grasos determinados en esta Tesis.

Tabla 4.16. Número de cetano (CetN) según el perfil de ácidos grasos derivados de TAGs logrados en los estudios con las levaduras oleaginosas *C. curvatus* CL6032 y *R. toruloides* ATCC 204091 cultivadas en medios derivados de residuos agrícolas y urbanos.

Estrategias con <i>C. curvatus</i> CL6032	Número de cetano
<i>Fed-batch</i> en medio de Tomate + Pulsos glucosa	59,7±0,6
<i>Fed-batch</i> en medio de Pimiento + Pulsos glucosa	60,1±0,4
<i>Fed-batch</i> en medio de Sandía + Pulsos glucosa	59,9±0,2
Estrategias con <i>R. toruloides</i> ATCC 204091	Número de cetano
<i>Fed-batch</i> en medio de Pimiento + Pulsos HPO	61,3±0,1
<i>Fed-batch</i> en medio de Pimiento + Pulsos HPA	61,6±0,1
<i>Batch</i> en dos etapas 1º Pimiento y 2º HPO	60,2±0,4
<i>Batch</i> en dos etapas 1º Pimiento y 2º HPA	61,2±0,5

Los valores de CetN estimados para las diferentes estrategias de cultivo se encuentran en un rango entre 59,7 y 61,6. Estos valores se encuentran dentro de los mínimos recomendados según la normativa de biodiésel de la Unión Europea EN 14214, la normativa de biodiésel de Estados Unidos de América ASTM D6751 y la normativa de biodiésel de la India IS 15607, siendo el límite mínimo 51, 47 y 51, respectivamente (Saran y col., 2017). Los aceites vegetales como el de palma y el de oliva utilizados en la producción actual de biodiésel (UNE-EN 14214 (EN Biodiesel Standards)) tienen un CetN de 61 y 57, respectivamente (Ramos y col., 2009). Por lo tanto, el perfil de ácidos grasos derivados de TAGs que presentó tanto *C. curvatus* como *R. toruloides* en todas las estrategias de cultivo cumpliría con la normativa actual para la obtención de biodiésel para su uso como combustible.



5. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS

5.1. Conclusiones

1. Los medios derivados de destríos presentan una composición adecuada en nutrientes para la generación de biomasa celular de las levaduras oleaginosas estudiadas. La fracción líquida derivada del destrío de pimiento presentó una composición y concentración de compuestos como azúcares, ácidos como el cítrico, nitrógeno orgánico, entre otros, que la convierten en un sustrato muy apropiado para el cultivo de las levaduras oleaginosas *Cryptococcus curvatus* CL6032, *Cutaneotrichosporon curvatum* NRRL-Y-1511, *Rhodosporidium (Rhodotorula) toruloides* ATCC 204091 y las cepas de este estudio de *Yarrowia lipolytica* modificadas genéticamente.
2. A través de la valorización de residuos agrícolas como los destríos y de naturaleza lignocelulósica como la poda urbana y el papel de rechazo, se pueden generar medios azucarados para el crecimiento de levaduras oleaginosas bajo diferentes estrategias de cultivos (*fed-batch* (por pulsos) y *batch* en dos etapas) sin la necesidad de adición externa de nutrientes.
3. El manitol producido y secretado durante los cultivos con la levadura *C. curvatus* CL6032 puede tener un papel protector frente al estrés oxidativo como consecuencia de la formación de especies reactivas de oxígeno que afectarían a las células. Asimismo, este compuesto tiene un papel importante en el equilibrio redox y en la protección frente al estrés generado por la escasez de elementos como el nitrógeno, pudiendo ser un mecanismo de competencia por la fuente de carbono ante otros microorganismos, ya que *C. curvatus* puede emplear el manitol como sustrato para el crecimiento y la acumulación de triacilglicéridos (TAGs).
4. El hidrolizado enzimático del residuo de poda urbana pretratado (HPO) y del papel no reciclado pretratado (HPA) representan un medio adecuado para la acumulación de aceite microbiano en forma de TAGs.
5. La composición del medio de cultivo puede afectar al perfil de ácidos grasos derivados de TAGs, siendo en todos los casos de estudio el ácido oleico (C18:1)

Conclusiones

y ácido palmítico (C16:0) los predominantes. El perfil obtenido con las levaduras *C. curvatus* CL6032 y *R. toruloides* ATCC 204091 presenta una composición similar a la del perfil de algunos aceites vegetales empleados en la producción de biocombustibles como el biodiésel, cumpliendo con los rangos en cuanto al índice o número de cetano impuestos en las normativas de biodiésel de la Unión Europea, EE.UU. e India.

6. Los ácidos grasos minoritarios tras la acumulación, como el ácido mirístico (C14:0), el ácido araquídico (C20:0), el ácido behénico (C22:0) y el ácido lignocérico (C24:0), presentan una mayor variación en su proporción dependiendo de la levadura oleaginosa usada, de la estrategia de cultivo aplicada, de la composición del medio y de la duración del proceso fermentativo.
7. La levadura *C. curvatus* CL6032 consume de forma secuencial la glucosa y la fructosa, aumentando la tasa de consumo de esta última con el agotamiento de la glucosa; sin embargo, *R. toruloides* ATCC 204091 tiene un consumo simultáneo de glucosa y fructosa y un consumo secuencial en presencia de glucosa y xilosa, con preferencia de consumo de glucosa.
8. La producción de toruleno por *R. toruloides* ATCC 204091 cultivada en los medios derivados de destrío de pimienta, HPO y HPA, se ve favorecida frente a la de β -caroteno, usándose el mismo precursor, γ -caroteno.
9. Una alta relación C/N favorece la acumulación de lípidos frente a la acumulación de carotenoides, cuya concentración se mantiene más o menos constante durante los cultivos estudiados.
10. Las cepas de *Y. lipolytica* S114, S2542 y PHS32 modificadas genéticamente para producir β -caroteno, violaceína o indigoidina, respectivamente, cultivadas en medios procedentes de destríos pueden alcanzar altas concentraciones de producto, presentando ventajas en costos, ejecución y rendimientos durante el escalado a un proceso industrial.

11. La cepa S114 de *Y. lipolytica* muestra en este estudio una buena acumulación de aceite microbiano y de β -caroteno, coproduciendo ambos compuestos tras cultivarse en medio derivado de pimienta de destrío sin modificar la relación C/N inicial que presenta este medio.
12. El enfoque de biorrefinería multiproducto ofrece ventajas desde la perspectiva tecno-económica. La coproducción de diferentes bio-productos (TAG, carotenoides, manitol, etc.) y la valorización de otros subproductos, como las proteínas y carbohidratos remanentes en el proceso, beneficia el proceso de producción de aceite microbiano utilizando levaduras oleaginosas y residuos vegetales. Además, es importante seleccionar la estrategia de cultivo adecuada en función del producto de interés y medios alternativos a la glucosa comercial, ya que es el principal insumo que influye en los costos del proceso.

5.2. Conclusions

1. Horticultural wastes are suitable feedstocks for producing culture media to grow oleaginous yeasts. In this study, the liquid fraction derived from pepper waste is rich in sugars, organic acids (such as citric acid), organic nitrogen and other compounds, representing an appropriate substrate for the cultivation of the oleaginous yeasts *Cryptococcus curvatus* CL6032, *Cutaneotrichosporon curvatum* NRRL-Y-1511, *Rhodospiridium (Rhodotorula) toruloides* ATCC 204091 and the genetically modified *Yarrowia lipolytica* strains.
2. Waste derived media, including fruit and vegetable wastes as well as lignocellulosic residues (urban pruning waste and the non-recycling paper fraction), are suitable to cultivate oleaginous yeasts under different process strategies (e.g., pulse feeding fed-batch, sequential two-batch) without the need of supplementing them with external nutrient components.
3. Mannitol produced and secreted during cultures with the yeast *C. curvatus* CL6032 may have a protective role against oxidative stress as a result of the formation of reactive oxygen species. In addition, mannitol is important during the redox balance and the tolerance against the stress generated by the depletion of elements such as nitrogen, and may be a mechanism to compete in presence of other organisms for the carbon source, since *C. curvatus* can use mannitol as substrate to grow and to produce TAGs.
4. The enzymatic hydrolysate resulting from pretreated urban pruning waste (HPO) and pretreated non-recycled paper waste (HPA) are relevant media to induce lipid accumulation in oleaginous yeasts.
5. Media composition influences the fatty acid profile, being oleic acid (C18:1) and palmitic acid (C16:0) predominant. The fatty acid profiles obtained with the yeasts *C. curvatus* CL6032 and *R. toruloides* ATCC 204091 are equivalent to vegetable oils in composition.

6. The cultivation strategy, the oleaginous yeast used, the process length and the media composition exert a higher influence in the less concentrated components from the fatty acids profile, including myristic acid (C14:0), arachidic acid (C20:0), behenic acid (C22:0) and lignoceric acid (C24:0).
7. The yeast *C. curvatus* CL6032 consumes glucose and fructose sequentially, increasing fructose consumption rates after glucose depletion; however, *R. toruloides* ATCC 204091 has simultaneous consumption of glucose and fructose and sequential consumption of glucose and xylose, with the preference for glucose against xylose.
8. *R. toruloides* ATCC 204091 favors torulene production to β -carotene, using the same precursor (γ -carotene), when cultured on media derived from pepper waste, HPO and HPA.
9. High C/N ratio favors lipids accumulation to carotenoids, whose concentration remains constant during the whole process.
10. *Y. lipolytica* strains S114, S2542 and PHS32 genetically modified to produce β -carotene, violacein or indigoidine, respectively, yield high product concentrations in media derived from horticultural waste, offering high potential to improve costs, execution and conversion yields for scaling up the process.
11. *Y. lipolytica* strain S114 is capable of accumulating microbial oil and β -carotene, using discarded pepper-derived media without the need of modifying the initial C/N ratio.
12. The multi-product biorefinery approach offers advantages from the techno-economic perspective. The co-production of different bio-products (TAGs, carotenoids, mannitol, etc.) as well as other by-products including proteins and carbohydrates benefits the microbial oil production process using oleaginous yeast and vegetal waste. In addition, it is important to select the appropriate

Conclusions

cultivation strategy based on the product of interest and alternative media to commercial glucose as it is the main input influencing in process cost.

”
“

6. REFERENCIAS

6. Referencias

- Abghari, A., Chen, S. (2014). *Yarrowia lipolytica* as an oleaginous cell factory platform for production of fatty acid-based biofuel and bioproducts. *Frontiers in Energy Research*, 2. doi: 10.3389/fenrg.2014.00021
- Adapa, P., Tabil, L., Schoenau, G. (2010). Compression characteristics of non-treated and steam-exploded barley, canola, oat, and wheat straw grinds. *Applied Engineering in Agriculture*, 26(4), 617-632. doi: <https://doi.org/10.13031/2013.32052>
- Al-Battashi, H. S., Annamalai, N., Sivakumar, N., Al-Bahry, S., Tripathi, B. N., Nguyen, Q. D., Gupta, V. K. (2019). Lignocellulosic biomass (LCB): a potential alternative biorefinery feedstock for polyhydroxyalkanoates production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 18(1), 183-205. doi: 10.1007/s11157-018-09488-4
- Al-Malah, K. I. M. (2022). *Aspen Plus : chemical engineering applications*. Second Edition ed. John Wiley & Sons Inc. Hoboken, New Jersey. 978-1-119-86869-9.
- Al Azkawi, A. S., Sivakumar, N., Al Bahry, S. (2018). Bioprocessing of cardboard waste for cellulase production. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 8(3), 597-606. doi: 10.1007/s13399-018-0309-7
- Albillos-Arenal, S., Minebois, R., Querol, A., Barrio, E. (2023). Understanding the role of GRE3 in the erythritol biosynthesis pathway in *Saccharomyces uvarum* and its implication in osmoregulation and redox homeostasis. *Microbial Biotechnology*, 16(9), 1858-1871. doi: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14313>
- Álvarez, C., Sáez, F., González, A., Ballesteros, I., Oliva, J. M., Negro, M. J. (2019). Production of xylooligosaccharides and cellulosic ethanol from steam-exploded barley straw. 73(1), 35-44. doi: doi:10.1515/hf-2018-0101
- Alvira, P., Negro, M. J., Ballesteros, I., González, A., Ballesteros, M. (2016). Steam explosion for wheat straw pretreatment for sugars production. *Bioethanol*, 2(1). doi: 10.1515/bioeth-2016-0003
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M. J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4851-4861. doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.093
- Annamalai, N., Al-Battashi, H., Al-Bahry, S., Nallusamy, S. (2018). Biorefinery production of poly-3-hydroxybutyrate using waste office paper hydrolysate as feedstock for microbial fermentation. *Journal of Biotechnology*, 265, 25-30. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.11.002>

Referencias

- Anschau, A., Xavier, M. C. A., Hernalsteens, S., Franco, T. T. (2014). Effect of feeding strategies on lipid production by *Lipomyces starkeyi*. *Bioresource Technology*, 157, 214-222. doi: 10.1016/j.biortech.2014.01.104
- Antoni, D., Zverlov, V. V., Schwarz, W. H. (2007). Biofuels from microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(1), 23-35. doi: 10.1007/s00253-007-1163-x
- Antonopoulou, I., Spanopoulos, A., Matsakas, L. (2020). Single cell oil and ethanol production by the oleaginous yeast *Trichosporon fermentans* utilizing dried sweet sorghum stalks. *Renewable Energy*, 146, 1609-1617. doi: 10.1016/j.renene.2019.07.107
- Araújo, Y. R. V., de Góis, M. L., Junior, L. M. C., Carvalho, M. (2017). Carbon footprint associated with four disposal scenarios for urban pruning waste. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(2), 1863-1868. doi: 10.1007/s11356-017-0613-y
- AspenTech. (2024). Tecnología Aspen. Productos. Aspen plus. Fecha de último acceso: 22 de mayo de 2024. Disponible en: <https://www.aspentech.com/en/products/engineering/aspen-plus>
- Ávalos, J., Limón, M. C. (2017). Capítulo 15. Biosíntesis de carotenoides en hongos (En Tapia, P. (Ed.), *Carotenoides en agroalimentación y salud*) (Terracota, SA de CV / México ed.): Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. 978-84-15413-35-6.
- Avellar, B. K., Glasser, W. G. (1998). Steam-assisted biomass fractionation. I. Process considerations and economic evaluation. *Biomass and Bioenergy*, 14(3), 205-218. doi: [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(97\)10043-5](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(97)10043-5)
- Aznar-Sánchez, J. A., Velasco-Muñoz, J. F., García-Arca, D., López-Felices, B. (2020). Identification of opportunities for applying the circular economy to intensive agriculture in Almería (South-East Spain). *Agronomy*, 10(10), 1499. doi: 10.3390/agronomy10101499
- Ballesteros, I., Negro, M. J., Oliva, J. M., Cabañas, A., Manzanares, P., Ballesteros, M. (2006). Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw (En McMillan, J. D., Adney, W. S., Mielenz, J. R., Klasson, K. T. (Eds.), *Twenty-Seventh Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*) (pp. 496-508). Totowa, NJ: Humana Press. 978-1-59745-268-7.
- Bamgboye, A. I., Hansen, A. (2008). Prediction of cetane number of biodiesel fuel from the fatty acid methyl ester (FAME) composition. *International Agrophysics*, 22, 21-29.
- Belincanta, J., Alchorne, J., Teixeira da Silva, M. (2016). The Brazilian experience with ethanol fuel: aspects of production, use, quality and distribution logistics. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 33, 1091-1102.

- Bellou, S., Triantaphyllidou, I. E., Mizerakis, P., Aggelis, G. (2016). High lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica* cultivated under double limitation of nitrogen and magnesium. *Journal of Biotechnology*, 234, 116-126. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.08.001
- Bertacchi, S., Bettiga, M., Porro, D., Branduardi, P. (2020). *Camelina sativa* meal hydrolysate as sustainable biomass for the production of carotenoids by *Rhodospiridium toruloides*. *Biotechnology for Biofuels*, 13(1), 47. doi: 10.1186/s13068-020-01682-3
- Bharathiraja, B., Sridharan, S., Sowmya, V., Yuvaraj, D., Praveenkumar, R. (2017). Microbial oil – A plausible alternate resource for food and fuel application. *Bioresource Technology*, 233, 423-432. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.006>
- Bhatia, S. K., Jagtap, S. S., Bedekar, A. A., Bhatia, R. K., Patel, A. K., Pant, D., Rajesh Banu, J., Rao, C. V., Kim, Y.-G., Yang, Y.-H. (2020). Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: Effect of key parameters, technological improvements, and challenges. *Bioresource Technology*, 300, 122724. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122724>
- Bidlack, J., Malone, M., Benson, R. (1992). Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*, 72, 51-56.
- Bisen, P. S., Sharma, A. (2013). *Introduction to Instrumentation in Life Sciences*. CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton, Florida. 9781466512405.
- Bommareddy, R. R., Sabra, W., Maheshwari, G., Zeng, A.-P. (2015). Metabolic network analysis and experimental study of lipid production in *Rhodospiridium toruloides* grown on single and mixed substrates. *Microbial Cell Factories*, 14(1). doi: 10.1186/s12934-015-0217-5
- Boviatsi, E., Papadaki, A., Efthymiou, M. N., Nychas, G. J. E., Papanikolaou, S., da Silva, J. A. C., Freire, D. M. G., Koutinas, A. (2020). Valorisation of sugarcane molasses for the production of microbial lipids via fermentation of two *Rhodospiridium* strains for enzymatic synthesis of polyol esters. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 95(2), 402-407. doi: 10.1002/jctb.5985
- Braunwald, T., Schwemmlin, L., Graeff-Hönninger, S., French, W. T., Hernandez, R., Holmes, W. E., Claupein, W. (2013). Effect of different C/N ratios on carotenoid and lipid production by *Rhodotorula glutinis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(14), 6581-6588. doi: 10.1007/s00253-013-5005-8
- Brownell, H. H., Saddler, J. N. (1987). Steam pretreatment of lignocellulosic material for enhanced enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 29(2), 228-235. doi: <https://doi.org/10.1002/bit.260290213>

Referencias

- Caporusso, A., Capece, A., De Bari, I. (2021). Oleaginous yeasts as cell factories for the sustainable production of microbial lipids by the valorization of agri-food wastes. *Fermentation*, 7(2), 50. doi:10.3390/fermentation7020050
- Cara, C., Ruiz, E., Ballesteros, I., Negro, M. J., Castro, E. (2006). Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification. *Process Biochemistry*, 41(2), 423-429. doi: 10.1016/j.procbio.2005.07.007
- Carmona-Cabello, M., Garcia, I. L., Leiva-Candia, D., Dorado, M. P. (2018). Valorization of food waste based on its composition through the concept of biorefinery. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 14, 67-79. doi: 10.1016/j.cogsc.2018.06.011
- Carota, E., Crognale, S., D'Annibale, A., Gallo, A. M., Stazi, S. R., Petruccioli, M. (2017). A sustainable use of Ricotta Cheese Whey for microbial biodiesel production. *Science of The Total Environment*, 584-585, 554-560. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.068>
- Carota, E., Petruccioli, M., D'Annibale, A., Gallo, A. M., Crognale, S. (2020). Orange peel waste-based liquid medium for biodiesel production by oleaginous yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(10), 4617-4628. doi: 10.1007/s00253-020-10579-y
- Carsanba, E., Papanikolaou, S., Fickers, P., Erten, H. (2020). Lipids by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on glucose in batch cultures. *Microorganisms*, 8(7), 1054. doi: 10.3390/microorganisms8071054
- Castañeda, M. T., Nuñez, S., Voget, C. E., Garelli, F., De Battista, H. (2017). *Análisis de balance de flujos metabólicos aplicado a la producción de lípidos microbianos*. Artículo presentado a IV Jornadas de Investigación, Transferencia y Extensión de la Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/60146>
- Carbohydrate-Active enZymes Database (CAZy). (2024). Fecha de último acceso: 13 de junio de 2024. Disponible en: <http://www.cazy.org/>
- Consejo de la UE y Consejo Europeo. (2019). Pacto Verde Europeo. Fecha de último acceso: 23 de mayo de 2024. Disponible en: <https://www.consilium.europa.eu/es/policies/green-deal/>
- Consorcio de Aguas. (2022). Fecha de último acceso: 19 de mayo de 2023. Disponible en: <https://oficinavirtual.consorcioaguas.com/FacturaElectronica/AtencionCliente/tarifas.aspx>
- Chacartegui, R., Carvalho, M., Abrahão, R., Becerra, J. (2015). Analysis of a CHP plant in a municipal solid waste landfill in the South of Spain. *Applied Thermal Engineering*, 91, 706-717. doi: 10.1016/j.applthermaleng.2015.08.069

- Chandra, R. P., Bura, R., Mabee, W. E., Berlin, A., Pan, X., Saddler, J. N. (2007). Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? (En Olsson, L. (Ed.), *Biofuels*) (pp. 67-93). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 978-3-540-73651-6.
- Chang, Y.-H., Chang, K.-S., Hsu, C.-L., Chuang, L.-T., Chen, C.-Y., Huang, F.-Y., Jang, H.-D. (2013). A comparative study on batch and fed-batch cultures of oleaginous yeast *Cryptococcus* sp. in glucose-based media and corncob hydrolysate for microbial oil production. *Fuel*, 105, 711-717. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2012.10.033>
- Chang, Y.-H., Chang, K.-S., Lee, C.-F., Hsu, C.-L., Huang, C.-W., Jang, H.-D. (2015). Microbial lipid production by oleaginous yeast *Cryptococcus* sp. in the batch cultures using corncob hydrolysate as carbon source. *Biomass and Bioenergy*, 72, 95-103. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.11.012>
- Chatterjee, S., Mohan, S. V. (2018). Microbial lipid production by *Cryptococcus curvatus* from vegetable waste hydrolysate. *Bioresource Technology*, 254, 284-289. doi: [10.1016/j.biortech.2018.01.079](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.079)
- Chaturvedi, V., Flynn, T., Niehaus, W. G., Wong, B. (1996). Stress tolerance and pathogenic potential of a mannitol mutant of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, 142(4), 937-943. doi: <https://doi.org/10.1099/00221287-142-4-937>
- Chen, M., Zhang, W., Wu, H., Guang, C., Mu, W. (2020). Mannitol: physiological functionalities, determination methods, biotechnological production, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(16), 6941-6951. doi: [10.1007/s00253-020-10757-y](https://doi.org/10.1007/s00253-020-10757-y)
- Cherwoo, L., Gupta, I., Flora, G., Verma, R., Kapil, M., Arya, S. K., Ravindran, B., Khoo, K. S., Bhatia, S. K., Chang, S. W., Ngamcharussrivichai, C., Ashokkumar, V. (2023). Biofuels an alternative to traditional fossil fuels: A comprehensive review. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, 60, 103503. doi: <https://doi.org/10.1016/j.seta.2023.103503>
- Christophe, G., Kumar, V., Nouaille, R., Gaudet, G., Fontanille, P., Pandey, A., Soccol, C. R., Larroche, C. (2012). Recent developments in microbial oils production: a possible alternative to vegetable oils for biodiesel without competition with human food? *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55. doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-89132012000100004>
- Chu, Y., Li, M., Jin, J., Dong, X., Xu, K., Jin, L., Qiao, Y., Ji, H. (2023). Advances in the application of the non-conventional yeast *Pichia kudriavzevii* in food and biotechnology industries. *Journal of Fungi*, 9(2). doi: [10.3390/jof9020170](https://doi.org/10.3390/jof9020170)
- Dahiya, S., Kumar, A. N., Shanthi Sravan, J., Chatterjee, S., Sarkar, O., Mohan, S. V. (2018). Food waste biorefinery: Sustainable strategy for circular bioeconomy. *Bioresource Technology*, 248, 2-12. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.176>

Referencias

- Dai, Y., Meng, Q., Mu, W., Zhang, T. (2017). Recent advances in the applications and biotechnological production of mannitol. *Journal of Functional Foods*, 36, 404-409. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.07.022>
- Dashti, M. G., Abdeslahian, P. (2016). Batch culture and repeated-batch culture of *Cunninghamella bainieri* 2A1 for lipid production as a comparative study. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(2), 172-180. doi: 10.1016/j.sjbs.2015.02.006
- Ley 7/2022, de 8 de abril, de residuos y suelos contaminados para una economía circular § Boletín Oficial del Estado, 85, de 9 de abril de 2022 <https://www.boe.es/eli/es/l/2022/04/08/7>
- Debzi, E. M., Excoffier, G., Toussaint, B., Vignon, M. R. (1988). Steam explosion treatment of wood: effects of pressure and time on cellulose behavior (En Focher, B., Marzetti, A., Crescenzi, V. (Eds.), *Steam explosion techniques. Fundamentals and Industrial Applications*). Milan, Italy. 2-88124-457-2.
- Demirbas, A. (2009). Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Conversion and Management*, 50(1), 14-34. doi: <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2008.09.001>
- Di Fidio, N., Dragoni, F., Antonetti, C., De Bari, I., Raspolli Galletti, A. M., Ragaglini, G. (2020). From paper mill waste to single cell oil: Enzymatic hydrolysis to sugars and their fermentation into microbial oil by the yeast *Lipomyces starkeyi*. *Bioresource Technology*, 315, 123790. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123790>
- Di Fidio, N., Minonne, F., Antonetti, C., Raspolli Galletti, A. M. (2021). *Cutaneotrichosporon oleaginosus*: A versatile whole-cell biocatalyst for the production of single-cell oil from agro-industrial wastes. *Catalysts*, 11(11). doi:10.3390/catal11111291
- Dobrowolski, A., Mituła, P., Rymowicz, W., Mirończuk, A. M. (2016). Efficient conversion of crude glycerol from various industrial wastes into single cell oil by yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology*, 207, 237-243. doi: 10.1016/j.biortech.2016.02.039
- Donzella, S., Serra, I., Fumagalli, A., Pellegrino, L., Mosconi, G., Lo Scalzo, R., Compagno, C. (2022). Recycling industrial food wastes for lipid production by oleaginous yeasts *Rhodospiridiobolus azoricus* and *Cutaneotrichosporon oleaginosum*. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 15(1), 51. doi: 10.1186/s13068-022-02149-3
- Dourou, M., Aggeli, D., Papanikolaou, S., Aggelis, G. (2018). Critical steps in carbon metabolism affecting lipid accumulation and their regulation in oleaginous microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(6), 2509-2523. doi: 10.1007/s00253-018-8813-z
- Dourou, M., Mizerakis, P., Papanikolaou, S., Aggelis, G. (2017). Storage lipid and polysaccharide metabolism in *Yarrowia lipolytica* and *Umbelopsis isabellina*.

- Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(19), 7213-7226. doi: 10.1007/s00253-017-8455-6
- Drula, E., Garron, M.-L., Dogan, S., Lombard, V., Henrissat, B., Terrapon, N. (2022). The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D571-D577. doi: 10.1093/nar/gkab1045
- Dulermo, T., Lazar, Z., Dulermo, R., Rakicka, M., Haddouche, R., Nicaud, J.-M. (2015). Analysis of ATP-citrate lyase and malic enzyme mutants of *Yarrowia lipolytica* points out the importance of mannitol metabolism in fatty acid synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(9), 1107-1117. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.04.007>
- Duque-Acevedo, M., Belmonte-Ureña, L. J., Plaza-Úbeda, J. A., Camacho-Ferre, F. (2020). The management of agricultural waste biomass in the framework of circular economy and bioeconomy: An opportunity for greenhouse agriculture in Southeast Spain. *Agronomy*, 10(4), 489. doi: 10.3390/agronomy10040489
- Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, I., Ballesteros, M. (2016). Chapter 15 - Steam explosion as lignocellulosic biomass pretreatment (En Mussatto, S. I. (Ed.), *Biomass fractionation technologies for a lignocellulosic feedstock based biorefinery*) (pp. 349-368). Amsterdam: Elsevier. 978-0-12-802323-5.
- Energy Information Administration. International-Data-Biofuels production. (2022). Energy Information Administration (EIA). International-Data-Biofuels production. Fecha de último acceso: 11 de mayo de 2024. Disponible en: <https://www.eia.gov/international/data/world>
- EN Biodiesel Standards. EU. Fuels: Biodiesel. Fecha de último acceso: 5 de marzo de 2024. Disponible en: https://dieselnet.com/standards/eu/fuel_biodiesel.php
- Eriksson, T., Karlsson, J., Tjerneld, F. (2002). A model explaining declining rate in hydrolysis of lignocellulose substrates with cellobiohydrolase I (Cel7A) and endoglucanase I (Cel7B) of *Trichoderma reesei*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 101(1), 41-60. doi: 10.1385/ABAB:101:1:41
- EUROSTAT. (2022). Electricity prices components for non-household consumers. Fecha de último acceso: 19 de mayo de 2022. Disponible en: https://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=nrg_pc_205_c
- Fabiszewska, A., Misiukiewicz-Stępień, P., Paplińska-Goryca, M., Zieniuk, B., Białecka-Florjańczyk, E. (2019). An insight into storage lipid synthesis by *Yarrowia lipolytica* yeast relating to lipid and sugar substrates metabolism. *Biomolecules*, 9(11). doi:10.3390/biom9110685
- Faife-Perez, E., Ochoa-Viñals, N., Liu, D., Álvarez-Delgado, A., Du, W., Zhao, X. (2017). Evaluación de cepas *Rhodospiridium toruloides* natural y genéticamente modificada en vinazas cubana y china. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 51(2), 44-53.

Referencias

- Fakas, S. (2017). Lipid biosynthesis in yeasts: A comparison of the lipid biosynthetic pathway between the model nonoleaginous yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the model oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Engineering in Life Sciences*, 17(3), 292-302. doi: <https://doi.org/10.1002/elsc.201600040>
- Fakas, S., Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Aggelis, G. (2008). Organic nitrogen of tomato waste hydrolysate enhances glucose uptake and lipid accumulation in *Cunninghamella echinulata*. *Journal of Applied Microbiology*, 105(4), 1062-1070. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03839.x
- Fassinou, W. F., Sako, A., Fofana, A., Koua, K. B., Toure, S. (2010). Fatty acids composition as a means to estimate the high heating value (HHV) of vegetable oils and biodiesel fuels. *Energy*, 35(12), 4949-4954. doi: 10.1016/j.energy.2010.08.030
- Fei, Q., O'Brien, M., Nelson, R., Chen, X., Lowell, A., Dowe, N. (2016). Enhanced lipid production by *Rhodospiridium toruloides* using different fed-batch feeding strategies with lignocellulosic hydrolysate as the sole carbon source. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1). doi: 10.1186/s13068-016-0542-x
- Feng, P., Xu, Z., Qin, L., Asraful Alam, M., Wang, Z., Zhu, S. (2020). Effects of different nitrogen sources and light paths of flat plate photobioreactors on the growth and lipid accumulation of *Chlorella* sp. GN1 outdoors. *Bioresource Technology*, 301, 122762. doi: 10.1016/j.biortech.2020.122762
- Fontes, A., Francisco, R., Ferreira, F. C., Faria, N. T., Marques, S., Reis, A., Moura, P., Lukasik, R., Santos, J., Lopes da Silva, T. (2024). Monitoring yeast cultures grown on corn stover hydrolysate for lipid production. *Processes*, 12(3). doi:10.3390/pr12030558
- Frengova, G. I., Beshkova, D. M. (2009). Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(2), 163-163. doi: 10.1007/s10295-008-0492-9
- Fu, R., Fei, Q., Shang, L., Brigham, C. J., Chang, H. N. (2018). Enhanced microbial lipid production by *Cryptococcus albidus* in the high-cell-density continuous cultivation with membrane cell recycling and two-stage nutrient limitation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 45(12), 1045-1051. doi: 10.1007/s10295-018-2081-x
- Galafassi, S., Cucchetti, D., Pizza, F., Franzosi, G., Bianchi, D., Compagno, C. (2012). Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. *Bioresource Technology*, 111, 398-403. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.004>
- Gao, Z., Ma, Y., Wang, Q., Zhang, M., Wang, J., Liu, Y. (2016). Effect of crude glycerol impurities on lipid preparation by *Rhodospiridium toruloides* yeast 32489. *Bioresource Technology*, 218, 373-379. doi: 10.1016/j.biortech.2016.06.088

- García-Aparicio, M. P. (2008). *Biorrefinerías: situación actual y perspectivas de futuro: informe de vigilancia tecnológica*. Genoma España.
- Gardeli, C., Athenaki, M., Xenopoulos, E., Mallouchos, A., Koutinas, A. A., Aggelis, G., Papanikolaou, S. (2017). Lipid production and characterization by *Mortierella (Umbelopsis) isabellina* cultivated on lignocellulosic sugars. *Journal of Applied Microbiology*, 123(6), 1461-1477. doi: 10.1111/jam.13587
- Global Market Insight - Beta Carotene Market. (2023). Fecha de último acceso: 23 de junio de 2024. Disponible en: <https://www.gminsights.com/industry-analysis/beta-carotene-market>
- Gómez-Toribio, V., García-Martín, A. B., Martínez, M. J., Martínez, Á. T., Guillén, F. (2009). Induction of extracellular hydroxyl radical production by white-rot fungi through quinone redox cycling. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(12), 3944-3953. doi: doi:10.1128/AEM.02137-08
- Gonçalves, C., Ferreira, C., Gonçalves, L. G., Turner, D. L., Leandro, M. J., Salema-Oom, M., Santos, H., Gonçalves, P. (2019). A new pathway for mannitol metabolism in yeasts suggests a link to the evolution of alcoholic fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 10. doi: 10.3389/fmicb.2019.02510
- Gonçalves, F. A. G., Colen, G., Takahashi, J. A. (2014). *Yarrowia lipolytica* and its multiple applications in the biotechnological industry. *The Scientific World Journal*, 2014, 476207. doi: 10.1155/2014/476207
- Gonzalez-Garcia, Y., Hernandez, R., Zhang, G., Escalante, F. M. E., Holmes, W., French, W. T. (2013). Lipids accumulation in *Rhodotorula glutinis* and *Cryptococcus curvatus* growing on distillery wastewater as culture medium. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 32(1), 69-74. doi: <https://doi.org/10.1002/ep.10604>
- González, J., Castillo, R., García-Campos, M. A., Noriega-Samaniego, D., Escobar-Sánchez, V., Romero-Aguilar, L., Alba-Lois, L., Segal-Kischinevsky, C. (2020a). Tolerance to oxidative stress in budding yeast by heterologous expression of catalases A and T from *Debaryomyces hansenii*. *Current Microbiology*, 77(12), 4000-4015. doi: 10.1007/s00284-020-02237-3
- González, J., Romero-Aguilar, L., Matus-Ortega, G., Pablo Pardo, J., Flores-Alanis, A., Segal-Kischinevsky, C. (2020b). Levaduras adaptadas al frío: el tesoro biotecnológico de la Antártica. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 23. doi: 10.22201/fesz.23958723e.2020.0.267
- Gorte, O., Kugel, M., Ochsenreither, K. (2020). Optimization of carbon source efficiency for lipid production with the oleaginous yeast *Saitozyma podzolica* DSM 27192 applying automated continuous feeding. *Biotechnology for Biofuels*, 13(1), 181. doi: 10.1186/s13068-020-01824-7

Referencias

- Guerrero, A. B., Ballesteros, I., Ballesteros, M. (2018). The potential of agricultural banana waste for bioethanol production. *Fuel*, 213, 176-185. doi: 10.1016/j.fuel.2017.10.105
- Guo, H., Zhao, Y., Chang, J.-S., Lee, D.-J. (2023). Enzymes and enzymatic mechanisms in enzymatic degradation of lignocellulosic biomass: A mini-review. *Bioresource Technology*, 367, 128252. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128252>
- Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., Otterdijk, R., Meybeck, A. (2011). *Global Food Losses and Food Waste- Extent, Causes and Prevention*. (Düsseldorf, M.)Ed. SAVE FOOD: Global Initiative on Food Loss and Waste Reduction. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Rome, Italy. 978-92-5-107205-9.
- Han, M., Xu, J.-Z., Liu, Z.-M., Qian, H., Zhang, W.-G. (2018). Co-production of microbial oil and exopolysaccharide by the oleaginous yeast *Sporidiobolus pararoseus* grown in fed-batch culture. *RSC Advances*, 8(6), 3348-3356. doi: 10.1039/C7RA12813D
- Hashem, A. H., Hasanin, M. S., Khalil, A. M. A., Suleiman, W. B. (2020a). Eco-green conversion of watermelon peels to Single Cell Oils using a unique oleaginous fungus: *Lichtheimia corymbifera* AH13. *Waste and Biomass Valorization*, 11, 5721-5732. doi: 10.1007/s12649-019-00850-3
- Hashem, A. H., Suleiman, W. B., Abu-elreesh, G., Shehabeldine, A. M., Khalil, A. M. A. (2020b). Sustainable lipid production from oleaginous fungus *Syncephalastrum racemosum* using synthetic and watermelon peel waste media. *Bioresource Technology Reports*, 12, 100569. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100569>
- Hassan, M., Blanc, P. J., Pareilleux, A., Goma, G. (1994). Production of single-cell oil from prickly-pear juice fermentation by *Cryptococcus curvatus* grown in batch culture. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 10(5), 534-537. doi: 10.1007/BF00367661
- He, L., Huang, Y., Shi, L., Zhou, Z., Wu, H. (2022). Steam explosion processing intensifies the nutritional values of most crop byproducts: Morphological structure, carbohydrate-protein fractions, and rumen fermentation profile. *Frontiers in Nutrition*, 9. doi: 10.3389/fnut.2022.979609
- Heikal, E. K., Elmelawy, M. S., Khalil, S. A., Elbasuny, N. M. (2017). Manufacturing of environment friendly biolubricants from vegetable oils. *Egyptian Journal of Petroleum*, 26(1), 53-59. doi: 10.1016/j.ejpe.2016.03.003
- Herráez, A. Ruta de las pentosas-fosfato (Biomodel). Universidad de Alcalá. (2024). Fecha de último acceso: 3 de junio de 2024. Disponible en: <https://biomodel.uah.es/metab/pentosas.htm>
- Hill, E. G., Patton, A. R. (1947). The Maillard reaction in microbiological assay. *Science*, 105(2731), 481-482. doi: 10.1126/science.105.2731.481

- Hu, M., Wang, J., Gao, Q., Bao, J. (2018). Converting lignin derived phenolic aldehydes into microbial lipid by *Trichosporon cutaneum*. *Journal of Biotechnology*, 281, 81-86. doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.06.341
- Huang, C., Chen, X.-f., Xiong, L., Yang, X.-y., Chen, X.-d., Ma, L.-l., Chen, Y. (2013). Microbial oil production from corncob acid hydrolysate by oleaginous yeast *Trichosporon coremiiforme*. *Biomass and Bioenergy*, 49, 273-278. doi: 10.1016/j.biombioe.2012.12.023
- Huang, C., Luo, M.-T., Chen, X.-F., Qi, G.-X., Xiong, L., Lin, X.-Q., Wang, C., Li, H.-L., Chen, X.-D. (2017). Combined “de novo” and “ex novo” lipid fermentation in a mix-medium of corncob acid hydrolysate and soybean oil by *Trichosporon dermatis*. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 147. doi: 10.1186/s13068-017-0835-8
- Huang, D., Zhou, H., Lin, L. (2012). Biodiesel: an alternative to conventional fuel. *Energy Procedia*, 16, 1874-1885. doi: <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2012.01.287>
- Huang, X.-F., Liu, J.-N., Lu, L.-J., Peng, K.-M., Yang, G.-X., Liu, J. (2016). Culture strategies for lipid production using acetic acid as sole carbon source by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology*, 206, 141-149. doi: 10.1016/j.biortech.2016.01.073
- Huang, X.-f., Shen, Y., Luo, H.-j., Liu, J.-n., Liu, J. (2018). Enhancement of extracellular lipid production by oleaginous yeast through preculture and sequencing batch culture strategy with acetic acid. *Bioresource Technology*, 247, 395-401. doi: 10.1016/j.biortech.2017.09.096
- ICIS. (2021). ICIS. Indicatives Chemical Prices A–Z; ICIS: Austin, TX, USA.
- IndexBox. (2022). Glucose and glucose syrup - Market analysis, forecast, size, trends and insights. Report ID: 4832692; IndexBox Inc.: Wlanut, CA, USA.
- Instituto Nacional de Estadística (INE). (2022). Salarios y costes laborales. Fecha de último acceso: 19 de mayo de 2022. Disponible en: https://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/categoria.htm?c=Estadistica_P&cid=1254735976596
- Instituto Nacional de Estadística (INE). (2024). Medio ambiente. Residuos urbanos. Cantidad de residuos recogidos clasificados por tipo de residuo, periodo y comunidades autónomas. Disponible en: <https://www.ine.es/jaxiT3/Datos.htm?tpx=61826>
- Issariyakul, T., Dalai, A. K. (2014). Biodiesel from vegetable oils. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 31, 446-471. doi: 10.1016/j.rser.2013.11.001
- Jacquet, N., Maniet, G., Vanderghem, C., Delvigne, F., Richel, A. (2015). Application of steam explosion as pretreatment on lignocellulosic material: A review.

Referencias

- Industrial & Engineering Chemistry Research*, 54(10), 2593-2598. doi: 10.1021/ie503151g
- Jiru, T. M. (2020). Single Cell Oil production with *Cutaneotrichosporon curvatus* (syn, *Cryptococcus curvatus*) PY39 and its use for biodiesel preparation. *Research Square*. doi: (Preprint version 1) "This work is licensed under a CC BY 4.0 License" [https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-20536/v1]
- Joelsson, E., Erdei, B., Galbe, M., Wallberg, O. (2016). Techno-economic evaluation of integrated first- and second-generation ethanol production from grain and straw. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 1. doi: 10.1186/s13068-015-0423-8
- Jørgensen, H., Kristensen, J. B., Felby, C. (2007). Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1(2), 119-134. doi: 10.1002/bbb.4
- Juanssilfero, A. B., Kahar, P., Amza, R. L., Miyamoto, N., Otsuka, H., Matsumoto, H., Kihira, C., Thontowi, A., Yopi, Ogino, C., Prasetya, B., Kondo, A. (2018). Selection of oleaginous yeasts capable of high lipid accumulation during challenges from inhibitory chemical compounds. *Biochemical Engineering Journal*, 137, 182-191. doi: 10.1016/j.bej.2018.05.024
- Junta de Andalucía. (2016). Líneas de actuación de las Consejerías de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural y de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio en materia de gestión de restos vegetales en la horticultura de Andalucía. Fecha de último acceso: 4 de marzo de 2024. Disponible en: <https://www.juntadeandalucia.es/organismos/agriculturapescaaguaydesarrollorural/areas/agricultura/produccion-agricola/paginas/estrategia-restos-vegetales.html>
- Kanamoto, H., Nakamura, K., Misawa, N. (2021). Carotenoid production in oleaginous yeasts (En Misawa, N. (Ed.), *Carotenoids: Biosynthetic and Biofunctional Approaches*) (pp. 153-163). Singapore: Springer Singapore. 978-981-15-7360-6.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Kawashima, M., Ishiguro-Watanabe, M. (2023). KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D587-D592. doi: 10.1093/nar/gkac963
- Karamerou, E. E., Parsons, S., McManus, M. C., Chuck, C. J. (2021). Using techno-economic modelling to determine the minimum cost possible for a microbial palm oil substitute. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1). doi: 10.1186/s13068-021-01911-3
- Karamerou, E. E., Theodoropoulos, C., Webb, C. (2016). A biorefinery approach to microbial oil production from glycerol by *Rhodotorula glutinis*. *Biomass and Bioenergy*, 89, 113-122. doi: 10.1016/j.biombioe.2016.01.007
- Karamerou, E. E., Theodoropoulos, C., Webb, C. (2017). Evaluating feeding strategies for microbial oil production from glycerol by *Rhodotorula glutinis*. *Engineering in Life Sciences*, 17(3), 314-324. doi: https://doi.org/10.1002/elsc.201600073

- Karamerou, E. E., Webb, C. (2019). Cultivation modes for microbial oil production using oleaginous yeasts – A review. *Biochemical Engineering Journal*, 151, 107322. doi: 10.1016/j.bej.2019.107322
- Karka, P., Johnsson, F., Papadokonstantakis, S. (2021). Perspectives for greening european fossil-fuel infrastructures through use of biomass: The case of liquid biofuels based on lignocellulosic resources. *Frontiers in Energy Research*, 9. doi: 10.3389/fenrg.2021.636782
- KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* - ENZYME: 2.3.1.85. (2021). Fecha de último acceso: 28 de mayo de 2024. Disponible en: <https://www.genome.jp/entry/2.3.1.85>
- Kholany, M., Trébulle, P., Martins, M., Ventura, S. P., Nicaud, J.-M., Coutinho, J. A. (2020). Extraction and purification of violacein from *Yarrowia lipolytica* cells using aqueous solutions of surfactants. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 95(4), 1126-1134. doi: <https://doi.org/10.1002/jctb.6297>
- Kim, D. (2018). Physico-chemical conversion of lignocellulose: Inhibitor effects and detoxification strategies: A Mini Review. *Molecules*, 23(2). doi:10.3390/molecules23020309
- Kitcha, S., Cheirsilp, B. (2011). Screening of oleaginous yeasts and optimization for lipid production using crude glycerol as a carbon source. *Energy Procedia*, 9, 274-282. doi: 10.1016/j.egypro.2011.09.029
- Knothe, G., Razon, L. F. (2017). Biodiesel fuels. *Progress in Energy and Combustion Science*, 58, 36-59. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2016.08.001>
- Kolouchová, I., Mařátková, O., Sigler, K., Masák, J., Řezanka, T. (2016). Lipid accumulation by oleaginous and non-oleaginous yeast strains in nitrogen and phosphate limitation. *Folia Microbiologica*, 61(5), 431-438. doi: 10.1007/s12223-016-0454-y
- Kong, W., Yang, S., Agboyibor, C., Chen, D., Zhang, A., Niu, S. (2019). Light irradiation can regulate the growth characteristics and metabolites compositions of *Rhodotorula mucilaginosa*. *J Food Sci Technol*, 56(12), 5509-5517. doi: 10.1007/s13197-019-04023-x
- Konno, A., Suzuki, Y., Ogawa, T., Taniuchi, T. (2009). UV irradiation promotes the accumulation of triglyceride in *Lipomyces lipofer*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(11), 2474-2477. doi: 10.1271/bbb.90458
- Kot, A. M., Błażej, S., Gientka, I., Kieliszek, M., Bryś, J. (2018). Torulene and torularhodin: “new” fungal carotenoids for industry? *Microbial Cell Factories*, 17(1). doi: 10.1186/s12934-018-0893-z
- Kot, A. M., Błażej, S., Kieliszek, M., Gientka, I., Bryś, J., Reczek, L., Pobiega, K. (2019). Effect of exogenous stress factors on the biosynthesis of carotenoids and lipids by *Rhodotorula* yeast strains in media containing agro-industrial waste.

Referencias

- World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(10). doi: 10.1007/s11274-019-2732-8
- Koutinas, A. A., Chatzifragkou, A., Kopsahelis, N., Papanikolaou, S., Kookos, I. K. (2014). Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production. *Fuel*, 116, 566-577. doi: 10.1016/j.fuel.2013.08.045
- Kruger, J. S., Cleveland, N. S., Yeap, R. Y., Dong, T., Ramirez, K. J., Nagle, N. J., Lowell, A. C., Beckham, G. T., McMillan, J. D., Biddy, M. J. (2018). Recovery of fuel-precursor lipids from oleaginous yeast. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(3), 2921-2931. doi: 10.1021/acssuschemeng.7b01874
- Kuczera, K., Naparło, K., Soszyński, M., Bartosz, G., Sadowska-Bartos, I. (2023). Capsaicin toxicity to the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is not due to oxidative stress but to disruption of membrane structure. *Chemico-Biological Interactions*, 374, 110407. doi: 10.1016/j.cbi.2023.110407
- Kumar, R., Dhanarajan, G., Bhaumik, M., Chopra, J., Sen, R. (2017). Performance evaluation of a yeast biorefinery as a sustainable model for co-production of biomass, bioemulsifier, lipid, biodiesel and animal-feed components using inexpensive raw materials. *Sustainable Energy & Fuels*, 1(4), 923-931. doi: 10.1039/C7SE00010C
- 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. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(2), 464-472. doi: <https://doi.org/10.1002/bit.26473>
- Lee, J.-E., Vadlani, P. V., Min, D. (2017). Sustainable production of microbial lipids from lignocellulosic biomass using oleaginous yeast cultures. *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*, 07(01), 36-50. doi: 10.4236/jsbs.2017.71004
- Lee, R. A., Lavoie, J.-M. (2013). From first- to third-generation biofuels: Challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. *Animal Frontiers*, 3(2), 6-11. doi: 10.2527/af.2013-0010
- Lelieveld, J., Klingmüller, K., Pozzer, A., Burnett, R. T., Haines, A., Ramanathan, V. (2019). Effects of fossil fuel and total anthropogenic emission removal on public health and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(15), 7192-7197. doi: 10.1073/pnas.1819989116
- Li, C., Zhang, N., Li, B., Xu, Q., Song, J., Wei, N., Wang, W., Zou, H. (2017). Increased torulene accumulation in red yeast *Sporidiobolus pararoseus* NGR as stress response to high salt conditions. *Food Chemistry*, 237, 1041-1047. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.06.033
- Li, Q., Du, W., Liu, D. (2008). Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(5), 749-756. doi: 10.1007/s00253-008-1625-9

- Li, X., Xu, H., Wu, Q. (2007a). Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(4), 764-771. doi: 10.1002/bit.21489
- Li, Y., Zhao, Z., Bai, F. (2007b). High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(3), 312-317. doi: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.02.008>
- Lin, J., Shen, H., Tan, H., Zhao, X., Wu, S., Hu, C., Zhao, Z. K. (2011). Lipid production by *Lipomyces starkeyi* cells in glucose solution without auxiliary nutrients. *Journal of Biotechnology*, 152(4), 184-188. doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.02.010
- Liu, Z., Natalizio, F., Dragone, G., Mussatto, S. I. (2021). Maximizing the simultaneous production of lipids and carotenoids by *Rhodospiridium toruloides* from wheat straw hydrolysate and perspectives for large-scale implementation. *Bioresource Technology*, 340, 125598. doi: 10.1016/j.biortech.2021.125598
- Löbs, A.-K., Schwartz, C., Wheeldon, I. (2017). Genome and metabolic engineering in non-conventional yeasts: Current advances and applications. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2(3), 198-207. doi: <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.08.002>
- Lopes da Silva, T., Fontes, A., Reis, A., Siva, C., Gírio, F. (2023). Oleaginous yeast biorefinery: feedstocks, processes, techniques, bioproducts. *Fermentation*, 9(12). doi:10.3390/fermentation9121013
- Lopes, H. J. S., Bonturi, N., Kerkhoven, E. J., Miranda, E. A., Lahtvee, P.-J. (2020). C/N ratio and carbon source-dependent lipid production profiling in *Rhodotorula toruloides*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(6), 2639-2649. doi: 10.1007/s00253-020-10386-5
- Luqueño-Bocardo, O. I., Pardo, J. P., Guerra-Sánchez, G., González, J., Matus-Ortega, G., Romero-Aguilar, L. (2021). Los isoprenoides como fuente de biocombustibles. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 24. doi: <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2021.0.291>
- Lv, P. J., Qiang, S., Liu, L., Hu, C. Y., Meng, Y. H. (2020). Dissolved-oxygen feedback control fermentation for enhancing β -carotene in engineered *Yarrowia lipolytica*. *Scientific Reports*, 10(1), 17114. doi: 10.1038/s41598-020-74074-0
- Lyu, L., Chu, Y., Zhang, S., Zhang, Y., Huang, Q., Wang, S., Zhao, Z. K. (2021). Engineering the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* for improved resistance against inhibitors in biomass hydrolysates. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. doi: 10.3389/fbioe.2021.768934
- Ma, Y., Liu, S., Cui, L., Fei, Q., Wang, Q. (2024). Turning food waste to microbial lipid towards a superb economic and environmental sustainability: An innovative integrated biological route. *Environmental Research*, 255, 119125. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.119125>

Referencias

- Madhour, A., Anke, H., Mucci, A., Davoli, P., Weber, R. W. S. (2005). Biosynthesis of the xanthophyll plectanixanthin as a stress response in the red yeast *Dioszegia* (Tremellales, Heterobasidiomycetes, Fungi). *Phytochemistry*, 66(22), 2617-2626. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.09.010>
- Mankar, A. R., Pandey, A., Modak, A., Pant, K. K. (2021). Pretreatment of lignocellulosic biomass: A review on recent advances. *Bioresource Technology*, 334, 125235. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125235>
- MAPA. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2020). "Más alimento, menos desperdicio". Memoria anual 2020. Fecha de último acceso: 5 de junio de 2024. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/desperdicio/13memoria_estrategia_mamd_2020_0_tcm30-627833.pdf
- MAPA. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2023). Superficie y Producción. Información sectorial, Subdirección General de Frutas y Hortalizas y Vitivinicultura. Fecha de último acceso: 1 de marzo de 2024. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/frutas-y-hortalizas/informacion_general.aspx
- MAPA. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2024). Estadísticas agrarias. Agricultura. Superficies y producciones anuales de cultivos. Fecha de último acceso: 21 de mayo de 2024. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/>
- Martani, F., Maestroni, L., Torchio, M., Ami, D., Natalello, A., Lotti, M., Porro, D., Branduardi, P. (2020). Conversion of sugar beet residues into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 204. doi: 10.1186/s12934-020-01467-1
- Martins, V., Dias, C., Caldeira, J., Duarte, L. C., Reis, A., Lopes da Silva, T. (2018). Carob pulp syrup: A potential Mediterranean carbon source for carotenoids production by *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921. *Bioresource Technology Reports*, 3, 177-184. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.07.008>
- Matsakas, L., Bonturi, N., Miranda, E. A., Rova, U., Christakopoulos, P. (2015). High concentrations of dried sorghum stalks as a biomass feedstock for single cell oil production by *Rhodospiridium toruloides*. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 6. doi: 10.1186/s13068-014-0190-y
- Maza, D. D., Barros, J. M., Guillamón, J. M., Aybar, M. J., Viñarta, S. C. (2024). Valorization of sugarcane vinasse and crude glycerol for single-cell oils production by *Rhodotorula glutinis* R4: A preliminary approach to the integration of biofuels industries for sustainable biodiesel feedstock. *Fermentation*, 10(4). doi:10.3390/fermentation10040178
- Maza, D. D., Viñarta, S. C., Su, Y., Guillamón, J. M., Aybar, M. J. (2020). Growth and lipid production of *Rhodotorula glutinis* R4, in comparison to other oleaginous

- yeasts. *Journal of Biotechnology*, 310, 21-31. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.01.012>
- McCarty, N. S., Graham, A. E., Studená, L., Ledesma-Amaro, R. (2020). Multiplexed CRISPR technologies for gene editing and transcriptional regulation. *Nature Communications*, 11(1), 1281. doi: 10.1038/s41467-020-15053-x
- Mendoza-Téllez, B., Zamora-Bello, A., Rosas-Paz, M., Villarreal-Huerta, D., de la Fuente, I., Segal-Kischinevsky, C., González, J. (2023). Introduction to CRISPR systems and their applications in yeasts. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 25. doi: <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.502>
- Meng, Q., Zhang, T., Wei, W., Mu, W., Miao, M. (2017). Production of mannitol from a high concentration of glucose by *Candida parapsilosis* SK26.001. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 181(1), 391-406. doi: 10.1007/s12010-016-2219-0
- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., Xian, M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, 34(1), 1-5. doi: 10.1016/j.renene.2008.04.014
- Mestre, M. V. (2018). Bioeconomía: el diseño de un cambio de rumbo. *Ambienta: La revista del Ministerio de Medio Ambiente*, 125, 50-67.
- Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., Adholeya, A. (2016). A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Frontiers in Microbiology*, 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.00546
- Mirza, S., Siddique, S., Qamer, H. M., Doggar, M. G. (2019). Optimization of lipid production potential of oleaginous yeast by response surface methodology cultivated in agro-industrial waste. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(7), 3221-3230. doi: 10.1007/s13762-018-1878-5
- MITECO. Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico. (2020a). Estrategia Española de Economía Circular. Fecha de último acceso: 23 de mayo de 2024. Disponible en: <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/economia-circular/estrategia.html>
- MITECO. Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico. (2020b). Programa Estatal de Prevención de Residuos 2014-2020. Fecha de último acceso: 23 de mayo de 2024. Disponible en: <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/planes-y-estrategias/planes-y-programas.html>
- Mlíčková, K. i., Roux, E., Athenstaedt, K., d'Andrea, S., Daum, G. n., Chardot, T., Nicaud, J.-M. (2004). Lipid accumulation, lipid body formation, and acyl coenzyme a oxidases of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 3918-3924. doi: 10.1128/aem.70.7.3918-3924.2004

Referencias

- Mohammed, M. K., Balla, H. H., Al-Dulaimi, Z. M. H., Kareem, Z. S., Al-Zuhairy, M. S. (2021). Effect of ethanol-gasoline blends on SI engine performance and emissions. *Case Studies in Thermal Engineering*, 25, 100891. doi: <https://doi.org/10.1016/j.csite.2021.100891>
- Moliné, M., Libkind, D., van Broock, M. (2012). Production of torularhodin, torulene, and β -carotene by *Rhodotorula* yeasts (En Barredo, J.-L. (Ed.), *Microbial carotenoids from fungi: Methods and protocols*) (pp. 275-283). Totowa, NJ: Humana Press. 978-1-61779-918-1.
- Morales-Palomo, S., González-Fernández, C., Tomás-Pejó, E. (2022). Prevailing acid determines the efficiency of oleaginous fermentation from volatile fatty acids. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(2), 107354. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107354>
- Moreno, A. D., Duque, A., González, A., Ballesteros, I., Negro, M. J. (2021). Valorization of greenhouse horticulture waste from a biorefinery perspective. *Foods*, 10(4). doi:10.3390/foods10040814
- Moreno, A. D., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M. J. (2019). Chapter 16 - pretreatment technologies for lignocellulosic biomass deconstruction within a biorefinery perspective (En Pandey, A., Larroche, C., Dussap, C.-G., Gnansounou, E., Khanal, S. K., Ricke, S. (Eds.), *Biofuels: Alternative feedstocks and conversion processes for the production of liquid and gaseous biofuels (Second Edition)*) (pp. 379-399): Academic Press. 978-0-12-816856-1.
- Muniraj, I. K., Uthandi, S. K., Hu, Z., Xiao, L., Zhan, X. (2015). Microbial lipid production from renewable and waste materials for second-generation biodiesel feedstock. *Environmental Technology Reviews*, 4(1), 1-16. doi: 10.1080/21622515.2015.1018340
- Muscas, D., Orlandi, F., Petrucci, R., Proietti, C., Ruga, L., Fornaciari, M. (2024). Effects of urban tree pruning on ecosystem services performance. *Trees, Forests and People*, 15, 100503. doi: 10.1016/j.tfp.2024.100503
- Naciones Unidas. Desafíos globales - Población. (2023). Fecha de último acceso: 15 marzo de 2024. Disponible en: <https://www.un.org/es/global-issues/population>
- Nair, A. S., Sivakumar, N. (2022). Enhanced production of biodiesel by *Rhodosporidium toruloides* using waste office paper hydrolysate as feedstock: Optimization and characterization. *Fuel*, 327, 125174. doi: 10.1016/j.fuel.2022.125174
- Napora, K., Wrodnigg, T. M., Kosmus, P., Thonhofer, M., Robins, K., Winkler, M. (2013). *Yarrowia lipolytica* dehydrogenase/reductase: An enzyme tolerant for lipophilic compounds and carbohydrate substrates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(11), 3393-3395. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.03.064>
- Navarrete, C., Estrada, M., Martínez, J. L. (2022). *Debaryomyces hansenii*: an old acquaintance for a fresh start in the era of the green biotechnology. *World Journal*

- of Microbiology and Biotechnology*, 38(6), 99. doi: 10.1007/s11274-022-03280-x
- Navarrete, C., Jacobsen, I. H., Martínez, J. L., Procentese, A. (2020). Cell factories for industrial production processes: Current issues and emerging solutions. *Processes*, 8(7). doi:10.3390/pr8070768
- Navarrete, C., Martínez, J. L. (2020). Non-conventional yeasts as superior production platforms for sustainable fermentation based bio-manufacturing processes. *AIMS Bioengineering*, 7(4), 289-305. doi: 10.3934/bioeng.2020024
- Negro, M. J., Alvarez, C., Ballesteros, I., Romero, I., Ballesteros, M., Castro, E., Manzanares, P., Moya, M., Oliva, J. M. (2014). Ethanol production from glucose and xylose obtained from steam exploded water-extracted olive tree pruning using phosphoric acid as catalyst. *Bioresource Technology*, 153, 101-107. doi: 10.1016/j.biortech.2013.11.079
- Negro, M. J., Álvarez, C., Doménech, P., Iglesias, R., Ballesteros, I. (2020). Sugars production from municipal forestry and greening wastes pretreated by an integrated steam explosion-based process. *Energies*, 13(17). doi:10.3390/en13174432
- Niño-Villalobos, A., Puello-Yarce, J., González-Delgado, Á. D., Ojeda, K. A., Sánchez-Tuirán, E. (2020). Biodiesel and hydrogen production in a combined palm and jatropha biomass biorefinery: simulation, techno-economic, and environmental evaluation. *ACS Omega*, 5(13), 7074-7084. doi: 10.1021/acsomega.9b03049
- Ogunkunle, O., Ahmed, N. A. (2019). A review of global current scenario of biodiesel adoption and combustion in vehicular diesel engines. *Energy Reports*, 5, 1560-1579. doi: <https://doi.org/10.1016/j.egyr.2019.10.028>
- Osorio-González, C. S., Saini, R., Hegde, K., Brar, S. K., Lefebvre, A., Avalos Ramírez, A. (2023). Crabtree Effect on *Rhodospiridium toruloides* using wood hydrolysate as a culture media. *Fermentation*, 9(1). doi:10.3390/fermentation9010011
- Pan, J. G., Rhee, J. S. (1986). Biomass yields and energetic yields of oleaginous yeasts in batch culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 28(1), 112-114. doi: <https://doi.org/10.1002/bit.260280117>
- Panoutsou, C., Germer, S., Karka, P., Papadokostantakis, S., Kroyan, Y., Wojcieszky, M., Maniatis, K., Marchand, P., Landalv, I. (2021). Advanced biofuels to decarbonise European transport by 2030: Markets, challenges, and policies that impact their successful market uptake. *Energy Strategy Reviews*, 34, 100633. doi: <https://doi.org/10.1016/j.esr.2021.100633>
- Papanikolaou, S., Aggelis, G. (2002). Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresource Technology*, 82(1), 43-49. doi: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00149-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00149-3)

Referencias

- Papanikolaou, S., Aggelis, G. (2011a). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(8), 1031-1051. doi: 10.1002/ejlt.201100014
- Papanikolaou, S., Aggelis, G. (2011b). Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(8), 1052-1073. doi: 10.1002/ejlt.201100015
- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Marc, I., Aggelis, G. (2007). Industrial derivative of tallow: a promising renewable substrate for microbial lipid, single-cell protein and lipase production by *Yarrowia lipolytica*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(3), 425-435. doi: 10.2225/vol10-issue3-fulltext-8
- Papanikolaou, S., Kampisopoulou, E., Blanchard, F., Rondags, E., Gardeli, C., Koutinas, A. A., Chevalot, I., Aggelis, G. (2017). Production of secondary metabolites through glycerol fermentation under carbon-excess conditions by the yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Rhodospiridium toruloides*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(9). doi: 10.1002/ejlt.201600507
- Papanikolaou, S., Muniglia, L., Chevalot, I., Aggelis, G., Marc, I. (2002). *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *Journal of Applied Microbiology*, 92(4), 737-744. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01577.x
- Papilo, P., Marimin, M., Hambali, E., Machfud, M., Yani, M., Asrol, M., Evanila, E., Prasetya, H., Mahmud, J. (2022). Palm oil-based bioenergy sustainability and policy in Indonesia and Malaysia: A systematic review and future agendas. *Heliyon*, 8(10), e10919. doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10919>
- Park, Y.-K., Ledesma-Amaro, R. (2023). What makes *Yarrowia lipolytica* well suited for industry? *Trends in Biotechnology*, 41(2), 242-254. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.07.006>
- Park, Y.-K., Nicaud, J.-M. (2020). Metabolic engineering for unusual lipid production in *Yarrowia lipolytica*. *Microorganisms*, 8(12). doi:10.3390/microorganisms8121937
- Parsons, S., Abeln, F., McManus, M. C., Chuck, C. J. (2018). Techno-economic analysis (TEA) of microbial oil production from waste resources as part of a biorefinery concept: assessment at multiple scales under uncertainty. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 94(3), 701-711. doi: 10.1002/jctb.5811
- Passarinho, P. C., Oliveira, B., Dias, C., Teles, M., Reis, A., Lopes da Silva, T. (2020). Sequential carotenoids extraction and biodiesel production from *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 biomass. *Waste and Biomass Valorization*, 11(5), 2075-2086. doi: 10.1007/s12649-018-0489-1
- Passoth, V. (2017). Lipids of yeasts and filamentous fungi and their importance for biotechnology (pp. 149-204). 978-3-319-58828-5.

- Patel, A., Arora, N., Mehtani, J., Pruthi, V., Pruthi, P. A. (2017). Assessment of fuel properties on the basis of fatty acid profiles of oleaginous yeast for potential biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 77, 604-616. doi: 10.1016/j.rser.2017.04.016
- Pereira, A. S., Lopes, M., Miranda, S. M., Belo, I. (2022). Bio-oil production for biodiesel industry by *Yarrowia lipolytica* from volatile fatty acids in two-stage batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(8), 2869-2881. doi: 10.1007/s00253-022-11900-7
- Pham, N., Reijnders, M., Suarez-Diez, M., Nijse, B., Springer, J., Eggink, G., Schaap, P. J. (2021). Genome-scale metabolic modeling underscores the potential of *Cutaneotrichosporon oleaginosus* ATCC 20509 as a cell factory for biofuel production. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1), 2. doi: 10.1186/s13068-020-01838-1
- Pimentel, D., Marklein, A., Toth, M., Karpoff, M., Paul, G., McCormack, R., Kyriazis, J., Krueger, T. (2008). Biofuel impacts on world food supply: Use of fossil fuel, land and water resources. *Energies*, 1(2), 41-78. doi: 10.3390/en1010041
- Poontawee, R., Limtong, S. (2020). Feeding strategies of two-stage fed-batch cultivation processes for microbial lipid production from sugarcane top hydrolysate and crude glycerol by the oleaginous red yeast *Rhodospiridiobolus fluvialis*. *Microorganisms*, 8(2). doi:10.3390/microorganisms8020151
- Popovic, M. (2019). Thermodynamic properties of microorganisms: determination and analysis of enthalpy, entropy, and Gibbs free energy of biomass, cells and colonies of 32 microorganism species. *Heliyon*, 5(6), e01950. doi: https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01950
- Protein Data Bank (PDB). (2024). Fecha de último acceso: 13 de junio de 2024. Disponible en: <https://www.rcsb.org/>
- Qi, F., Shen, P., Hu, R., Xue, T., Jiang, X., Qin, L., Chen, Y., Huang, J. (2020). Carotenoids and lipid production from *Rhodospiridium toruloides* cultured in tea waste hydrolysate. *Biotechnology for Biofuels*, 13(1). doi: 10.1186/s13068-020-01712-0
- Qian, X., Gorte, O., Chen, L., Zhang, W., Dong, W., Ma, J., Jiang, M., Xin, F., Ochsenreither, K. (2019). Co-production of single cell oil and gluconic acid using oleaginous *Cryptococcus podzolicus* DSM 27192. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 127. doi: 10.1186/s13068-019-1469-9
- Qin, L., Liu, L., Zeng, A.-P., Wei, D. (2017). From low-cost substrates to Single Cell Oils synthesized by oleaginous yeasts. *Bioresource Technology*, 245, 1507-1519. doi: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.163
- Qin, W., Han, S., Meng, F., Chen, K., Gao, Y., Li, J., Lin, L., Hu, E., Jiang, J. (2024). Impacts of seasonal variation on volatile fatty acids production of food waste

Referencias

- anaerobic fermentation. *Science of The Total Environment*, 912, 168764. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168764>
- Rafiq, S., Bhat, M. I., Sofi, S. A., Muzzafar, K., Majid, D., Dar, B. N., Makroo, H. A. (2023). Bioconversion of agri-food waste and by-products into microbial lipids: Mechanism, cultivation strategies and potential in food applications. *Trends in Food Science & Technology*, 139, 104118. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.07.015>
- Rajkumar, A. S., Morrissey, J. P. (2020). Rational engineering of *Kluyveromyces marxianus* to create a chassis for the production of aromatic products. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 207. doi: 10.1186/s12934-020-01461-7
- Rakicka, M., Lazar, Z., Dulermo, T., Fickers, P., Nicaud, J. M. (2015). Lipid production by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* using industrial by-products under different culture conditions. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 104. doi: 10.1186/s13068-015-0286-z
- Ramos, M. J., Fernández, C. M., Casas, A., Rodríguez, L., Pérez, Á. (2009). Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource Technology*, 100(1), 261-268. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.06.039>
- Reciclados Almerienses. (2005). Tratamiento de residuos vegetales. Fecha de último acceso: 19 de mayo de 2023. Disponible en: <https://recicladosalmerienses2005.com/residuos-vegetales/>
- Repsol. (2024). Tipos de biocombustibles: Biodiésel. Fecha de último acceso: 1 de junio de 2024. Disponible en: <https://www.repsol.com/es/tecnologia-digitalizacion/technology-lab/reduccion-emisiones/biocombustibles/index.cshtml>
- Reyes-González, G., Franco Correa, M. (2006). Producción biotecnológica de sabores, pigmentos y aromas a partir de hongos miceliales y levaduras. *Universitas Scientiarum*, 11(2), 23-30.
- Robles-Iglesias, R., Naveira-Pazos, C., Fernández-Blanco, C., Veiga, M. C., Kennes, C. (2023). Factors affecting the optimisation and scale-up of lipid accumulation in oleaginous yeasts for sustainable biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 171, 113043. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.113043>
- Saenge, C., Cheirsilp, B., Suksaroge, T. T., Bourtoom, T. (2011). Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry*, 46(1), 210-218. doi: 10.1016/j.procbio.2010.08.009
- Saini, R., Osorio-Gonzalez, C. S., Hegde, K., Brar, S. K., Vezina, P. (2021). Effect of creating a fed-batch like condition using carbon to nitrogen ratios on lipid accumulation in *Rhodospiridium toruloides*-1588. *Bioresource Technology*, 337, 125354. doi: 10.1016/j.biortech.2021.125354

- Saisriyoot, M., Thanapimmetha, A., Suwaleerat, T., Chisti, Y., Srinophakun, P. (2019). Biomass and lipid production by *Rhodococcus opacus* PD630 in molasses-based media with and without osmotic-stress. *Journal of Biotechnology*, 297, 1-8. doi: 10.1016/j.jbiotec.2019.02.012
- Salazar, R., Cárdenas, G. J. (2013). La bioeconomía y las biorrefinerías. *Avance Agroindustrial*, 34(3), 31-34.
- Sana, N., Arnepalli, D. N., Krishnan, C. (2023). Enhanced bioconversion of methane to biodiesel by *Methylosarcina* sp. LC-4. *Sustainability*, 15(1). doi:10.3390/su15010505
- Sánchez-Arreguin, A., Carriles, R., Ochoa-Alejo, N., López, M. G., Sánchez-Segura, L. (2019). Generation of BSA-capsaicin nanoparticles and their hormesis effect on the *Rhodotorula mucilaginosa* yeast. *Molecules*, 24(15), 2800. doi: 10.3390/molecules24152800
- Sánchez-Solís, A., Lobato-Calleros, O., Moreno-Terrazas, R., Lappe-Oliveras, P., Neri-Torres, E. (2024). Biodiesel production processes with yeast: a sustainable approach. *Energies*, 17(2). doi:10.3390/en17020302
- Sanderson, K. (2023). COP28 climate summit signals the end of fossil fuels — but is it enough? *Nature*, 624(7992), 484-485.
- Saran, S., Mathur, A., Dalal, J., Saxena, R. K. (2017). Process optimization for cultivation and oil accumulation in an oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* A29. *Fuel*, 188, 324-331. doi: https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.09.051
- Sathiyamoorthi, E., Dikshit, P. K., Kumar, P., Kim, B. S. (2020). Co-fermentation of agricultural and industrial waste by *Naganishia albida* for microbial lipid production in fed-batch fermentation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 95(3), 813-821. doi: https://doi.org/10.1002/jctb.6271
- Sathiyamoorthi, E., Kumar, P., Kim, B. S. (2019). Lipid production by *Cryptococcus albidus* using biowastes hydrolysed by indigenous microbes. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42(5), 687-696. doi: 10.1007/s00449-019-02073-1
- Schwartz, C., Curtis, N., Löbs, A.-K., Wheeldon, I. (2018). Multiplexed CRISPR activation of cryptic sugar metabolism enables *Yarrowia lipolytica* growth on cellobiose. *Biotechnology Journal*, 13(9), 1700584. doi: https://doi.org/10.1002/biot.201700584
- Segal-Kischinevsky, C., Romero-Aguilar, L., Alcaraz, L. D., López-Ortiz, G., Martínez-Castillo, B., Torres-Ramírez, N., Sandoval, G., González, J. (2022). Yeasts inhabiting extreme environments and their biotechnological applications. *Microorganisms*, 10(4). doi:10.3390/microorganisms10040794
- Sha, Q. (2013). *A comparative study on four oleaginous yeasts on their lipid accumulating capacity*. (Second cycle, A2E MS Thesis), Swedish University of

Referencias

- Agricultural Sciences (SLU)/ Dept. of Microbiology, Uppsala. Recuperado de <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:slu:epsilon-s-2401> Disponible en Epsilon Archive for Student Projects (<https://core.ac.uk/>)
- Shaigani, P., Awad, D., Redai, V., Fuchs, M., Haack, M., Mehlmer, N., Brueck, T. (2021). Oleaginous yeasts- substrate preference and lipid productivity: a view on the performance of microbial lipid producers. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 220. doi: 10.1186/s12934-021-01710-3
- Shallom, D., Shoham, Y. (2003). Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 219-228. doi: 10.1016/s1369-5274(03)00056-0
- Shen, H., Gong, Z., Yang, X., Jin, G., Bai, F., Zhao, Z. K. (2013). Kinetics of continuous cultivation of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Journal of Biotechnology*, 168(1), 85-89. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.08.010
- Silverman, A. M., Qiao, K., Xu, P., Stephanopoulos, G. (2016). Functional overexpression and characterization of lipogenesis-related genes in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(8), 3781-3798. doi: 10.1007/s00253-016-7376-0
- Sims, R. E. H., Mabey, W., Saddler, J. N., Taylor, M. (2010). An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresource Technology*, 101(6), 1570-1580. doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.046
- Singh, G., Sinha, S., Bandyopadhyay, K. K., Lawrence, M., Paul, D. (2018). Triauxic growth of an oleaginous red yeast *Rhodospiridium toruloides* on waste 'extract' for enhanced and concomitant lipid and β -carotene production. *Microbial Cell Factories*, 17(1). doi: 10.1186/s12934-018-1026-4
- Singh, R., Shukla, A., Tiwari, S., Srivastava, M. (2014). A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 32, 713-728. doi: 10.1016/j.rser.2014.01.051
- Sitepu, I. R., Garay, L. A., Sestric, R., Levin, D., Block, D. E., German, J. B., Boundy-Mills, K. L. (2014a). Oleaginous yeasts for biodiesel: Current and future trends in biology and production. *Biotechnology Advances*, 32(7), 1336-1360. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.08.003>
- Sitepu, I. R., Selby, T., Lin, T., Zhu, S., Boundy-Mills, K. (2014b). Carbon source utilization and inhibitor tolerance of 45 oleaginous yeast species. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(7), 1061-1070. doi: 10.1007/s10295-014-1447-y
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D. (2008a). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. No. NREL/TP-510-42618

- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R. O., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. (2008b). Determination of ash in biomass. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. No. NREL/TP-510-42622
- Sluiter, A., Hyman, D., Payne, C., Wolfe, J. (2008c). Determination of insoluble solids in pretreated biomass material. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. No. NREL/TP-510-42627
- Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. (2008d). Determination of extractives in biomass. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. No. NREL TP-510-42619
- Smith, T. (2000). Color me red. *Nature Structural Biology*, 7(7), 536-536. doi: 10.1038/76741
- Sorate, K. A., Bhale, P. V. (2015). Biodiesel properties and automotive system compatibility issues. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 777-798. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.08.079>
- Spagnuolo, M., Yaguchi, A., Blenner, M. (2019). Oleaginous yeast for biofuel and oleochemical production. *Current Opinion in Biotechnology*, 57, 73-81. doi: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.011>
- Strucko, T., Andersen, N. L., Mahler, M. R., Martínez, J. L., Mortensen, U. H. (2021). A CRISPR/Cas9 method facilitates efficient oligo-mediated gene editing in *Debaryomyces hansenii*. *Synthetic Biology*, 6(1), ysab031. doi: 10.1093/synbio/ysab031
- Tada, M., Shiroishi, M. (1982). Mechanism of photoregulated carotenogenesis in *Rhodotorula minuta* v. photoinduction of 3-Hydroxy-3-Methyl Glutaryl Coenzyme A Reductase. *Plant and Cell Physiology*, 23(4), 615-621. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076388
- Takaku, H., Matsuzawa, T., Yaoi, K., Yamazaki, H. (2020). Lipid metabolism of the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(14), 6141-6148. doi: 10.1007/s00253-020-10695-9
- Tang, W., Wang, Y., Zhang, J., Cai, Y., He, Z. (2019). Biosynthetic pathway of carotenoids in *Rhodotorula* and strategies for enhanced their production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(4), 507-517. doi: 10.4014/jmb.1801.01022
- Tang, Y., Chandra, R. P., Sokhansanj, S., Saddler, J. N. (2018). Influence of steam explosion processes on the durability and enzymatic digestibility of wood pellets. *Fuel*, 211, 87-94. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.09.053>
- Tchakouteu, S. S., Chatzifragkou, A., Kalantzi, O., Koutinas, A. A., Aggelis, G., Papanikolaou, S. (2015). Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* exhibits interplay between biosynthesis of intracellular sugars and lipids. *European*

Referencias

- Journal of Lipid Science and Technology*, 117(5), 657-672. doi: <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400347>
- Tchakouteu, S. S., Kopsahelis, N., Chatzifragkou, A., Kalantzi, O., Stoforos, N. G., Koutinas, A. A., Aggelis, G., Papanikolaou, S. (2017). *Rhodospiridium toruloides* cultivated in NaCl-enriched glucose-based media: Adaptation dynamics and lipid production. *Engineering in Life Sciences*, 17(3), 237-248. doi: 10.1002/elsc.201500125
- Testa, M. L., Tummino, M. L. (2021). Lignocellulose biomass as a multifunctional tool for sustainable catalysis and chemicals: An overview. *Catalysts*, 11(1). doi:10.3390/catal11010125
- Thevenieau, F., Nicaud, J.-M. (2013). Microorganisms as sources of oils. *OCL - Oilseeds & fats, Crops and Lipids*, 20(6), D603. doi: 10.1051/ocl/2013034
- Tkáčová, J., Čaplová, J., Klempová, T., Čertík, M. (2017). Correlation between lipid and carotenoid synthesis in torularhodin-producing *Rhodotorula glutinis*. *Annals of Microbiology*, 67(8), 541-551. doi: 10.1007/s13213-017-1284-0
- Tomás-Pejó, E., González-Fernández, C., Greses, S., Kennes, C., Otero-Logilde, N., Veiga, M. C., Bolzonella, D., Müller, B., Passoth, V. (2023). Production of short-chain fatty acids (SCFAs) as chemicals or substrates for microbes to obtain biochemicals. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 16(1), 96. doi: 10.1186/s13068-023-02349-5
- Troderman, J., Shi, E. (2023). Domestic renewable diesel capacity could more than double through 2025. Fecha de último acceso: 11 de mayo de 2024. Disponible en: <https://www.eia.gov/todayinenergy/detail.php?id=55399>
- Turton, R., Bailie, R. C., Whiting, W. B., Shaeiwitz, J. A. (2013). *Analysis, synthesis and design of chemical processes*. Pearson Education International: Upper Saddle River, NJ, USA. ed. Pearson Education. 0132459183.
- Valdés, G., Mendonça, R. T., Aggelis, G. (2020). Lignocellulosic biomass as a substrate for oleaginous microorganisms: A review. *Applied Sciences*, 10(21), 7698. doi: 10.3390/app10217698
- Väljamäe, P., Kipper, K., Pettersson, G., Johansson, G. (2003). Synergistic cellulose hydrolysis can be described in terms of fractal-like kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, 84(2), 254-257. doi: 10.1002/bit.10775
- Van Wychen, S., Ramirez, K., Laurens, L. M. L. (2016). Determination of total lipids as fatty acid methyl esters (FAME) by in situ transesterification. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. No. NREL/TP-5100-60958
- Villegas-Méndez, M. Á., Montañez, J., Contreras-Esquivel, J. C., Salmerón, I., Koutinas, A. A., Morales-Oyervides, L. (2023). Scale-up and fed-batch cultivation strategy for the enhanced co-production of microbial lipids and carotenoids using

- renewable waste feedstock. *Journal of Environmental Management*, 339, 117866. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.117866>
- Wan, F., Feng, C., Luo, K., Cui, W., Xia, Z., Cheng, A. (2022). Effect of steam explosion on phenolics and antioxidant activity in plants: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 124, 13-24. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.04.003>
- Wang, J., Singer, S. D., Souto, B. A., Asomaning, J., Ullah, A., Bressler, D. C., Chen, G. (2022). Current progress in lipid-based biofuels: Feedstocks and production technologies. *Bioresource Technology*, 351, 127020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127020>
- Wang, L., Wang, H., Fan, J., Han, Z. (2023). Synthesis, catalysts and enhancement technologies of biodiesel from oil feedstock – A review. *Science of The Total Environment*, 904, 166982. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166982>
- Wasylenko, T. M., Ahn, W. S., Stephanopoulos, G. (2015). The oxidative pentose phosphate pathway is the primary source of NADPH for lipid overproduction from glucose in *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering*, 30, 27-39. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.02.007>
- Wierzchowska, K., Zieniuk, B., Fabiszewska, A. (2022). Use of non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica* in treatment or upgradation of hydrophobic industry wastes. *Waste and Biomass Valorization*, 13(2), 757-779. doi: 10.1007/s12649-021-01516-9
- Wong, B., Perfect, J. R., Beggs, S., Wright, K. A. (1990). Production of the hexitol D-mannitol by *Cryptococcus neoformans* in vitro and in rabbits with experimental meningitis. *Infect Immun*, 58(6), 1664-1670. doi: 10.1128/iai.58.6.1664-1670.1990
- Worth, K. (2023). COP28 Agreement Signals "Beginning of the End" of the Fossil Fuel Era. United Nation Climate Change. Fecha de último acceso: 20 de enero de 2024. Disponible en: <https://unfccc.int/news/cop28-agreement-signals-beginning-of-the-end-of-the-fossil-fuel-era>
- Yaegashi, J., Kirby, J., Ito, M., Sun, J., Dutta, T., Mirsiaghi, M., Sundstrom, E. R., Rodriguez, A., Baidoo, E., Tanjore, D., Pray, T., Sale, K., Singh, S., Keasling, J. D., Simmons, B. A., Singer, S. W., Magnuson, J. K., Arkin, A. P., Skerker, J. M., Gladden, J. M. (2017). *Rhodospiridium toruloides*: a new platform organism for conversion of lignocellulose into terpene biofuels and bioproducts. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1). doi: 10.1186/s13068-017-0927-5
- Yan, J., Oyedele, O., Leal, J. H., Donohoe, B. S., Semelsberger, T. A., Li, C., Hoover, A. N., Webb, E., Bose, E. A., Zeng, Y., Williams, C. L., Schaller, K. D., Sun, N., Ray, A. E., Tanjore, D. (2020). Characterizing variability in lignocellulosic biomass: A review. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(22), 8059-8085. doi: 10.1021/acssuschemeng.9b06263

Referencias

- Yu, X., Zheng, Y., Dorgan, K. M., Chen, S. (2011). Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. *Bioresource Technology*, 102(10), 6134-6140. doi: 10.1016/j.biortech.2011.02.081
- Zeng, J., Liao, S., Qiu, M., Chen, M., Ye, J., Zeng, J., Wang, A. (2020). Effects of carbon sources on the removal of ammonium, nitrite and nitrate nitrogen by the red yeast *Sporidiobolus pararoseus* Y1. *Bioresource Technology*, 312, 123593. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123593>
- Zhang, H., Zhang, L., Chen, H., Chen, Y. Q., Chen, W., Song, Y., Ratledge, C. (2014). Enhanced lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica* by over-expression of ATP:citrate lyase from *Mus musculus*. *Journal of Biotechnology*, 192, 78-84. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.10.004>
- Zhang, Y., Bao, J. (2022). Tolerance of *Trichosporon cutaneum* to lignin derived phenolic aldehydes facilitate the cell growth and cellulosic lipid accumulation. *Journal of Biotechnology*, 343, 32-37. doi: 10.1016/j.jbiotec.2021.09.009
- Zoz, L., Carvalho, J. C., Soccol, V. T., Casagrande, T. C., Cardoso, L. (2015). Torularhodin and Torulene: bioproduction, properties and prospective applications in food and cosmetics - A Review. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(2), 278-288. doi: 10.1590/s1516-8913201400152



PUBLICACIONES

Listado de publicaciones

Artículo I.

Gallego-García, M., Susmozas, A., Moreno, A. D., Negro, M. J. (2022). **Evaluation and identification of key economic bottlenecks for cost-effective microbial oil production from fruit and vegetable residues.** *Fermentation*, 8(7), 334.

Artículo II.

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.** *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 16(1), 21.

Artículo III.

Gallego-García, M., Moreno, A. D., Manzanares, P., Negro, M. J., Duque, A. (2023). **Recent advances on physical technologies for the pretreatment of food waste and lignocellulosic residues.** *Bioresource Technology*, 369, 128397.

Artículo IV.

Gallego-García, M., Susmozas, A., Negro, M. J., Moreno, A. D. (2023). **Challenges and prospects of yeast-based microbial oil production within a biorefinery concept.** *Microbial Cell Factories*, 22(1), 246.

Artículo V.

Maresca di Serracapriola, G., Hapeta, P., Klemm, C., Gallego-García, M., Bethell, D., Ledesma-Amaro, R. (2024). **Sustainable production of a blue natural pigment through precision fermentation using engineered yeast.** *Nature Chemical Engineering* (Enviado – bajo revisión).

ARTÍCULO I

Article

Evaluation and Identification of Key Economic Bottlenecks for Cost-Effective Microbial Oil Production from Fruit and Vegetable Residues

María Gallego-García ^{1,2,†}, Ana Susmozas ^{1,*,†} , Antonio D. Moreno ¹  and María José Negro ¹

¹ Advanced Biofuels and Bioproducts Unit, Department of Energy, CIEMAT, 28040 Madrid, Spain; maria.gallego@ciemat.es (M.G.-G.); david.moreno@ciemat.es (A.D.M.); mariajose.negro@ciemat.es (M.J.N.)

² Department of Biomedicine and Biotechnology, Universidad de Alcalá, 28801 Alcalá de Henares, Spain

* Correspondence: anaisabel.susmozas@ciemat.es; Tel.: +34-91-346-6054

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Intensive horticultural systems for the production of vegetables in greenhouses represent one of the main industries generating organic waste, as those that do not meet the quality standards for the fresh market or the processing industry are discarded. This highlights the importance of using these residues as raw material for other applications, such as bioenergy and bioproducts production, within the framework of a bio-based economy that maximizes the utilization of biomass resources in a sustainable manner. In this work, the microbial oil production from discarded pepper using the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* was evaluated. Overall, a total lipid accumulation of 16.8 g/L was achieved with a fatty acid profile suitable to produce biodiesel. The lipid yield obtained was 0.12 g/g sugars. In addition, experimental results were used to assess the techno-economic feasibility of a proposed microbial oil plant using the software Aspen Plus. This plant yields approximately 96 kg of microbial oils/ton dry discarded pepper, with an estimated Minimum Selling Price of 7 €·kg⁻¹. These figures point out the necessity of increasing the yield of microbial oil production and considering the utilization of possible by-products, such as mannitol and cell debris, to improve the economic performance of the process.

Keywords: lipid; agri-food residues; oleaginous yeast; microbial oil; techno-economic analysis



Citation: Gallego-García, M.; Susmozas, A.; Moreno, A.D.; Negro, M.J. Evaluation and Identification of Key Economic Bottlenecks for Cost-Effective Microbial Oil Production from Fruit and Vegetable Residues. *Fermentation* **2022**, *8*, 334. <https://doi.org/10.3390/fermentation8070334>

Academic Editor: Seraphim Papanikolaou

Received: 27 May 2022

Accepted: 13 July 2022

Published: 15 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The biorefinery concept, linked to the bio-based economy, has the general objective of integrating different processes for converting biomass into bioenergy and bioproducts of interest, getting waste/emission reduction, minimizing the exploitation of new resources, and valuing from feedstocks to by-products and final product according to the European Energy Research Alliance [1]. Inexpensive carbon sources and the use of optimized processes can lead to an increase in cost-effectiveness because of the reduction of economic and energy costs. One of the different strategies to achieve these objectives is the search of new sources of low-cost raw materials.

The importance of the fruit and vegetable sector in Europe is reflected in the magnitude of the total annual output value estimated, which was 60.7 billion euros in 2021. About 58% of this value corresponded to fresh vegetables. In 2020, the European Union countries (EU-27) produced 2.90 million tons of peppers and around 50% came from Spain [2]. In addition, more than 85% are produced under glass or accessible cover. The fruit and vegetable sector and, in particular, the horticultural intensive type systems dedicated to the production of greenhouse vegetables, represent one of the main industries generating organic waste. One of the organic residues generated in large volumes is the sorted pepper fruits that do not meet grade standards for either the fresh market or the processing industry. These fruits being commonly damaged, diseased, too small, and/or misshapen are among

the major discarded reasons. About 7–10% of peppers produced are sorted depending on crop type and market situation [3]. In the region of Almeria (Spain)—an area with a high concentration of greenhouses—the estimated volume of waste produced in 2021 accounted to 73,000–100,000 tons. These vegetable wastes traditionally ended up in landfills or were utilized for compost production [4]. However, nowadays, these residues are transferred to external waste management companies and authorized recycling plants for their treatment and recovery process, implying an extra cost to the farms. This highlights the importance of employing greenhouse crop residues as raw material for other applications, such as renewable energy sources, thus giving them a new added value [5]. Therefore, an attractive alternative to using this waste, rich in organic matter, is the production of biofuels and high-added value bio-products in a biorefinery concept.

Among the most attractive and promising feedstocks for biofuel production are microbial oils obtained from oleaginous organisms such as yeasts, microalgae, fungi, and bacteria [6]. Yeasts have certain advantages over the others mentioned, such as a short life cycle compared to fungi, a more suitable size for harvesting compared to bacteria, no dependence on light and climate unlike microalgae, as well as greater robustness in tolerating inhibitory compounds and growing using a diversified range of sugars and substrates [7]. These microorganisms can accumulate up to 70–80% of intracellular lipids per dry weight [8] and the fatty acid profile obtained presents an adequate composition for biodiesel manufacturing [9,10], as the oil obtained is rich in saturated and monounsaturated fatty acids [10].

In this study, the production of microbial oil for its subsequent transformation into biodiesel using fruits and vegetable residues, specifically discarded pepper waste (DPW), as feedstock is evaluated. The oleaginous yeasts *Cryptococcus curvatus* were selected for lipid production, as this yeast was previously used for this purpose [11]. The evaluation of the economy of new processes is essential to assess its competitiveness in the current market and to identify the main bottlenecks of the process [12]. Therefore, the present work also presents a techno-economic evaluation of the microbial oil production from discarded pepper residues using the experimental results obtained in our laboratory. For this purpose, the proposed processing plant was first modelled by the process simulation software Aspen Plus. The resulting simulation data were used as a basis for studying the economic viability of microbial oil production system.

2. Materials and Methods

2.1. Raw Material

The raw material used in this study has its origin in the horticultural sector of Spain. Among the different agri-food residues generated, DPW has been selected as a low-cost raw material to obtain a suitable microbial culture medium. The DPW was cut and crushed using a Danamix TR/bM-330 industrial blender for homogenization. After homogenization, the solid and liquid fractions were collected in a basket centrifuge (RTL2BD COMTEIFA). The liquid fraction was used as a culture medium after sterilization by filtration (Nalgene Rapid Flow™ 0.22 µm).

2.2. Microbial Oil Production

The oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* CL6032 from Biobanco Nacional del Instituto de Salud Carlos III (BBN-ISCI) was used in this study for the production of microbial oil. The liquid fraction of the DPW has been selected as the culture medium, as indicated in the previous section. Yeast cells were propagated in yeast extract-peptone-dextrose (YPD) medium containing 20 g/L glucose, 20 g/L peptone, and 10 g/L yeast extract. One loop of yeast cells was transferred to 50 mL YPD into 250-mL Erlenmeyer baffled flasks and incubated in a rotary shaker at 26 °C and 180 rpm for 24 h. Then, cells were harvested by centrifugation (3000× g, 5 min), washed once with sterile water, and inoculated into the corresponding fermentation media at an OD_{600nm} of 1–1.5. Fermentation was carried out in 0.5 L Applikon bioreactors (Applikon, Delft, The Netherlands) to better control

the conditions established with a culture volume of 0.25 L. The parameters set for lipid accumulation were 28 °C, pH 6, 1 vvm, and variable stirring to maintain dissolved oxygen at a 20% (*v/v*) from air saturation concentration. Samples were periodically collected to monitor the optical density by spectrophotometry at $\lambda = 600$ nm. The cell biomass was also measured by dry cell weight (DCW) using a pre-weighed 0.22 μm nitrocellulose membrane to filter the cells and a microwave (750 W for 10 min) to dry cell biomass. The sugar consumption was analyzed by HPLC, as described below in Section 2.3.1.

A pulse-feeding strategy was selected as the cultivation mode with a pure glucose solution. Glucose source pulses were added when sugar levels in the culture broth were relatively low or an increase of dissolved oxygen was observed. Two glucose pulses were added during the test to have a final concentration in the medium of 50 g/L per pulse. For this purpose, 50 mL of fermented medium were first collected to analyze sugars and cell biomass concentration and the intracellular lipid content. Then, the same volume of a concentrated pure glucose solution was added to have the final aforementioned glucose concentration. After 143 h of fermentation, all the cell biomass was collected by centrifugation at $5000\times g$ and 4 °C for 15 min, washed with sterile water, and freeze-dried to proceed with the lipid extraction protocol.

2.3. Analysis

2.3.1. Raw Material and Culture Medium Composition

The carbohydrate content of the DPW fractions was analyzed following methods described elsewhere [13]. Sugar composition of the raw material and pulses, as well as the monitoring of sugar consumption by the yeast, was analyzed using HPLC Waters Alliance 2695 equipment, with a refractive index detector (detector 2414) equipped with a Carbo Sep CHO 782 chromatographic column (Transgenomic, Omaha, NE, USA) at a temperature of 70 °C. Degassed ultrapure water with 0.5 mL/min flow was used as a mobile phase. The determination of the nitrogen content in the medium was carried out according to the Kjeldahl method.

2.3.2. Lipids and Fatty Acid Profile Determination

To determine the total percentage of lipids accumulated in the cells, a cell lysis and lipid extraction protocol with 3.2 mL of HCl 4M at 55 °C for 2 h and a mixture of chloroform/methanol (2:1 *v/v*) at 20 °C for 3 h, respectively, were applied. Finally, after centrifugation at $2000\times g$ for 15 min, the lipids were collected in the chloroform phase that was evaporated under a nitrogen stream and were quantified using the gravimetric method (data are expressed as g lipid/100 g dry cell biomass) [14].

For the analysis of the fatty acid profile and its quantification, a gas chromatograph (Agilent 7890A) was used, equipped with a flame ionization detector (FID) and a split injector. A polysiloxane capillary column DB-23 (Agilent, Santa Clara, CA, USA), length 30 m and 25 mm id, the split ratio was 1/20, the injector temperature was 250 °C, and the detector temperature was 280 °C, respectively. This analysis was carried out following the determination of total lipids as fatty acid methyl esters (FAME) protocol previously described by NREL [15].

2.4. Techno-Economic Assessment

2.4.1. Process Description

Based on the experimental results obtained in this work, a microbial oil production plant design using DPW as raw material is proposed. According to the amount of DPW produced in Almeria, the projected annual capacity of the proposed plant is 100,000 tons per year of DPW. Figure 1 shows a simplified diagram, including the main stages of the proposed microbial oil production process.

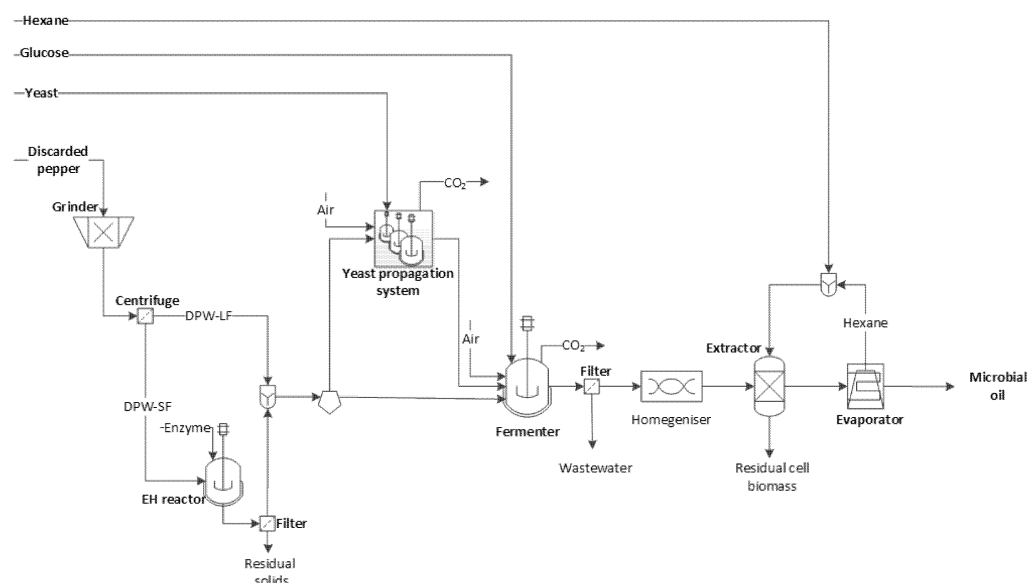


Figure 1. Simplified diagram of the microbial oil production plant based on discarded peppers.

First, in the processing plant, the DPW raw material is crushed. The resulting stream is then subjected to a solid–liquid separation in a decanter centrifuge, resulting in a solid fraction (DPW-SF) containing mainly glucans and a liquid fraction (DPW-LF) with glucose and fructose as the main components. Then, the solid fraction undergoes an enzymatic hydrolysis (EH) process at 20% (*w/w*) solid loading, producing a sugar-rich media stream. This process is carried out at 50 °C with 150 mg/g of glucans of cellulase enzyme blend (Sigma Aldrich, Saint Louis, MI, USA) for 72 h, reaching an EH yield of 65.0% of the theoretical [16,17]. After HE, the resulting stream is filtered to remove the residual insoluble solids and mixed with the DPW-LF stream. Then, 10% of the resulting stream is used for cell propagation using the oleaginous yeast *C. curvatus* CL6032. The rest of the liquid stream obtained is then subjected to fermentation process to microbial oil production. This fermentation process is operated in a fed-batch mode with the addition of pure glucose (1.7 g glucose/g sugars in DPW) at 28 °C and 0.4 vvm for 140 h. The cell propagation phase is carried out in batch mode for 24 h using the same conditions as the fermentation phase. After fermentation, cells are harvested and mechanically disrupted in a homogenizer. Subsequently, the stream obtained is subjected to an extraction process with hexane (25% (*w/w*) yeast in hexane), followed by an evaporation process in order to collect the microbial oils and recover the hexane [18]. Approximately 67.3% lipid recovery yield is achieved [18]. Finally, the hexane stream is recirculated into the extraction unit.

2.4.2. Data Acquisition

The microbial oil production system was modelled in Aspen Plus v12.0 (Aspen Technology Inc., Bedford, MA, USA) for obtaining all the data required for the techno-economic evaluation. Physical property data for cellulose, hemicellulose components, and enzymes were taken from the literature [19]. The Non-Random Two Liquid (NRTL) thermodynamic model was used.

The simulation of the main units of the processing plant is described below. The enzymatic hydrolysis unit was modelled using a stoichiometric block (RStoic block). The microbial oil production in the fermentation reactor was also simulated based on a stoichiometric approach. For this purpose, a series of stoichiometric reactions representing the microbial growth and the microbial oil accumulation phases were implemented [20]. The yeast propagation process was simulated similarly to the fermentation reactor, but in this case, only the reactions associated with the microbial oil growth phase were considered. The reactions considered to model the fermentation and yeast propagation processes are summarized in Table 1.

Table 1. Reactions included in the simulation model.

Process	Reaction
Microbial growth	C6 sugars + 4.3 O ₂ + 0.35 amino acid → yeast + 4.1 CO ₂ + 5.2 H ₂ O
Microbial growth	C5 sugars + 3.3 O ₂ + 0.35 amino acid → yeast + 3.1 CO ₂ + 4.2 H ₂ O
Microbial oil accumulation	13.5 C6 sugars + O ₂ → C ₅₇ H ₁₀₄ O ₆ + 24 CO ₂ + 29 H ₂ O
Microbial oil accumulation	12.5 C6 sugars + 2.5 O ₂ → C ₅₁ H ₉₈ O ₆ + 24 CO ₂ + 26 H ₂ O
Microbial oil accumulation	13.5 C6 sugars + 2.5 O ₂ → C ₅₇ H ₉₈ O ₆ + 24 CO ₂ + 32 H ₂ O
Microbial oil accumulation	14 C6 sugars + 2.5 O ₂ → C ₅₇ H ₁₁₀ O ₆ + 27 CO ₂ + 29 H ₂ O

In this model, the yeast cell biomass was defined as C₄H_{6.5}O_{1.9}N_{0.7} and its physical properties were calculated according to Popovic [21]. As a nitrogen source in the microbial growth phase, all the required nitrogen was considered to be present in the raw material in the form of organic nitrogen. In this simulation, this component was modelled as an amino acid, specifically defined as lysine. The elemental composition of triglycerides was defined based on the primary fatty acids obtained in the lipid profile. All these triglycerides were defined considering each acid as the only fatty acid of each triglyceride: oleic acid-based triglyceride (C₅₇H₁₀₄O₆), palmitic acid-based triglyceride (C₅₁H₉₈O₆), linoleic acid-based triglyceride (C₅₇H₉₈O₆), and stearic acid-based triglyceride (C₅₇H₁₁₀O₆).

Based on the results of the mass and energy balances generated in the simulation, the capital and operating costs were calculated using the software Aspen Economic Analyzer V12.0 (Aspen Technologies, Inc., Bedford, MA, USA). To evaluate the economic viability of the process, the Net Present Value (NPV) and the minimum selling price (MSP) were calculated. The NPV (Equation (1)) is an effective parameter for determining whether a project is potentially profitable ($NPV > 0$) or unprofitable ($NPV < 0$). The MSP is defined as the minimum price at which the profitability of a project is zero, i.e., there is no profit or losses, and is estimated as the value at which the NPV equals zero.

$$NPV = \sum_{t=0}^n \frac{C_t}{(1+i)^t} \quad (1)$$

where t , n , i , and C_t indicate the project year, project lifetime, discount rate, and net cash inflow–outflows in year t , respectively. The analysis was made in euros for a 20-years life period, and depreciation expenses were calculated using the straight-line method. The interest rate and the income tax were fixed at 10% and 25%, respectively [22]. Table 2 shows raw material, chemicals, utilities, and labor costs.

Table 2. Market prices of the raw material, chemicals, utilities, and labor.

Compound	Value	Unit	Comment
DPW	−6.0	€/t	[23]
Enzyme	284.0	€/t	[24]
Process Water	1.3	€/m ³	[25]
Glucose	384.0	€/t	[26]
Hexane	491.5	€/t	[27]
Cooling Water	3.9	€/m ³	[28]
Electricity price	80.0	€/MWh	[29]
Steam	14.1	€/GJ	[28]
Labor cost	2874.0	€/worker·month	[30]

3. Results and Discussion

3.1. Raw Material Composition

Table 3 shows the composition of the DPW, the raw material used in microbial oil production, which was the starting point for calculating yields in the different stages proposed in this study. The chemical composition of this material had a high percentage of extractable compounds (61.4%), of which 94.2% are extractable compounds in water,

with sugars as the main element. These extractable compounds were mainly made up of fructose (28.5%) and glucose (18.1%). The total extractable sugars in the DPW account for 50.7%. The content of structural carbohydrate analyzed was 11.0%, glucans being the major component, followed by mannans. These carbohydrates could be used by performing a hydrolysis stage with enzymatic catalysts and then used as a carbon source in the culture of oleaginous yeasts. The DPW presents a total of 62.8 g of potential sugars per 100 g of dry DPW. Therefore, this material could be used to produce microbial oil in a biotransformation process mediated by oleaginous yeast. It should be noted that 80% of potential sugars are presented in the aqueous extract.

Table 3. Discarded pepper waste (DPW) composition. Data expressed as percentage (*w/w*) on dry weight (DW) basis.

Component	% (<i>w/w</i>)
Organic solvent-extract	3.6 ± 0.1
Aqueous extract:	57.8 ± 1.2
Glucose	18.1 ± 0.5
Fructose	28.5 ± 0.0
Sucrose	2.2 ± 0.1
Galactose	0.6 ± 0.0
Xylose	0.4 ± 0.1
Arabinose	0.2 ± 0.0
Mannose	0.7 ± 0.0
Glucan	5.6 ± 0.12
Xylan	1.4 ± 0.1
Galactan	1.1 ± 0.0
Arabinan	0.7 ± 0.0
Mannan	2.2 ± 0.1
Acetyl groups	0.9 ± 0.2
Acid-insoluble lignin	17.1 ± 0.5
Whole Ash	5.5 ± 0.1

In order to recover the sugars contained in the extractable fraction, a simple fractionation was carried out, which combines a mechanical stage by crushing and homogenization and a separation by centrifugation. This resulted in two separate fractions—the DPW-LF and DPW-SF fraction. Table 4 includes the composition of both fractions. The available sugars in the DPW-LF fraction were approximately 60 g/L (glucose and fructose). The nitrogen concentration was approximately 1.7 g/L.

Table 4. DPW-LF and DFW-SF fraction composition.

DPW-LF Composition	Concentration, g/L	DPW-SF Composition	%, <i>w/w</i>
Glucose	24.3 ± 0.8	Organic solvent-extract	10.8 ± 2.4
Xylose	0.4 ± 0.0	Aqueous extract:	23.0 ± 2.2
Galactose	0.4 ± 0.1	Sugars	7.3 ± 3.7
Arabinose	0.1 ± 0.0	Glucan	21.3 ± 1.1
Mannose	0.4 ± 0.2	Xylan	2.3 ± 0.1
Fructose	35.7 ± 1.5	Galactan	2.7 ± 0.1
Sucrose	0.5 ± 0.2	Arabinan	0.7 ± 0.0
Mannitol	0.4 ± 0.0	Mannan	2.1 ± 0.2
Total nitrogen	1.7 ± 0.0	Acetyl groups	0.9 ± 0.2
		Acid-insoluble residue	17.1 ± 0.5
		Whole Ash	3.1 ± 0.0
		Total Nitrogen	2.0 ± 0.3

3.2. Microbial Oil Production

The accumulation of microbial oil was favored with the fed-batch strategy by adding glucose pulses, as presented in Table 5. The DPW-LF supported yeast growth, as can be seen in Figure 2, reaching a biomass concentration of more than 38 g/L of DCW within 24 h and more than 40 g/L of DCW at the end of the process. Sugars were depleted after 21 h of cultivation. At that time, a pulse of glucose was added to continue with the process following the fed-batch strategy (Figure 2). This step was repeated before complete glucose depletion at 53 h to avoid lipid consumption by the yeast, since it may use the lipid as a carbon and energy source in the absence of sugars, and therefore lipid accumulation would be reduced [31]. During the fed-batch process, mannitol was also found in the cultivation media, as depicted in Figure 2, reaching up to 28 g/L. The literature reports the ability of other yeasts to produce mannitol, such as the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* [32], but it had not been reported in *C. curvatus* previously.

Table 5. Lipid content and lipid production by *C. curvatus* at the start and end of the test and before the two glucose pulses added.

	Lipid Content (% <i>w/w</i>)	Lipid Production (g/L)
Initial	7.0	0.2
Before the first glucose pulse	8.6	3.3
Before the second glucose pulse	14.3	6.2
Final	32.6	16.8

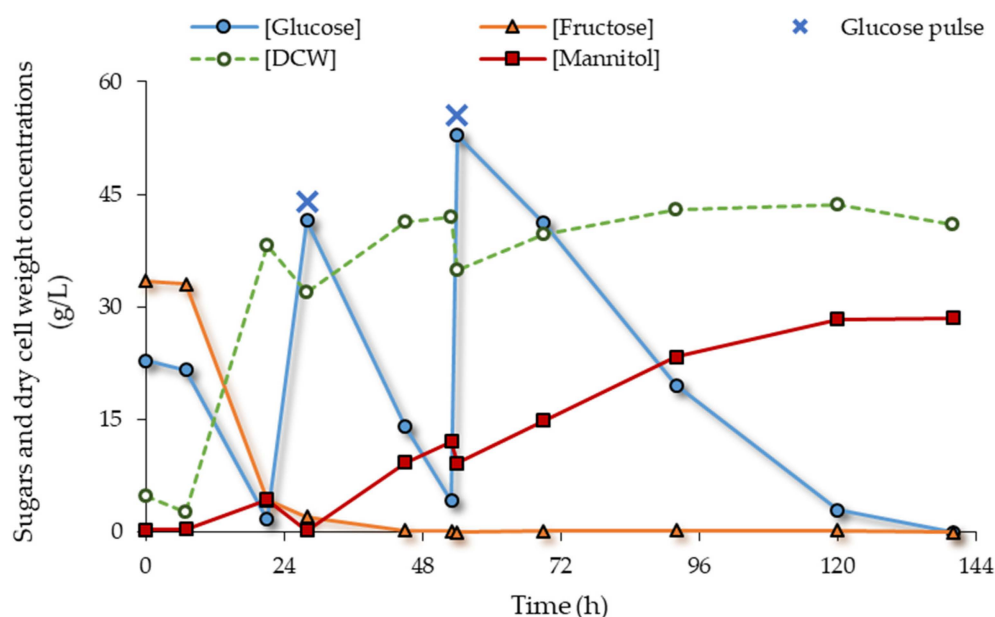


Figure 2. Time course of sugars and cell biomass during the fed-batch culture by *C. curvatus* on DPW-LF through glucose pulses.

The lipid content at time 0 h was 7.0% (*w/w*) of the total DCW, representing the lipid content that these cells naturally present in their membranes and organelles since they have not yet started the accumulation phase. Before the first pulse (21 h), the lipid content was 8.6% (*w/w*) of DCW, which increases to 14.3% (*w/w*) of DCW before the second pulse of glucose (53 h) and to 32.6% (*w/w*) of DCW at the end of the assay (143 h), reaching 16.8 g/L of lipids (Table 5). Under the nitrogen-limited condition and in the absence of other nutrient sources, the addition of a carbon source to the medium triggers the lipid biosynthesis in this oleaginous yeast [33–35].

Concerning FAME content in yeasts, a maximum of 29.2% was reached at the end of the assay. Oleic (C18:1), palmitic (C16:0), and linoleic (C18:2) acids represented 90% of the total

fatty acid profile at the end of the experimental trial (Table 6). This fatty acid composition is similar to vegetable oils with potential for biodiesel production (Figure 3), with a profile composed predominantly of 16 and 18 carbon atoms [31] (Table 6). The balance between long-chain fatty acids, saturated and unsaturated, indicates an appropriate composition in the profile in terms of biodiesel properties. The saturated ones improve the oxidative stability and cetane index and the unsaturated ones improve the properties of cold flow and pour point [36].

Table 6. Fatty acid composition represented as % (*w/w*) of the total lipid produced by *C. curvatus* before and after the fermentation process and before each glucose pulse.

	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Initial	11.1	0.0	9.9	30.1	35.2	13.4
Before the first glucose pulse	15.2	0.0	6.7	50.2	21.7	6.1
Before the second glucose pulse	22.3	0.0	8.0	53.5	13.2	3.0
Final	27.4	1.3	5.1	50.7	13.3	2.2

C16:0 (Palmitic acid), C16:1 (Palmitoleic acid), C18:0 (Stearic acid), C18:1 (Oleic acid), C18:2 (Linoleic acid), C18:3 (Linolenic acid).

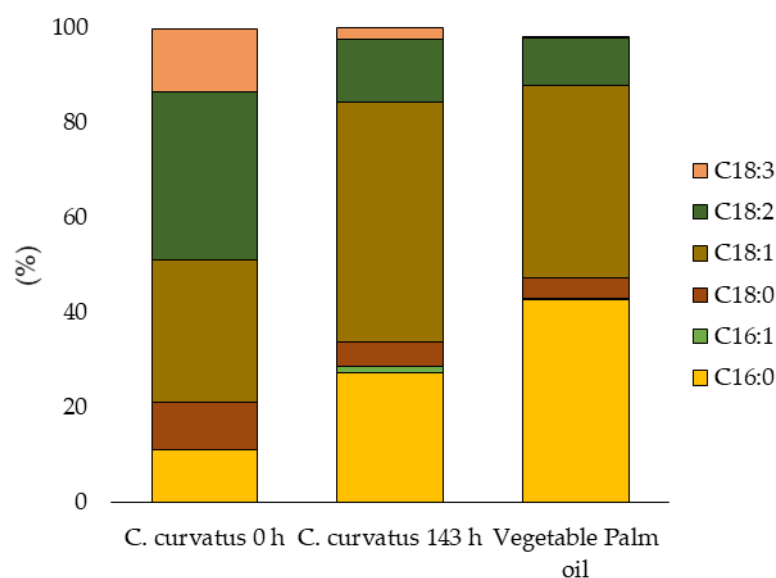


Figure 3. Comparison between the fatty acid profile of the lipids produced by *C. curvatus* at 0 h and 143 h, and the profile resulting from vegetable palm oil. Data source for vegetable palm oil: Demirbas [37].

In order to compare the lipid yield achieved in this work with other works in the literature, Table 7 summarizes the results of lipid production by different strains of *C. curvatus* growing on other low-cost carbon sources.

The lipid yield obtained in this work was 0.12 g/g sugars. This lipid yield was higher than that obtained by Carota et al. [9], growing *C. curvatus* NRRLY on orange peel waste and under batch culture conditions. However, as can be noted in Table 7, this result is lower than others reported in the literature, with *C. curvatus* cultivated in fed-batch strategy. For instance, a lipid yield of 0.18 g/g sugars was obtained with *C. curvatus* ATCC 20509 grown in organosolv-pretreated corn stover enzymatic hydrolysate [39], and in deproteinized cheese whey and wine lees hydrolysate [40]. The lower yield in lipids compared to other studies may be due to the high yield in cell biomass concentration reached in this work (0.43 g DCW/g sugar), along with the coproduction of process by-products, such as mannitol. In contrast, this process can benefit from avoiding complex pretreatments to obtain free sugars from these types of raw material, since it is mainly composed of monomeric sugars as previously discussed.

Table 7. Metrics of lipid production by several *C.curvatus* strain growing on low-cost carbon source.

Yeast	Culture Mode	Carbon Source	Lipid (g/L)	Lipid (w/w)	Lipid Yield (g/g)	Reference
NRRLY-1511	Batch (shake flasks)	Orange peel waste	1.74	15	0.09	[9]
ATCC 20509 ^a	Fed-batch (Bioreactor)	Wheypermeate	26.0 ^b	35	-	[38]
ATCC 20509	Fed-batch (Bioreactor)	Corn stover enzymatic hydrolysates	31.3	61.7	0.18	[39]
ATCC 20509	Fed-batch (Bioreactor)	Deproteinized cheese whey and wine lees hydrolysate	33.1	49.6	0.18	[40]
ATCC 20509	Fed-batch (Bioreactor)	Crude glycerol	31.2–32.9 ^c	44.2–52.9	0.21–0.26 ^c	[41]
CL6032	Fed-batch (Bioreactor)	Discarded pepper	16.8	32.6	0.12	This work

^a *Apiotrichum curvatum*; ^b Estimated based on [39]; ^c Estimated based on [42].

3.3. Techno-Economic Assessment Results

Considering the model described in Section 2.4, the amount of microbial oil produced, along with the material and energy inputs obtained from the process simulation, are shown in Table 8. The amount of microbial oil obtained for a 300 tons per day DPW biomass plant is 3.5 tons per day. These values correspond to a total yield of 96 kg of microbial oils per ton of dry DPW raw material. In a similar study performed by Koutinas et al. [20], higher microbial oil yields (approximately 230 kg per ton of dry raw material) were obtained. However, these results are not comparable since that study used pure glucose as the sole raw material, and assumed higher glucose to lipids conversion yields, 0.23 g of lipids/g of sugars compared to the 0.12 g of lipids/g of sugars obtained in this study, with DPW as raw material and a pulse-feeding strategy.

Table 8. Main material and energy inputs and outputs of the microbial oil process studied.

Compound	Amount	Unit
DPW	100,000	t/year
Enzyme	68	t/year
Process Water	9096	m ³ /year
Glucose	8496	t/year
Hexane	257	t/year
Cooling Water	220,250	GJ/year
Steam	3673	GJ/year
Electricity	44,063	MWh/year
Microbial oil	1153	t/year

With the aim of evaluating the economic feasibility of the proposed microbial oil production system, both total project costs (including installed equipment costs and other costs such as field expenses, project contingencies, engineering costs, etc.) and operating costs were calculated from the simulation data. A total installed equipment cost of €30.3 million and a total project cost of €48.4 million were obtained.

The annualized operating cost obtained for the microbial oil production plant is presented in Table 9. Operating cost includes all material (DPW raw material, chemical compounds, enzymes, and water), utilities, depreciation expense, labor cost, maintenance and administrative cost, and insurance. The utilities consumed were identified as the most significant contributor to the total operating cost, accounting for approximately 35% of the cost. This high contribution is due to the electricity consumed in the process, mainly associated with the agitation and aeration of the fermenters and yeast propagation reactors necessary to produce the microbial oil. Similar results have been found by other

authors [18,20], who identify the bioconversion section as the major contributor to the electricity consumption of the process. Depreciation expense and inputs also show significant contributions with shares of 19% and 17% of total operating cost, respectively.

Table 9. Annualized operating cost for the microbial oil process studied.

	Cost	Unit
Inputs	2.1	M€/year
Utilities	4.4	M€/year
Depreciation expense	2.4	M€/year
Labor cost	1.8	M€/year
Maintenance	1.5	M€/year
Administration and insurance	0.3	M€/year
Total operating cost	12.6	M€/year

Figure 4 shows the contribution of each input category to the total input cost. Total input costs are dominated by the cost of the pure glucose added to the fermenters, accounting for approximately 94% of the total input cost. The remaining inputs contribute individually with percentages below 5%.

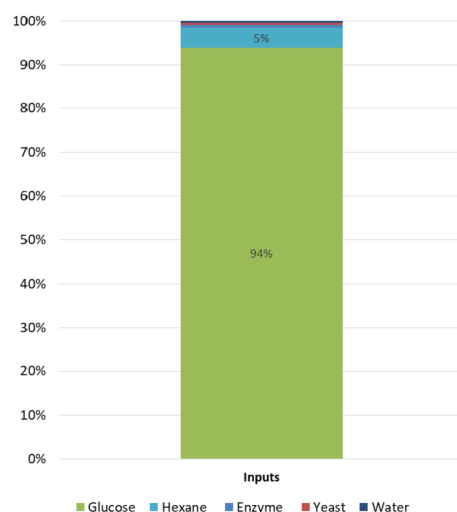


Figure 4. Share of each input category to the total input cost.

The economic feasibility of the proposed plant was evaluated by estimating the MSP of the microbial oil and comparing this value with that of conventional vegetable oils and other values reported in the literature. According to Section 2.4.1, the microbial oil MSP is estimated as the value at which the NPV equals zero. For the present modelled plant with a production of 1153 t/year of microbial oil, the estimated MSP of the microbial oil was approximately 17 €/kg. This value is substantially higher than the price for common vegetable oils (1–2 €/kg) [42] and exceeds the price estimated in other similar models presented in the literature. For instance, Koutinas et al. [20] obtained a price of approximately 5.2 €/kg using pure glucose as raw material. Parsons et al. [42] reported a MSP between 4 and 14 €/kg depending on the scale of the plant (100–10,000 t/year) and the raw material used (sucrose or wheat straw). However, these studies assumed an overall sugar to microbial oil yield of about 0.23–0.28 g/g of sugars, which is approximately 2–2.5 times higher than the present model. These results point to the necessity of increasing the yield of microbial oil production. To evaluate this point, the influence of microbial oil yield on the MSP is illustrated in Figure 5. In this process, to achieve an MSP lower than 7 €/kg, it would be necessary to reach microbial yields close to the theoretical.

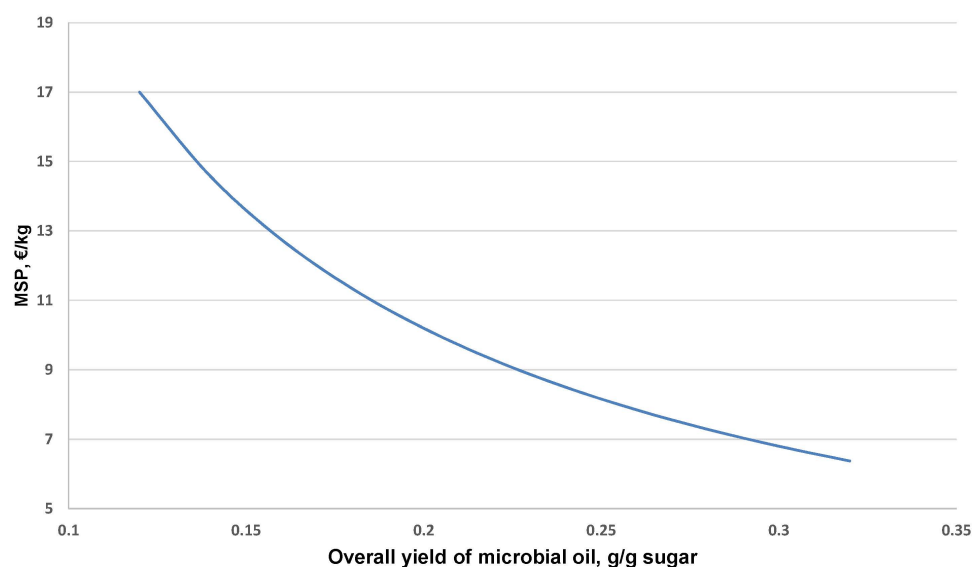


Figure 5. Influence of overall microbial yield on the microbial oil MSP.

Although the plant presented does not show a high economic performance compared to other studies in the literature, it is important to remark that the production of microbial oils from residual feedstocks, such as discarded vegetables and fruits, is in the early stages of research. Therefore, these bioprocesses have a wide margin for improvement. In addition, other high value-added bioproducts not considered in this economic analysis, such as the use of cell debris for animal feeding and/or the coproduction of mannitol, could be obtained, contributing to the economy of this process from a biorefinery perspective and significantly improving the profitability of the plant.

4. Conclusions

In this work, the microbial oil production from discarded pepper using the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* was evaluated. Through this process, the production of lipids with a fatty acid profile suitable for use in biodiesel together with other valuable compounds, such as mannitol, was achieved. The software Aspen Plus was successfully applied using the experimental results to obtain the mass and energy balance needed for the techno-economic evaluation of the microbial oil plant proposed. Although the MSP of microbial oil obtained in the proposed plant is quite high, the use of fruits and vegetables residues represent a novel approach in this kind of processes that can be further optimized. The electricity consumed in the process, associated with the agitation and aeration of the fermenters and yeast propagation reactors, along with the cost of the pure glucose added to the fermenters during the pulses, are identified as the main contributors to the operations cost. These results point out the need to increase the yield of microbial oil production, to the search for a more economical alternative carbon source to pure glucose, and to consider the utilization of possible by-products, such as mannitol and cell debris, to improve the economic performance of the process.

Author Contributions: Conceptualization, A.S., A.D.M. and M.J.N.; Writing—original draft preparation, M.G.-G., A.S. and A.D.M.; writing—review and editing, M.G.-G., A.S., A.D.M. and M.J.N.; Visualization, A.S.; Supervision, M.J.N.; funding acquisition, M.J.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research has been supported by the project BIOMIO+CAR (PID2020-119403RB-C2-2) funded by MCIN/AEI/ (10.13039/501100011033) and the project ACMIBIO-HE (ENE2017-86864-C2-1-R) funded by MCIN/AEI/ (10.13039/501100011033) and by “ERDF A way of making Europe”. M.G.-G. also acknowledges the PRE2018-086317 grant funded by MCIN/AEI/(10.13039/501100011033) and by “ESF Investing in your future”.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data related to this study is reported within this article.

Acknowledgments: Authors thanks Albaida Residuos S.L. for providing the raw material used in this study. IMDEA Energy is also acknowledged for providing the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* CL6032.

Conflicts of Interest: The authors declare that they do not have any conflicts of interest.

References

1. Carrasco, J.E.; Monti, A.; Tayeb, J.; Kiel, J.; Gírio, F.; Matas, B.; Santos Jorge, R. *This Strategic Research and Innovation Agenda SRIA 2020*; EERA Bioenergy Joint Programme; JPI Cultural Heritage: Paris, France, 2020.
2. Eurostat. Available online: <https://ec.europa.eu/eurostat/data/database> (accessed on 22 April 2022).
3. García-Poveda, P.J. Estudio Comparativo de Variedades de Pimiento Tipo California Amarillo Cultivadas en Invernadero en la Provincia de Almería. Ph.D. Thesis, Universidad de Almería, Almería, Spain, 2020.
4. Duque-Acevedo, M.; Belmonte-Ureña, L.J.; Plaza-Úbeda, J.A.; Camacho-Ferre, F. The management of agricultural waste biomass in the framework of circular economy and bioeconomy: An opportunity for greenhouse agriculture in southeast Spain. *Agronomy* **2020**, *10*, 489. [\[CrossRef\]](#)
5. Reinoso Moreno, J.V.; Pinna-Hernández, G.; Fernández Fernández, M.D.; Sánchez Molina, J.A.; Rodríguez Díaz, F.; López Hernández, J.C.; Acién Fernández, F.G. Optimal processing of greenhouse crop residues to use as energy and CO₂ sources. *Ind. Crop. Prod.* **2019**, *137*, 662–671. [\[CrossRef\]](#)
6. Patel, A.; Antonopoulou, I.; Enman, J.; Rova, U.; Christakopoulos, P.; Matsakas, L. Lipids detection and quantification in oleaginous microorganisms: An overview of the current state of the art. *BMC Chem. Eng.* **2019**, *1*, 13. [\[CrossRef\]](#)
7. Qin, L.; Liu, L.; Zeng, A.-P.; Wei, D. From low-cost substrates to single cell oils synthesized by oleaginous yeasts. *Bioresour. Technol.* **2017**, *245*, 1507–1519. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Rakicka, M.; Lazar, Z.; Dulermo, T.; Fickers, P.; Nicaud, J.M. Lipid production by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* using industrial by-products under different culture conditions. *Biotechnol. Biofuels* **2015**, *8*, 104. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Carota, E.; Petruccioli, M.; D’Annibale, A.; Gallo, A.M.; Crognale, S. Orange peel waste-based liquid medium for biodiesel production by oleaginous yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 4617–4628. [\[CrossRef\]](#)
10. Patel, A.; Karageorgou, D.; Rova, E.; Katapodis, P.; Rova, U.; Christakopoulos, P.; Matsakas, L. An Overview of potential oleaginous microorganisms and their role in biodiesel and Omega-3 fatty acid-based industries. *Microorganisms* **2020**, *8*, 434. [\[CrossRef\]](#)
11. Chatterjee, S.; Mohan, S.V. Microbial lipid production by *Cryptococcus curvatus* from vegetable waste hydrolysate. *Bioresour. Technol.* **2018**, *254*, 284–289. [\[CrossRef\]](#)
12. Cardona Alzate, C.A.; Moncada Botero, J.; Aristizábal-Marulanda, V. *Biorefineries: Design and Analysis*, 1st ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2018.
13. Moreno, A.D.; Duque, A.; González, A.; Ballesteros, I.; Negro, M.J. Valorization of greenhouse horticulture waste from a biorefinery perspective. *Foods* **2021**, *10*, 814. [\[CrossRef\]](#)
14. Sha, Q. A Comparative Study on Four Oleaginous Yeasts on their Lipid Accumulating Capacity. Master’s Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 2013.
15. Van Wychen, A.; Ramirez, K.; Laurens, L.M.L. *Determination of Total Lipids as Fatty Acid Methyl Esters (FAME) by In Situ Transesterification*; NREL/TP-5100-60958; National Renewable Energy Laboratory: Golden, CO, USA, 2015.
16. Negro, M.J.; Álvarez, C.; Doménech, P.; Iglesias, R.; Ballesteros, I. Sugars production from municipal forestry and greening wastes pretreated by an integrated steam explosion-based process. *Energies* **2020**, *13*, 4432. [\[CrossRef\]](#)
17. Álvarez, C.; Sáez, F.; González, A.; Ballesteros, I.; Oliva, J.M.; Negro, M.J. Production of xylooligosaccharides and cellulosic ethanol from steam-exploded barley straw. *Holzforschung* **2019**, *73*, 35–44. [\[CrossRef\]](#)
18. Kruger, J.S.; Cleveland, N.S.; Yeap, R.Y.; Dong, T.; Ramirez, K.J.; Nagle, N.J.; Lowell, A.C.; Beckham, G.T.; McMillan, J.D.; Biddy, M.J. Recovery of fuel-precursor lipids from oleaginous yeast. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2018**, *6*, 2921–2931. [\[CrossRef\]](#)
19. Wooley, R.J.; Putsche, V. *Development of an ASPEN PLUS Physical Property Database for Biofuels Components*; Technical Report NREL/TP 425 20685; National Renewable Energy Laboratory: Golden, CO, USA, 1996.
20. Koutinas, A.A.; Chatzifragkou, A.; Kopsahelis, N.; Papanikolaou, S.; Kookos, I.K. Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production. *Fuel* **2014**, *116*, 566–577. [\[CrossRef\]](#)
21. Popovic, M. Thermodynamic properties of microorganisms: Determination and analysis of enthalpy, entropy, and Gibbs free energy of biomass, cells and colonies of 32 microorganism species. *Heliyon* **2019**, *5*, e01950. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. General Information on Corporate Income Tax. Available online: <https://administracion.gob.es/pagHome/en/Tu-espacio-europeo/derechos-obligaciones/empresas/impuestos/sociedades/info-general.html> (accessed on 19 May 2022).
23. Reciclados Almerienses 2005. Tratamiento de Residuos Vegetales. Available online: <https://recicladosalmerienses2005.com/residuos-vegetales/> (accessed on 19 May 2022).

24. Joelsson, E.; Erdei, B.; Galbe, M.; Wallberg, O. Techno-economic evaluation of integrated first- and second-generation ethanol production from grain and straw. *Biotechnol. Biofuels*. **2016**, *9*, 1–16. [CrossRef]
25. Consorcio de Aguas. Available online: <https://oficinavirtual.consorcioaguas.com/FacturaElectronica/AtencionCliente/tarifas.aspx> (accessed on 19 May 2022).
26. IndexBox. *Glucose and Glucose Syrup—Market Analysis, Forecast, Size, Trends and Insights*. Report ID: 4832692; IndexBox Inc.: Walnut, CA, USA, 2022.
27. ICIS. *Indicatives Chemical Prices A–Z*; ICIS: Austin, TX, USA, 2021.
28. Turton, R.B.; Bailie, R.C.; Whiting, W.B.; Shaeiwitz, J.A. *Analysis, Synthesis, and Design of Chemical Processes*, 4th ed.; Pearson Education International: Upper Saddle River, NJ, USA, 2013.
29. EUROSTAT. Electricity Prices Components for Non-Household Consumers. Available online: https://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=nrg_pc_205_c (accessed on 19 May 2022).
30. INE. Salarios y Costes Laborales. Available online: https://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/categoria.htm?c=Estadistica_P&cid=1254735976596 (accessed on 19 May 2022).
31. Zhang, J.; Fang, X.; Zhu, X.-L.; Li, Y.; Xu, H.-P.; Zhao, B.-F.; Chen, L.; Zhang, X.-D. Microbial lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* O3 grown in fed-batch culture. *Biomass Bioenerg.* **2011**, *35*, 1906–1911. [CrossRef]
32. Tomaszewska, L.; Rywińska, A.; Gładkowski, W. Production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *39*, 1333–1343. [CrossRef]
33. Di Fidio, N.; Liuzzi, F.; Mastrolitti, S.; Albergo, R.; De Bari, I. Single Cell oil production from undetoxified *Arundo donax* L. hydrolysate by *Cutaneotrichosporon curvatus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *29*, 256–267. [CrossRef]
34. Chen, X.; Li, Z.; Zhang, X.; Hu, F.; Ryu, D.D.; Bao, J. Screening of oleaginous yeast strains tolerant to lignocellulose degradation compounds. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2009**, *159*, 591–604. [CrossRef]
35. Chang, Y.-H.; Chang, K.-S.; Lee, C.-F.; Hsu, C.-L.; Huang, C.-W.; Jang, H.-D. Microbial lipid production by oleaginous yeast *Cryptococcus* sp. in the batch cultures using corn cob hydrolysate as carbon source. *Biomass Bioenerg.* **2015**, *72*, 95–103. [CrossRef]
36. Kumar, R.; Dhanarajan, G.; Bhaumik, M.; Chopra, J.; Sen, R. Performance evaluation of a yeast biorefinery as a sustainable model for co-production of biomass, bioemulsifier, lipid, biodiesel and animal-feed components using inexpensive raw materials. *Sust. Energ. Fuels* **2017**, *1*, 923–931. [CrossRef]
37. Demirbas, A. *Biodiesel. A Realistic Fuel Alternative for Diesel Engines*; Springer: London, UK, 2008.
38. Ykema, A.; Verbree, E.C.; Kater, M.M.; Smit, H. Optimization of lipid production in the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum* in wheypermeate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1988**, *29*, 211–218. [CrossRef]
39. Gong, Z.; Wang, X.; Yuan, W.; Wang, Y.; Zhou, W.; Wang, G.; Liu, Y. Fed-batch enzymatic hydrolysis of alkaline organosolv-pretreated corn stover facilitating high concentrations and yields of fermentable sugars for microbial lipid production. *Biotechnol. Biofuels* **2020**, *13*, 13. [CrossRef] [PubMed]
40. Kopsahelis, N.; Dimou, C.; Papadaki, A.; Xenopoulos, E.; Kyrleou, M.; Kallithraka, S.; Kotseridis, Y.; Papanikolaou, S.; Koutinas, A.A. Refining of wine lees and cheese whey for the production of microbial oil, polyphenol-rich extracts and value-added co-products. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2018**, *93*, 257–268. [CrossRef]
41. Liang, Y.; Cui, Y.; Trushenski, J.; Blackburn, J.W. Converting crude glycerol derived from yellow grease to lipids through yeast fermentation. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 7581–7586. [CrossRef]
42. Parsons, S.; Abeln, F.; McManus, M.C.; Chuck, C.J. Techno-economic analysis (TEA) of microbial oil production from waste resources as part of a biorefinery concept: Assessment at multiple scales under uncertainty. *Chem. Technol. Biotechnol.* **2019**, *94*, 701–711. [CrossRef]

ARTÍCULO II

RESEARCH

Open Access



Efficient use of discarded vegetal residues as cost-effective feedstocks for microbial oil production

María Gallego-García^{1,2}, Antonio D. Moreno¹, Alberto González¹ and María José Negro^{1*}

Abstract

Background Horticultural intensive type systems dedicated in producing greenhouse vegetables are one of the primary industries generating organic waste. Towards the implementation of a zero-waste strategy, this work aims to use discarded vegetables (tomato, pepper and watermelon) as feedstock for producing microbial oil using the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*.

Results The soluble fraction, resulting after crushing and centrifuging these residues, showed C/N ratios of about 15, with a total carbohydrate content (mainly glucose, fructose and sucrose) ranging from 30 g/L to 65 g/L. Using these liquid fractions as substrate under a pulse-feeding strategy with a concentrated glucose solution resulted in an intracellular total lipid accumulation of about 30% (w/w) of the total dry cell weight (DCW). To increase this intracellular lipid content, the initial C/N content was increased from 15 to 30 and 50. Under these conditions, the process performance of the pulse-feeding strategy increased by 20–36%, resulting in a total intracellular lipid concentration of 35–40% DCW (w/w).

Conclusion These results demonstrate the potential of discarded vegetables as a substrate for producing bio-based products such as microbial oil when proper cultivation strategies are available.

Keywords Single cell oil, Agri-food residues, Oleaginous yeast, Lipids

Background

Microbial oils are suggested as a suitable alternative to petroleum-based chemistry to reduce current environmental pollution. Microbial oils, also referred to as single cell oils (SCO), are produced by oleaginous microorganisms (bacteria, fungi, microalgae and yeast) capable of accumulating > 20% (w/w) lipids per dry cell weight (DCW) under particular cultivation conditions [1, 2]. The fatty acids (FA) profile of SCOs can vary depending

on the microorganism and carbon source, making it highly suitable and valuable for diverse industrial applications, including the production of biofuels and the oleochemical sector [3].

Oleaginous yeasts, under conditions of nutrient limitation, can accumulate more than 70% of lipids to its biomass weight [4] and are characterized by its excellent accumulation capacity of FA in the form of triglycerides, which are valuable precursors for biodiesel production [5]. For these reasons, these microorganisms are of great interest in bioprocessing, and it must be characterized under industrial-like conditions to investigate its full potential.

Yeasts have certain advantages over other oil-producing organisms, such as plants, bacteria, microalgae and fungi. For instance, when compared to plants, yeasts

*Correspondence:

María José Negro
mariajose.negro@ciemat.es

¹ Advanced Biofuels and Bioproducts Unit, CIEMAT, Avda. Complutense 40, 28040 Madrid, Spain

² Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares 28805, Madrid, Spain



© The Author(s) 2023. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

have shorter growth times, fewer labor requirements, are not influenced by climate conditions, and do not occupy large land areas [2, 6, 7]. Yeasts are less influenced by climate changes when compared to microalgae, and it can utilize a wider range of carbon sources. Yeasts also exhibit greater tolerance to metal ions and have low oxygen demand when compared to fungi, and it is easy to harvest when compared to bacteria due to its larger size [8, 9]

Several oleaginous yeast species belonging to the genera *Cryptococcus*, *Lipomyces*, *Rhodospiridium* and *Yarrowia* can produce SCO and other relevant products (e.g., carotenoids) depending on the culturing conditions. Temperature, C/N ratio, and pH are important parameters during SCO production, and these parameters must be optimized to maximize intracellular lipid accumulation [1, 10, 11]. In addition to the culturing conditions, low-cost substrates are highly important for cost-competitive microbial oil production [8, 12]. In recent years, different sources derived from food waste as carrot and apple pomace [13, 14], orange peels [15] or pumpkin peels wastes [16] have been used for yeast cultivation and lipids production. For example, Donzella et al. [16] report the utilization of pumpkin hydrolysate by enzymes without adding nutrients as media for lipid production by *Cutaneotrichosporon oleaginosum*, allowing producing of 24 g/L of biomass with 29% of lipids accumulation.

The horticultural intensive type systems dedicated in producing greenhouse vegetables represent one of the primary industries generating organic waste, especially in countries from South-Western Europe, such as Spain. These wastes include fruits that do not meet the quality standards required for sale and are typically removed during harvesting. In Europe, the losses of fruit and vegetable-derived from handling, storage and transport are around 5% of the total production. These residues cannot be stored for a long time due to its high moisture content. Today, these wastes are mainly used for animal feeding (e.g., cattle and sheep) whenever possible. Nevertheless, in areas with no livestock farms, these residues are transferred to external waste management companies and/or authorized recycling plants for treatment, which implies an extra cost [17].

Discarded vegetables are rich in carbohydrates (50–80% w/w) and other nutrients (e.g., nitrogen and vitamins). In this context, using these residues as feedstocks for yeast cultivation represents an attractive alternative with potential application in the energy sector. Carbohydrates from discarded vegetable products can be easily extracted by collecting the corresponding juice after a crushing procedure [18]. In this work, discarded pepper, tomato and watermelon were studied as raw material for accumulating intracellular lipids using the oleaginous

yeast *Cryptococcus curvatus*. With the aim of maximizing lipid accumulation, these media were supplemented with a sugars-rich solution to increase the initial C/N ratios.

Furthermore, a pulse-feeding cultivation strategy was also evaluated for each substrate. All the different cultivation processes were evaluated regarding total lipid production, intracellular lipid content and overall conversion yield. In addition, the FA profile was investigated in order to assess the potential use of the resulting lipids to produce biodiesel. The results presented herein will contribute to optimizing the use of discarded vegetables as a substrate to produce SCO towards implementing a zero-waste Bioeconomy strategy.

Results and discussion

Discarded vegetable residues composition

The chemical composition of discarded vegetable residues (i.e., tomato, watermelon and pepper) ranged a total potential sugar content of 58–81% (w/w), thus, highlighting the potential of these residues to serve as a carbon source in different bioprocesses (Additional file 1: Table S1). The discarded vegetables were subjected to homogenization and liquid/solid separation to collect soluble carbohydrates. The resulting liquid fractions mainly contained glucose, fructose and sucrose as major sugars components (98% of the total sugars analyzed) (Table 1). Collected sugars in the liquid fraction accounted to 40.5% (w/w) (pepper), 39.4% (w/w) (tomato) and 63.3% (w/w) (watermelon), being discarded watermelon and discarded tomato the residues with the highest (68.8 g/L) and lowest (27.0 g/L) sugar concentrations, respectively (Table 1). In addition to sugars, nitrogen is another important component in bioprocessing cultivation media. The nitrogen concentration in discarded vegetable residues varied depending on the crop, ranging from 0.7 to 1.7 g/L (tomato < watermelon < pepper).

Table 1 Soluble fraction composition from discarded vegetables residues

Component (g/L)	Tomato	Watermelon	Pepper
Glucose	11.8 ± 0.9	14.5 ± 1.4	24.3 ± 0.8
Xylose	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.0
Galactose	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.1
Arabinose	–	–	–
Mannose	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.2
Fructose	14.9 ± 1.3	29.3 ± 1.6	35.7 ± 1.5
Sucrose	–	24.3 ± 6.6	0.5 ± 0.2
Mannitol	–	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.1
Total nitrogen	0.7 ± 0.0	1.5 ± 0.02	1.7 ± 0.1

Effect of C/N ratio on intracellular lipid accumulation

After characterization, the collected liquid fractions were used to cultivate the oleaginous yeast *C. curvatus* for microbial oil production. Due to the impact of the C/N ratio on the intracellular lipid accumulation, the liquid fractions were mixed with a sugar-rich solution to increase the initial C/N ratio from 15 to 30 and 50 but maintaining the same sugar concentrations as in the raw material. Figure 1 depicts the sugar consumption and cell biomass production during the cultivation of *C. curvatus* in discarded tomato-derived media at different initial C/N rates. When using this media at an initial C/N ratio of 15, more than 76% of the initial glucose was consumed within the first 8 h, whereas 86% of the initial fructose was still present at this time. These sugar consumption rates decreased when increasing the C/N ratio of tomato-derived media to 30 and 50 (Fig. 1B, C), delaying complete glucose consumption up

to 24 h. At this time point, fructose consumption was about 85% and 40% on media with initial C/N ratio of 30 and 50, respectively. Cell biomass concentration also varied when changing the initial C/N ratio (Fig. 1D). In this context, cell biomass concentration at C/N 15 (21.3 g/L at 30 h) almost doubled the cell concentration obtained at C/N 50 (10.8 g/L at 46 h) within shorter cultivation times, mainly due to the lower nitrogen content in the latter. This result is indicative of the nutrient-rich composition of the liquid fraction obtained from discarded tomato waste, so it supports cell growth without the need of supplementing the media with additives.

The total lipid content was analyzed after cultivating *C. curvatus* in tomato-derived media at different initial C/N ratios. In general, independently of this parameter, the lipid content was very low for an oleaginous microorganism [19]. Notwithstanding, the lipid content

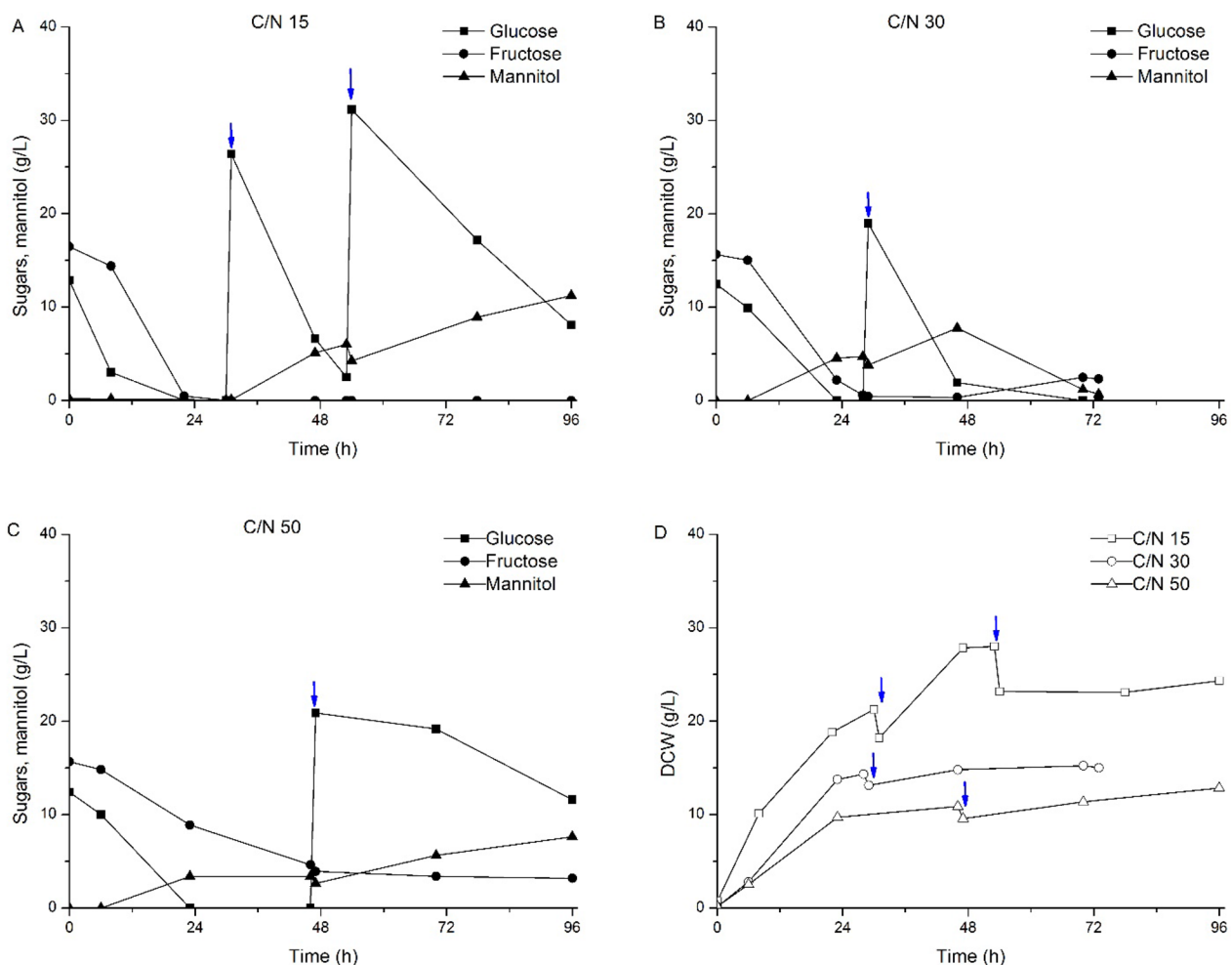


Fig. 1 Time-course for sugars consumption and mannitol production from tomato-derived media for different C/N ratios and cell biomass production. ↓ Glucose pulse addition

increased from 9.2% in cells collected from the C/N 15 media to 14.2% and 21.6% (w/w) in cells grown at C/N 30 and 50, respectively, while the lipid concentration remained approximately the same, from 2.6 g/L to 2.3 g/L and 2.6 g/L (Table 2). The higher lipid content in cells collected from media with an initial C/N ratio of 50 underlines the importance of increasing the initial C/N ratio to trigger lipid accumulation, as already reported in literature [20].

A similar approach to that followed for discarded tomato media was applied to grow *C. curvatus* for lipid accumulation using the liquid fractions collected from watermelon and pepper. Sugar consumption and cell biomass production when culturing *C. curvatus* in media from discarded watermelon and discarded pepper are shown in Figs. 2, 3, respectively. Similar to discarded tomato, free glucose and fructose were identified as significant sugar components on pepper residue. In addition, discarded watermelon also showed a significant concentration of sucrose, about one-third of the total sugar content. This disaccharide was fully converted into the corresponding monomers within the first 24 h of the process (Fig. 2). This result is indicative of the presence of the invertase enzyme responsible for hydrolyzing sucrose into glucose and fructose. Since no external enzymes were added to the process, *C. curvatus* CL6032 must be responsible for the production and secretion of such activity. Secretion of invertase activity by *C.*

curvatus has been previously reported in literature [21], supporting sucrose hydrolysis in this study. The presence of sucrose when using the liquid fraction from discarded watermelon also revealed the preference of glucose over fructose by *C. curvatus* CL6032. As depicted in Fig. 2, sucrose hydrolysis resulted in the accumulation of free fructose; meanwhile, glucose concentration was constantly decreasing. This effect was more visible at higher C/N ratios due to the lower sugar consumption rates. The C/N ratio also influenced cell biomass concentration and intracellular lipid content. Total DCW production ranged between 21. And 29.6 g/L and 19.1–38.1 g/L for watermelon and pepper respectively, being the lower values representative of cells growing in media with higher C/N content as previously observed for discarded tomato-derived media (Figs. 2, 3).

On the other hand, the lipid content ranged between 17.3 and 23.8% and 8.6–20.8% when using watermelon and pepper residues, respectively (Table 2). In general, using the liquid fraction from discarded pepper as cultivation media for *C. curvatus* showed similar trends to discarded tomato media in terms of cell biomass production and intracellular lipid content. However, when using the liquid fraction from discarded watermelon, the intracellular lipid content was higher than discarded tomato or pepper. Lower concentrations of cell biomass and lipids (16.8 g/L DCW, 4.8 g/L of total lipids and 28.6% of intracellular lipid content) have been reported when

Table 2 Cell biomass yield, lipid production by *C. curvatus* cultured on Fed-batch pulse-feeding mode in discarded vegetable residues

Waste media	C/N		DCW yield (g/g)	Lipid production (g/L)	Lipid content (w/w %)	Lipid yield (g/g %)	Total Fame (%)
Tomato	15	Before 1st pulse	0.78 ± 0.02	2.6 ± 0.02	9.2 ± 0.1	0.090 ± 0.001	8.1 ± 0.2
		Final	0.45 ± 0.01	8.8 ± 0.04	29.4 ± 1.3	0.114 ± 0.000	24.3 ± 0.8
	30	Before 1st pulse	0.51 ± 0.03	2.3 ± 0.04	14.2 ± 0.2	0.082 ± 0.001	14.1 ± 0.1
		Final	0.36 ± 0.02	4.7 ± 0.1	29.2 ± 0.9	0.102 ± 0.003	26.9 ± 0.3
	50	Before 1st pulse	0.38 ± 0.01	2.6 ± 0.1	21.6 ± 0.8	0.091 ± 0.003	21.0 ± 0.4
		Final	0.40 ± 0.00	5.4 ± 0.1	39.6 ± 1.9	0.156 ± 0.007	38.4 ± 0.5
Watermelon	15	Before 1st pulse	0.39 ± 0.03	6.6 ± 0.2 ±	17.3 ± 0.5	0.105 ± 0.003	14.8 ± 0.1
		Final	0.42 ± 0.01	14.7 ± 0.02	29.5 ± 0.1	0.123 ± 0.000	27.3 ± 1.3
	30	Before 1st pulse	0.36 ± 0.01	7.2 ± 0.2	22.4 ± 0.7	0.107 ± 0.003	21.4 ± 2.6
		Final	0.37 ± 0.01	11.7 ± 0.3	34.3 ± 0.9	0.142 ± 0.003	23.8 ± 2.9
	50	Before 1st pulse	0.26 ± 0.02	5.6 ± 0.2	23.8 ± 0.4	0.085 ± 0.003	22.3 ± 3.3
		Final	0.36 ± 0.01	9.7 ± 0.03	35.4 ± 0.1	0.151 ± 0.001	24.8 ± 1.9
Pepper	15	Before 1st pulse	0.70 ± 0.02	4.3 ± 0.1	8.6 ± 0.1	0.079 ± 0.001	7.3 ± 0.2
		Final	0.42 ± 0.01	16.8 ± 0.5	32.7 ± 1.1	0.114 ± 0.003	29.2 ± 1.3
	30	Before 1st pulse	0.43 ± 0.01	5.6 ± 0.2	18.4 ± 0.6	0.099 ± 0.003	14.8 ± 0.4
		Final	0.31 ± 0.02	13.1 ± 0.03	36.8 ± 2.3	0.119 ± 0.000	32.6 ± 1.6
	50	Before 1st pulse	0.31 ± 0.02	4.8 ± 0.1	20.8 ± 1.1	0.086 ± 0.002	15.9 ± 0.5
		Final	0.28 ± 0.03	11.3 ± 0.01	40.9 ± 0.4	0.129 ± 0.000	37.2 ± 0.2

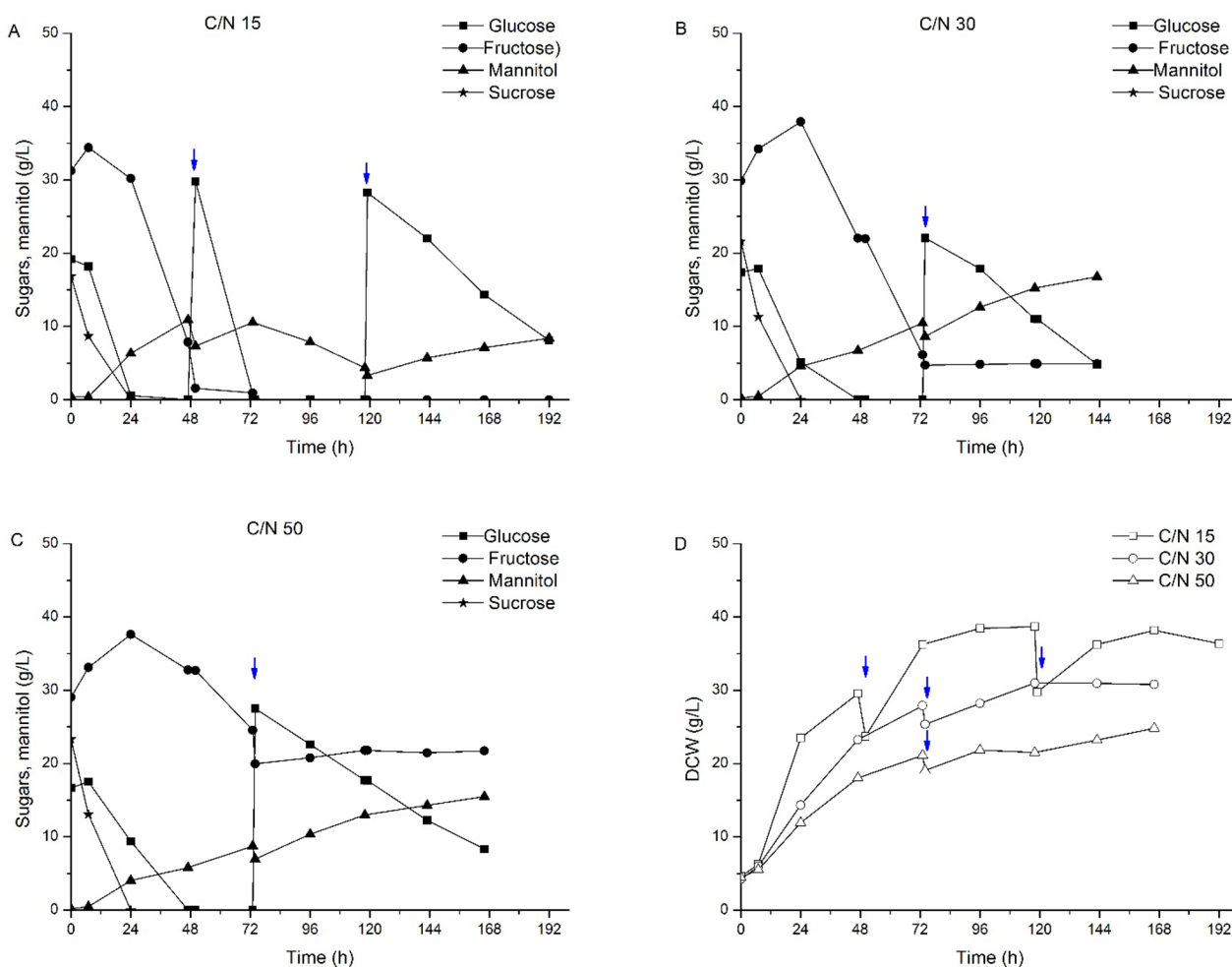


Fig. 2 Time-course for sugars consumption and mannitol production from watermelon-derived media for different C/N ratios and cell biomass production ↓ Glucose pulse addition

using a watermelon peels waste media to grow the oleaginous microorganism *Syncephalastrum racemosum* [22]. On the other hand, an intracellular lipid accumulation of 39.6% with a lipid concentration of 2.9 g/L was reported by Hashem et al. [23] using the yeast *Lichthemia corymbifera* and a similar cultivation media (watermelon peels).

Pulse-feeding cultivation

The use of agri-food waste as media for oleaginous yeast cultivation has also resulted in low lipid accumulation in previous works. For instance, the cultivation of *C. curvatus* NRRL Y-1511 in orange peel extract supplemented with ammonium sulphate and having a C/N ratio of 33 resulted in a total cell biomass concentration of 10.9 g/L and lipid content of 15% (w/w) (0.09 g/g of lipid yield) [15]. Therefore, developing alternative cultivation strategies is essential to increase the intracellular lipid content in oleaginous microorganisms when using agri-food

residues. To reach this aim, the present work assessed a pulse-feeding strategy to raise the sugar content again before its exhaustion. This strategy was also designed to allow increasing the C/N ratio during the feeding phase while keeping a relatively high cell concentration. A highly concentrated pure glucose solution was used for the feeding phase and added right before sugar depletion (determined by low sugar levels or after observing an increase in the dissolved oxygen values). The pulse-feeding strategy was tested at different initial C/N ratio (15, 30 and 50) obtained from discarded tomato-derived media. The glucose solution was added once or twice, depending on the observed sugar consumption rates from the previous phase, so the fermentation could be extended up to 72–96 h. The lipid production capacity of *C. curvatus* under the pulse-feeding strategy was evaluated at the end of the process. This strategy increased the intracellular lipid concentration to 8.8 g/L, 4.7 g/L and 5.4 g/L at initial C/N 15, 30 and 50, respectively. From the total DCW,

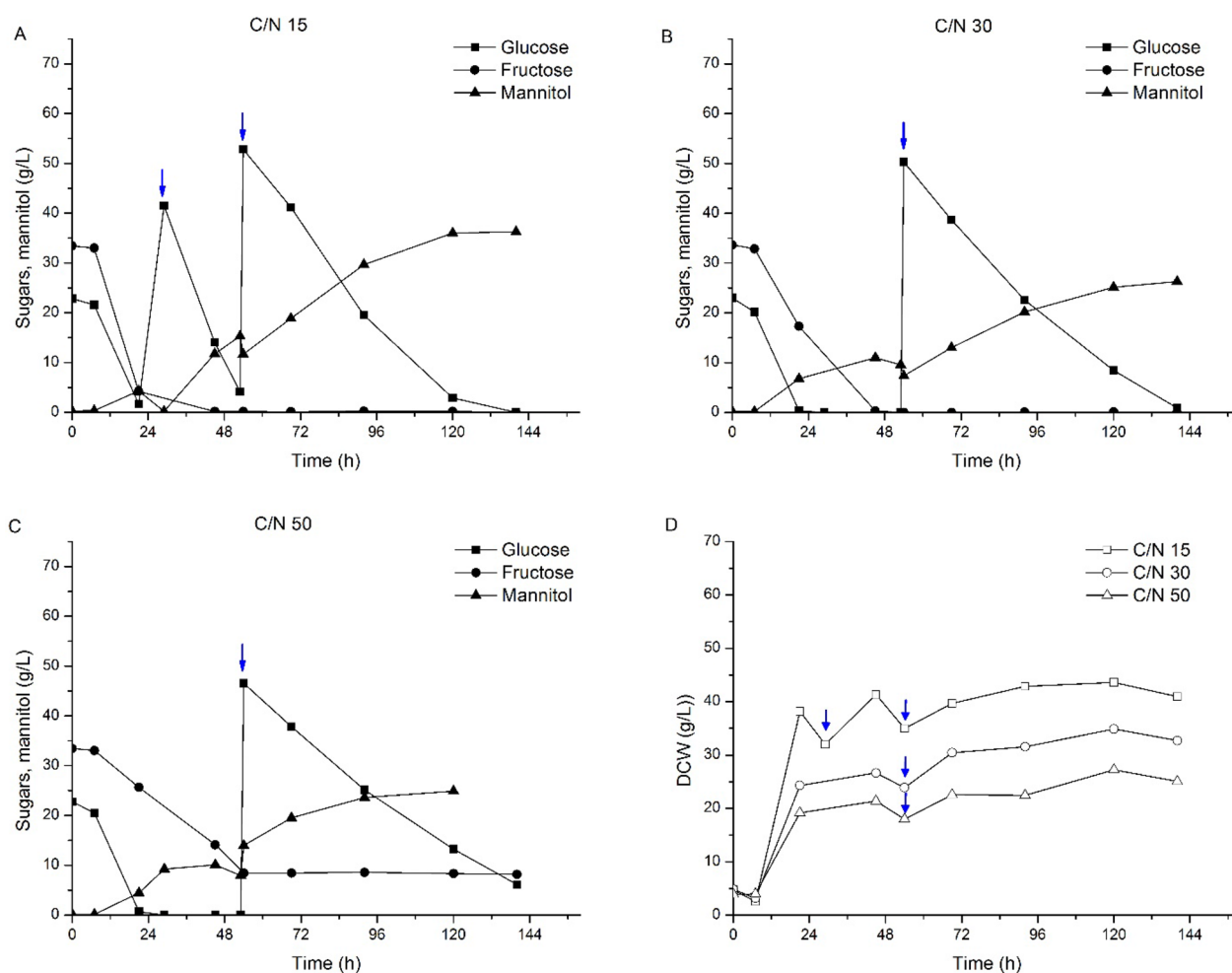


Fig. 3 Time-course for sugars consumption and mannitol production from pepper-derived media for different C/N ratios and cell biomass production. **A.** ↓ Glucose pulse addition

these lipid concentrations are equivalent to 29.4%, 29.2% and 39.6% in terms of total lipids and to 24.3%, 26.9% and 38.4% in terms of identified FAMES content. The highest intracellular lipid concentration was observed in the media with the highest C/N ratio.

Oleaginous microorganisms can accumulate lipids up to 60–70% (w/w) DCW under favourable conditions, being the C/N ratio an important parameter when using sugar-based substrates [4]. Media supplementation with external sugars results in higher C/N ratios and can boost intracellular lipid accumulation in oleaginous yeasts. Fakas et al. [24] increased the intracellular lipid content in the yeast *Cunninghamella echinulata* from 9.7% to 42% of the total DCW after supplementing with glucose a tomato waste hydrolysate obtained with sulphuric acid treatment. This approach also improved the final lipid concentration by about four times, from 2.2 g/L to 8.5 g/L, reaching a sugar to lipid conversion yield of 0.11 g/g. In the present work, an intracellular lipid

content close to 40% (w/w) DCW and a sugar to lipid conversion yield about 0.16 g lipid/g consumed sugars was observed by operating under a pulse-feeding strategy and using an initial C/N ratio of 50 (Table 2). This conversion yield is 40% higher to that reported by Fakas et al. [24], which might be explained by the higher initial C/N ratio that favors lipid accumulation. This statement is also supported by the fact that C/N 15 and C/N 30 media resulted in lipid conversion yields of 0.11 g lipid/g consumed sugar, even though *C. curvatus* cells showed a lower intracellular lipid content under these cultivation conditions (about 30% (w/w) from the total DCW).

Following the pulse-feeding approach, the intracellular lipid content in *C. curvatus* increased up to about 35% (w/w) and 41% (w/w) when growing on discarded watermelon and discarded pepper-derived media, respectively. The sugar to lipid conversion yields also increased up to 0.15 g/g and 0.13 g/g, respectively. Notwithstanding, despite increasing intracellular lipid content and

conversion yields, lower total lipid concentrations were reached due to the lower overall cell biomass concentrations (Table 2). It is very interesting to note that *C. curvatus* produced mannitol in addition to lipids as a byproduct during the pulse-feeding process, independently of the residue used or the initial C/N ratio (Figs. 1, 2, 3). Mannitol started to accumulate in the media within the first stages of the process in the presence of sugars (either glucose, fructose or both).

In contrast, mannitol consumption could be also observed with low sugar levels. This result points out the ability of *C. curvatus* to produce this sugar alcohol and subsequently use it as a carbon source. The ability of *C. curvatus* to reduce fructose and/or oxidize mannitol was confirmed by measuring mannitol dehydrogenase activity in a crude cell extract during the mannitol production phase (cells were collected when mannitol concentration was about 10 g/L). The enzymatic activity measured for fructose reduction was 0.3 U/mg protein, while the enzymatic activity for mannitol oxidation was 1.1 U/mg protein. Mannitol production and consumption have been previously reported in other yeasts, such as *Yarrowia lipolytica* [25] and different species belonging to the *Wickerhamiella* and *Starmerella* genera [26]. The specific role of mannitol in yeast metabolism is mainly linked with redox balance and stress protection [25, 26]. Mannitol production can alleviate the redox imbalance of yeast cells by either recycling NADP⁺ when NADPH is in excess or providing the NADPH required during lipid production [25, 26]. In addition, mannitol production has also been related to stress-protective mechanisms to reactive oxygen species (ROS) [27] and/or to thermal stress [21]. In this work, depending on the cultivation media, maximum mannitol concentrations varied between 10 and 28 g/L. These significant concentrations also influence lipid production, thus, influencing sugar conversion yields. Nevertheless, mannitol has interesting applications in the food and pharmaceutical industries (e.g., excipient in pharmacy, anticaking and free-flow agent, lubricant, stabilizer and thickener, low-calorie sweetener) [28, 29] and, therefore, might also play an important role in these bioprocesses within a biorefinery context.

Fatty acids profile

Another essential aspect of studying microbial lipid production to assess its technical application properly is the detailed FA profile. Figure 4 shows the FA profiles of cultivating *C. curvatus* CL6032 in different agri-food media before and after applying the pulse-feeding strategy. Overall, oleic and palmitic acids were identified as the dominant FAs before the pulse-feeding approach, accounting for 45.9–54.4% and 13.5–24.9% of the total

FAMES profile, respectively. After applying the pulse-feeding strategy, these ranges changed to 50.7–57.5% and 17.0–27.4%. Knowing the FA composition of the resulting microbial oil is essential to assess its potential applications, especially concerning biodiesel production. The presence of high levels of long-chain monounsaturated FA supports biodiesel quality as they are fluid at room temperature and could improve biodiesel flow characteristics.

Furthermore, a high percentage of polyunsaturated FAs is not suitable for biodiesel production because it not only affects the oxidative stability and quality of lipid-based biodiesel during storage but also leads to an increase in the viscosity of the final product [30]. Therefore, biodiesel should be ideally made from methyl esters of both saturated and monounsaturated FAs with a low content of polyunsaturated FAs. According to the FA profiles (Fig. 4), the resulting microbial oils were rich in monounsaturated FA (46.1–57.7%), while the concentration of saturated and polyunsaturated FAs represented up to 20.8–33.8% and 13.8–16.2%, respectively. Such FA profiles might therefore support using these microbial oils as an adequate feedstock for biodiesel production [31].

Conclusion

Mechanical methods can easily extract sugars from discarded vegetable residues without needing previous and more expensive pretreatments. The liquid fractions resulting from fruits and vegetable residues represent an interesting carbon source for microbial oil production using oleaginous yeasts and for adequate cell growth or production of other compounds of interest, such as mannitol. The lipid accumulation in *C. curvatus* increases by using higher C/N ratios. Finally, the pepper-derived medium allowed the accumulation of higher lipid concentrations in *C. curvatus*, being the lipid profile from *C. curvatus* similar to that of vegetable oils commonly used for conventional biodiesel production. Optimizing the process, selecting a suitable cultivation strategy and using cost-effective carbon sources can lead to a more attractive process for biorefineries.

Methods

Raw material and oleaginous microorganism

Discarded vegetables from tomato, pepper and watermelon crops were used as substrate in this study. These residues were provided by Albaida Residues S.L. (Almería, Spain) and were obtained under greenhouse farming conditions. The carbohydrate content of the discarded vegetables was determined following methods described elsewhere [18]. The residues were crushed by homogenization in a Danamix TR/bM-330 industrial blender

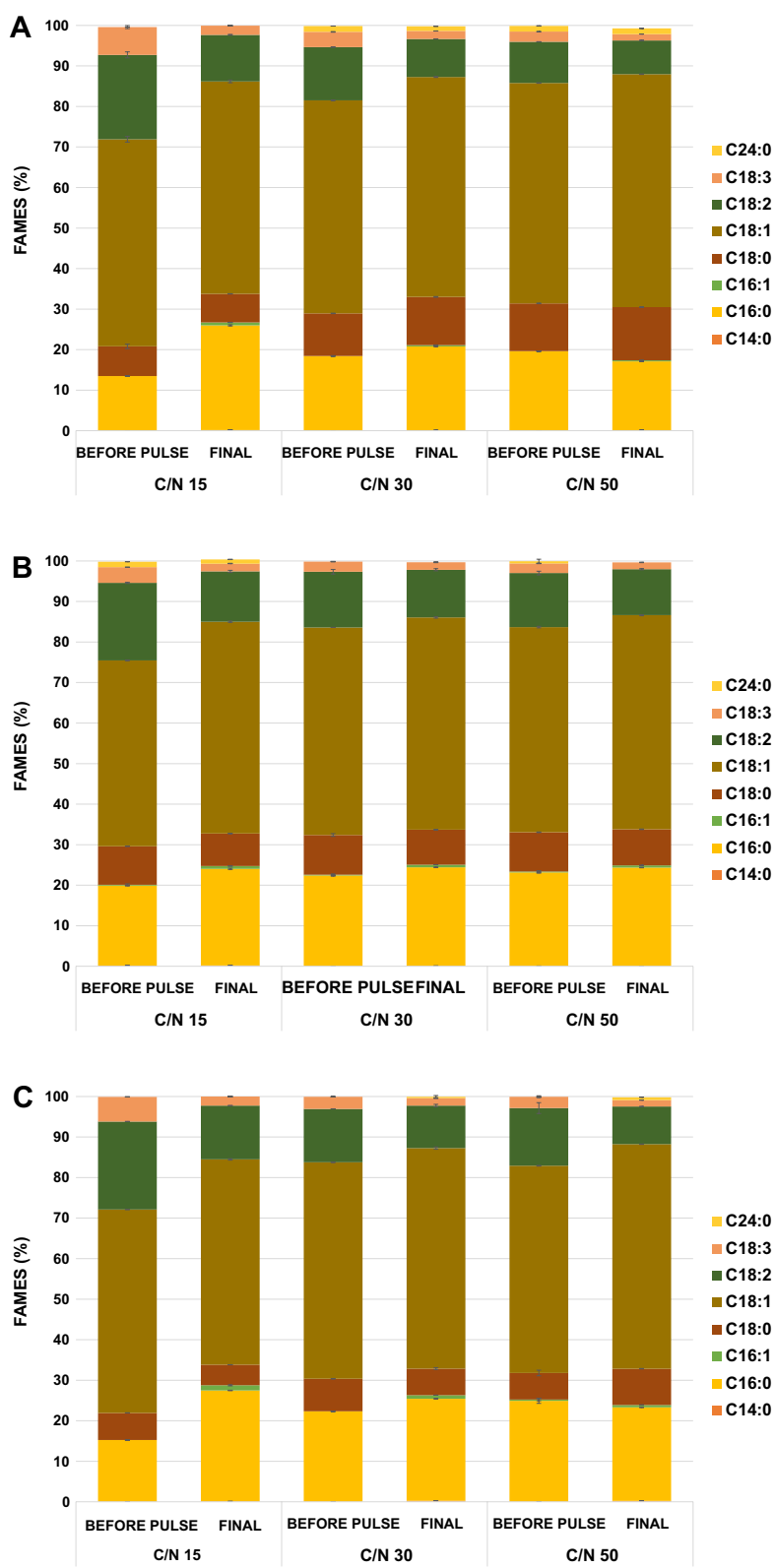


Fig. 4 Fatty acid profile of *C. curvatus* grown on discarded vegetable-derived media at different culturing stages. **A** Tomato; **(B)** Watermelon; **(C)** Pepper

(SAMMIC; Azkoitia, Spain), and the resulting solid and liquid fractions were subsequently separated by centrifugation at 3000 rpm for 15 min, using a basket centrifuge RTL2BD (COMTEIFA; Barcelona, Spain). Liquid fractions were analyzed according to the methodology described below and stored at -20°C before their use.

The yeast *Cryptococcus curvatus* CL6032 obtained from the National Collection of Instituto de Salud Carlos III (BBN-ISCH; Madrid, Spain) was used as an oleaginous microorganism. This strain was maintained in YPD agar plates with the following composition: 10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, 20 g/L glucose, and 20 g/L agar. Active cultures of this strain were obtained by inoculating a single colony into a 250 mL baffled Erlenmeyer flask containing 50 mL of YPD medium. Flasks were incubated in a rotary shaker at 180 rpm and 26°C for 24 h. Cells were subsequently harvested by centrifugation at 3000 g for 10 min and washed once with sterile water before inoculation.

Microbial oil production

The soluble fractions obtained from discarded tomato, pepper and watermelon were used as the substrate for microbial oil production. In order to maximize intracellular lipid accumulation, different initial C/N ratios were evaluated. In this context, the soluble fractions were used directly (C/N 15) and mixed at 1:1 (C/N 30) or 1:2 (C/N 50) (liquid fraction: sugar solution) with a sugar solution containing fructose, sucrose and glucose at a known concentration to maintain the initial sugars concentrations measured in each residue-discarded media. Microbial oil production were assessed on 1-L Biostat B-Plus bioreactors (Sartorius; Göttingen, Germany), using an initial working volume of 400 mL of the corresponding filter-sterilized (Nalgene Rapid Flow[®] filter 0.22 μm) liquid fractions. Assays were performed at 28°C and pH 6 (pH was maintained with 2 M HCl and 2 M KOH), with a constant airflow of 1 vvm. Dissolved oxygen was constantly monitored and maintained above 20% (v/v) saturation level using variable stirring speed (500–1500 rpm). A 2% (v/v) antifoam solution (Antifoam 289, Sigma) was used as needed to prevent foam formation (2 mL added prior to inoculation). Cells were inoculated with an initial optical density ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) of 1–1.5 and cultivated following a pulse-feeding operational strategy for 140–168 h. Samples were withdrawn periodically to analyze sugars and cell biomass concentration.

Cultures were operated by a pulse-feeding strategy. In this context, sugar components were monitored throughout the process to determine the time point when reaching sugar depletion (i.e. when having low sugars concentration and/or when observing an increase in dissolved oxygen levels). After reaching sugar depletion,

50 mL of a concentrated, autoclave-sterilized glucose solution was added to level the sugar concentration up to the initial values (30–50 g/L depending on the substrate). Before glucose feeding, 50 mL of the corresponding fermented media were harvested to determine the intracellular lipid content and FA profile and evaluate conversion yields. Collected cells were harvested by centrifugation (5000 g, 4°C , and 15 min), washed twice with sterile water, freeze-dried, and stored in a desiccator until further treatment.

Analytical methods

Cell biomass concentration (DCW) was determined by filtering a known volume of cell suspension through a 0.22 μm nitrocellulose membrane (GE Healthcare; Germany). Cells were then washed with 4-times higher amount of water and dried in a microwave at 700 W for 10 min. DCW was determined as the difference between the weight of the empty dried filter and the dried filter with cells.

The concentration of sugars (i.e., glucose, fructose, sucrose) and mannitol were determined by HPLC chromatography using an HPLC Waters Alliance 2695 system (Massachusetts, USA) equipped with a refractive index detector (detector 2414) and a Carbo Sep CHO 782 column (Transgenomic, Nebraska, USA), the latter operating at 70°C with 0.5 mL/L ultrapure water.

Lipid content was determined by the gravimetric method according to Sha [32]. Briefly, 70 mg of freeze-dried cells were treated with 3.2 mL 4 M HCl at 55°C for 2 h. Then 8 mL of a 2:1 (v/v) chloroform: Methanol solution was added, and the resulting solution was incubated at 20°C for 3 h. After incubation, the solution was centrifuged (2000 g, 15 min) to recover the organic phase (chloroform). This step was repeated once by adding 4 mL chloroform to the aqueous phase, and all recovered organic phases were mixed up and subjected to evaporation in a TurboVap LV Evaporator under N_2 to remove chloroform. The lipid content was expressed as g of lipid per 100 g of DCW and lipid yield was calculated as the ratio between total amount of lipid produced and amount of consumed sugars (g lipid/g consumed sugar).

The composition of fatty acid methyl esters (FAMES) was analyzed following the method described by Van Wycken [33]. This method is based on transforming the FA present in lyophilized cells (~ 10 mg) into the corresponding FAMES, which are collected by hexane and quantified by gas chromatography (GC). An Agilent GC 7890A (California, USA) equipped with a flame ionization detector (FID) and a split injector, and an Agilent polysiloxane capillary column DB-23 (length 30 m, 25 mm id, 1/20 split ratio). The injector and detector operated at 250°C and 280°C , respectively. Tridecanoic

acid methyl ester was used as the internal standard, with a final 10 mg/mL concentration. FAMES were identified by using a standard mixture [33].

Total nitrogen content of each corresponding fraction was determined according to the Kjeldahl method.

Mannitol dehydrogenase activity was determined in *C. curvatus* cells during the lipid accumulation phase. For that, cells were collected by centrifugation (3000 g, 5 min), washed twice with ice-cold 100 mM Tris-ClH buffer (pH 7.5) and disrupted in a FastPrep-24™ 5G instrument (MP NBIOMEDICALS) using glass beads and 1 mL lysis buffer. Cells were subjected to 6 cycles of 30 s vortexing and 2 min ice. Then, lysed cells were centrifuged (16,000 g and 4 °C for 20 min) to collect supernatant. Mannitol dehydrogenase activity was measured in the collected supernatant at 25 °C. For that, both oxidation and reduction of NADH/NADPH and NAD⁺/NADP⁺ were determined in presence of fructose and mannitol, respectively. Oxidation of NADH or NADPH was monitored by measuring the absorbance at 340 nm, using 50 mM Tris-HCl (pH 8.5), NADH (1 mM) or NADPH (1 mM) and 25 µL protein extract (1.4 g/L of total protein). This reaction was triggered by adding fructose to a final concentration of 1 mM. On the other hand, reduction of NAD⁺ or NADP⁺ was monitored by measuring the absorbance at 340 nm, using 50 mM Tris-HCl buffer (pH 10), NAD⁺ or NADP⁺ (0.2 mM) and 25 µL of protein extract (1.4 g/L of total protein). In this case, the reaction was triggered by adding mannitol to a final concentration of 50 mM.

Total protein concentration was analyzed using the BCA Protein Assay Kit-Reducing Agent Compatible from Pierce® (ThermoFisher, Massachusetts, USA).

Abbreviations

DCW	Dry cell weight
FA	Fatty acids
FAMES	Fatty acid methyl esters
ROS	Reactive oxygen species
SCO	Single cell oils

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s13068-023-02268-5>.

Additional file 1: Table S1. Chemical composition of discarded vegetable residues in % dry weight basis.

Acknowledgements

Authors thank Albaida Residuos S.L. for providing the raw material used in this study. IMDEA-Energy is also acknowledged for providing the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* CL6032

Author contributions

MGG performed the experiments, participated in the analysis of result, and reviewed the manuscript. ADM contributed in designing the work,

participated in the analysis of results and participated in writing—review and editing the manuscript. AG contributed to formal analysis and reviewed the manuscript. MJN contributed to the designing the work, participated in the analysis of the results and writing—original draft, and reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This research has been supported by the project BIOMIO + CAR (PID2020-119403RB-C2-2) funded by MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 and the project ACMIBIO-HE (ENE2017-86864-C2-1-R) funded by MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 and by “ERDF A way of making Europe”. The Grant PRE2018-086317 funded by MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 and by “ESF Investing in your future”.

Availability of data and materials

All data related to this study is reported within this article.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 5 July 2022 Accepted: 27 January 2023

Published online: 09 February 2023

References

- Ageitos JM, Vallejo JA, Veiga-Crespo P, Villa TG. Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;90(4):1219–27.
- Rakicka M, Lazar Z, Dulermo T, Fickers P, Nicaud JM. Lipid production by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* using industrial by-products under different culture conditions. *Biotechnol Biofuels*. 2015;8:104–104.
- Tomás-Pejó E, Morales-Palomo S, González-Fernández C. Microbial lipids from organic wastes: outlook and challenges. *Bioresour Technol*. 2021;323: 124612.
- Beopoulos A, Chardot T, Nicaud JM. *Yarrowia lipolytica* a model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie*. 2009;91(6):692–6.
- Spagnuolo M, Yaguchi A, Blenner M. Oleaginous yeast for biofuel and oleochemical production. *Cur Opin Biotechnol*. 2019;57:73–81.
- Li Q, Du W, Liu D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008;80(5):749–56.
- Chatterjee S, Mohan SV. Microbial lipid production by *Cryptococcus curvatus* from vegetable waste hydrolysate. *Bioresour Technol*. 2018;254:284–9.
- Qin L, Liu L, Zeng A-P, Wei D. From low-cost substrates to single cell oils synthesized by oleaginous yeasts. *Bioresour Technol*. 2017;245:1507–19.
- Carota E, Petruccioli M, D'Annibale A, Crognale S. Mixed glycerol and orange peel-based substrate for fed-batch microbial biodiesel production. *Heliyon*. 2020;9: e04801.
- Vasconcelos B, Teixeira JC, Dragone G, Teixeira JA. Oleaginous yeasts for sustainable lipid production—from biodiesel to surf boards, a wide range of “green” applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019;103(9):3651–67.
- Abeln F, Chuck CJ. The history, state of the art and future prospects for oleaginous yeast research. *Microb Cell Fact*. 2021;20(1):221.
- Gallego-García M, Susmozas A, Moreno AD, Negro MJ. Evaluation and identification of key economic bottlenecks for cost-effective microbial oil production from fruit and vegetable residues. *Fermentation*. 2022;8(7):334.
- Karatay SE, Demiray E, Dönmez G. Usage potential of apple and carrot pomaces as raw materials for newly isolated yeast lipid-based biodiesel production. *Biomass Convers Biorefin*. 2022;12(10):4773–83.

14. Tuhanioglu A, Hamamci H, Alpas H, Cekmecelioglu D. Valorization of apple pomace via single cell oil production using oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Waste Biomass Valorization*. 2022. <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01884-w>.
15. Carota E, Petruccioli M, D'Annibale A, Gallo AM, Crognale S. Orange peel waste-based liquid medium for biodiesel production by oleaginous yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020;104(10):4617–28.
16. Donzella S, Serra I, Fumagalli A, Pellegrino L, Mosconi G, Lo SR, Compagno C. Recycling industrial food wastes for lipid production by oleaginous yeasts *Rhodospiridiobolus azoricus* and *Cutaneotrichosporon oleaginosum*. *Biotechnol Biofuels Bioprod*. 2022;15(1):51.
17. Duque-Acevedo M, Belmonte-Ureña LJ, Cortés-García FJ, Camacho-Ferre F. Agricultural waste: review of the evolution, approaches and perspectives on alternative uses. *Glob Ecol Conserv*. 2020;22: e00902.
18. Moreno AD, Duque A, González A, Ballesteros I, Negro MJ. Valorization of greenhouse horticulture waste from a biorefinery perspective. *Foods*. 2021;10(4):814.
19. Karamerou EE, Webb C. Cultivation modes for microbial oil production using oleaginous yeasts—a review. *Biochem Eng Journal*. 2019;151: 107322.
20. Thevenieau F, Nicaud J-M. Microorganisms as sources of oils. *OCL*. 2013;20(6):D603.
21. Tchakouteu SS, Chatzifragkou A, Kalantzi O, Koutinas AA, Aggelis G, Papanikolaou S. Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* exhibits interplay between biosynthesis of intracellular sugars and lipids. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2015;117(5):657–72.
22. Hashem AH, Suleiman WB, Abu-elreesh G, Shehabeldine AM, Khalil AMA. Sustainable lipid production from oleaginous fungus *Syncephalastrum racemosum* using synthetic and watermelon peel waste media. *Bioresour Technol Rep*. 2020;12: 100569.
23. Hashem AH, Hasanin MS, Khalil AMA, Suleiman WB. Eco-green conversion of watermelon peels to single cell oils using a unique oleaginous fungus: *Lichtheimia corymbifera* AH13. *Waste Biomass Valorization*. 2020;11(11):5721–32.
24. Fakas S, Papanikolaou S, Galliotou-Panayotou M, Komaitis M, Aggelis G. Organic nitrogen of tomato waste hydrolysate enhances glucose uptake and lipid accumulation in *Cunninghamella echinulata*. *J Appl Microbiol*. 2008;105(4):1062–70.
25. Dulermo T, Lazar Z, Dulermo R, Rakicka M, Haddouche R, Nicaud JM. Analysis of ATP-citrate lyase and malic enzyme mutants of *Yarrowia lipolytica* points out the importance of mannitol metabolism in fatty acid synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1851(9):1107–17.
26. Gonçalves C, Ferreira C, Gonçalves LG, Turner DL, Leandro MJ, Salema-Oom M, Santos H, Gonçalves P. A new pathway for mannitol metabolism in yeasts suggests a link to the evolution of alcoholic fermentation. *Front Microbiol*. 2019;10:2510–2510.
27. Sekova VY, Dergacheva DI, Tereshina VM, Isakova EP, Deryabina YI. Carbohydrate spectrum of extremophilic yeasts *Yarrowia lipolytica* under pH stress. *Microbiology*. 2018;87(2):173–82.
28. Chen M, Zhang W, Wu H, Guang C, Mu W. Mannitol: physiological functionalities, determination methods, biotechnological production, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020;104(16):6941–51.
29. Fernández-Bolaños J, Rodríguez G, Gómez E, Guillén R, Jiménez A, Heredia A, Rodríguez R. Total recovery of the waste of two-phase olive oil processing: isolation of added-value compounds. *J Agric Food Chem*. 2004;52(19):5849–55.
30. Ghasemi A, Moosavi-Nasab M. Production of second-generation biodiesel using low-quality date fruits. *Biotechnol Rep*. 2020;27: e00480.
31. Ramos MJ, Fernández CM, Casas A, Rodríguez L, Pérez Á. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresour Technol*. 2009;100(1):261–8.
32. Sha Q. A comparative study on four oleaginous yeasts on their lipid accumulating capacity MS Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala; Swedish 2013.
33. Van Wycken S, Ramirez K, Laurens LML. Determination of total lipids as fatty acid methyl esters (FAME) by in situ transesterification. Golden: United States Laboratory Analytical Procedure (LAP); 2015. (NREL/TP-5100-60958).

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



ARTÍCULO III



Review

Recent advances on physical technologies for the pretreatment of food waste and lignocellulosic residues

María Gallego-García^{a,b}, Antonio D. Moreno^a, Paloma Manzanares^a, María José Negro^{a,*}, Aleta Duque^a

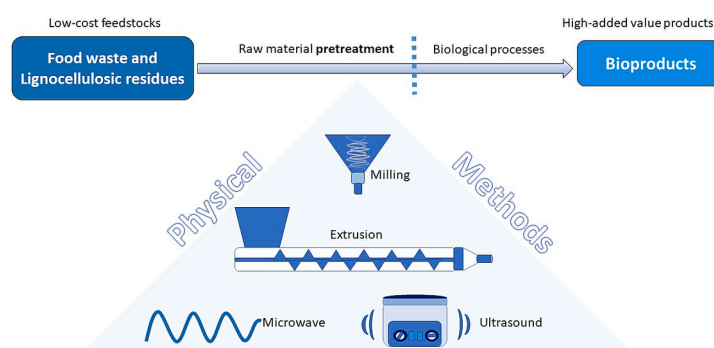
^a Advanced Biofuels and Bioproducts Unit, Department of Energy, CIEMAT, Av. Complutense 40, 28040 Madrid, Spain

^b Alcalá de Henares University, Spain

HIGHLIGHTS

- Food and lignocellulose residues are sustainable feedstocks for use in biorefineries.
- Physical pretreatments can provide key advantages in comparison to other methods.
- Advances in milling, extrusion, ultra-sonication and microwave pretreatment are given.
- Further research is needed to make feasible the scaling up of these technologies.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Keywords:

Biomass
Physical pretreatment
Milling
Extrusion
Ultrasound
Microwave

ABSTRACT

The complete deployment of a bio-based economy is essential to meet the United Nations' Sustainable Development Goals from the 2030 Agenda. In this context, food waste and lignocellulosic residues are considered low-cost feedstocks for obtaining industrially attractive products through biological processes. The effective conversion of these raw materials is, however, still challenging, since they are recalcitrant to bioprocessing and must be first treated to alter their physicochemical properties and ease the accessibility to their structural components. Among the full pallet of pretreatments, physical methods are recognised to have a high potential to transform food waste and lignocellulosic residues. This review provides a critical discussion about the recent advances on milling, extrusion, ultrasound, and microwave pretreatments. Their mechanisms and modes of application are analysed and the main drawbacks and limitations for their use at an industrial scale are discussed.

1. Introduction

Today, the world transitioning from a fossil carbon-based economy

to a bio-based economy that relies on renewable natural resources. However, on a planet already pushed to the limit, it is essential to make better use of the available resources, following the principles of the

* Corresponding author.

E-mail address: mariajose.negro@ciemat.es (M.J. Negro).

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128397>

Received 27 September 2022; Received in revised form 21 November 2022; Accepted 23 November 2022

Available online 26 November 2022

0960-8524/© 2022 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

circular economy. In this context, biorefineries will help comply with the UN's Sustainable Development Goals, as they align the objectives from both the bioeconomy and the circular economy by enabling the use of biomass at a large scale in a sustainable way. According to the definition of the organisation IEA Bioenergy, the concept of biorefinery includes integrated industries that, based on many types of biomass feedstocks (e.g. lignocellulosic or municipal solid waste) and a variety of different technologies, produce energy and a range of marketable products such as biofuels, chemicals, materials, food, and feed (Lindorfer et al., 2019).

Among the variety of biomasses, residues derived from food loss and waste along with lignocellulosic-based materials, are considered appropriate feedstocks for exploitation in biorefineries. Some of the characteristics that support the valorisation of these types of biomasses as raw materials are the generation of these wastes in huge quantities globally, their biochemical natures (source of C-rich material), and the environmental and economic impacts due to inappropriate storage and disposal (water and soil contamination, growth of unwanted organisms and pests). Furthermore, energy extraction from this kind of wastes is usually inefficient when discarded, so there is room for further upgrading the use of these materials from a biorefinery perspective (Moreno et al., 2020).

The Food and Agriculture Organization (FAO) has reported that the majority of food losses at global level in 2016 were oil-bearing crops, tubers and roots, followed by vegetables and fruits (Fig. 1). Approximately 30 % of the land employed for agriculture is used to produce food that is then lost or discarded (FAO, 2019). In economic terms, these food losses cost approximately US\$ 680 billion in developed countries and about half of that in developing countries (Mehariya et al., 2018), which has an impact on the global economy of more than US\$ 900 billion (Mak

et al., 2020). Using these wastes as resources would benefit the agro-food industry not only in environmental terms by preventing the exploitation of new sources but also in economic terms by lowering the cost of both existing and new processes in which these raw materials are involved.

Regarding the lignocellulosic residues from agriculture, forestry or the urban context, they represent an ideal source of sugars derived from cellulose and hemicellulose, in addition to other compounds such as lignin (Dharma Patria et al., 2022). An estimation of the amount generated of the main crop and wood residues in 2020 is presented in Table 1. The relevance of using lignocellulosic feedstocks in the biorefinery industry is highlighted by the fact that it makes part of numerous EU-funded projects, which pretend the installation and the consolidation of lignocellulosic-based biorefineries in Europe (Hassan et al., 2019).

The feasibility of using lignocellulosic biomass (LB) to obtain bio-based products highly depends, however, on the modifications of the structural characteristics of these feedstocks after the pretreatment step. Pretreatment is required to alter biomass structure to ease the accessibility of the corresponding carbohydrates and/or to fractionate biomass into its main components (Mankar et al., 2021). Therefore, this process stage is considered a key element in the profitability of a biorefinery scheme and directly influences operational and capital process costs.

The most general classification divides many existing pretreatments into physical, chemical, physicochemical and biological methods. Physical pretreatments, i.e. milling, extrusion, ultrasounds and microwave (MW) radiation, use mechanical or wave energy to alter the biomass structure. These methods are sometimes relegated to particle size reduction purposes and criticised for their high-energy consumption (Mankar et al., 2021). However, the search for greener processes that

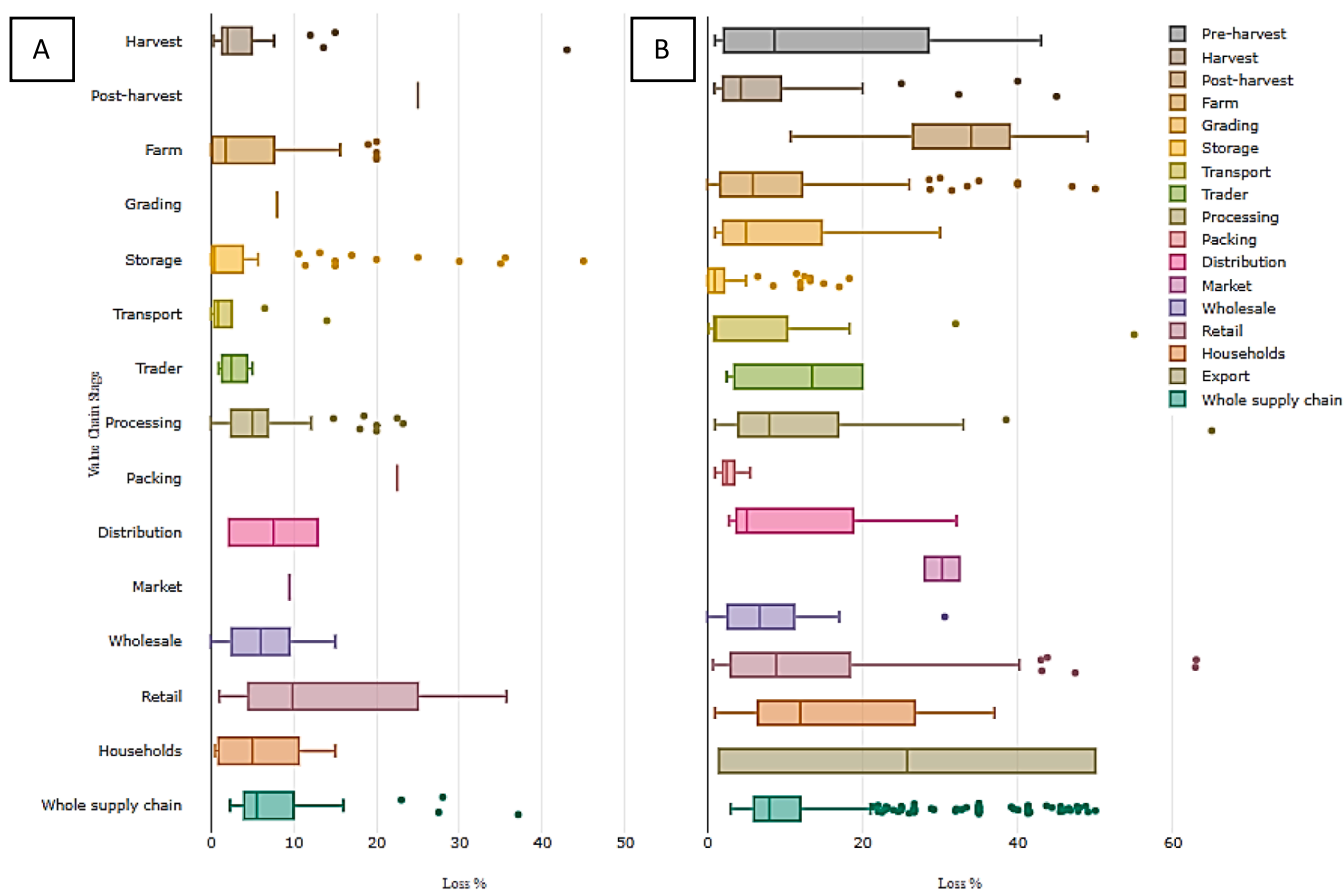


Fig. 1. Percentage losses in the food value chain in worldwide: A) Roots, tubers and oil-bearing crops. B) Fruit and vegetable (screening from 2012 to 2020) – FAO <https://www.fao.org/platform-food-loss-waste/flw-data/en/>.

Table 1

Theoretical residue production (does not discriminate by use) of the top ten crops cultivated in the world and wood residues production. Data from 2020.

Type of residue	Production ^a (Mtonnes)	Residue ratio ^b	Theoretical residue production (Mtonnes)
Sugarcane	1870	0.16	299
Maize	1162	1.27	1476
Wheat	761	1.18	898
Rice	757	1.58	1196
Oil palm fruit	418	0.26	109
Potatoes	359	0.11	39
Soybeans	353	3.50	1237
Cassava	303	0.52	157
Sugarbeet	253	0.27	68
Tomatoes	187	1.19	222
Total crop residues			5702
Wood			153 ^c
Recovered post- consumer wood			29
Total wood residues			182

^a Data obtained from FAOSTAT.

^b Dry mass of residue/fresh mass of crop, obtained from Searle and Malins (2015).

^c Wood residue production in FAOSTAT is given in m³, to calculate the theoretical residue production a mean wood density of 655 kg m⁻³ has been used (Martínez et al., 2020).

use fewer chemicals, produce less waste and favour the simplicity of operation (Ab Rasid et al., 2021; Bychkov et al., 2014) has brought these kinds of pretreatments back into the spotlight.

The present review aims to offer a comprehensive view of the latest progress obtained for the most representative physical pretreatments, highlighting their strengths and weaknesses, with a critical approach to evaluating of their future role in biorefineries from food and lignocellulosic wastes.

2. Mechanical comminution

Among the many technologies already tested and proven to be effective as biomass pretreatments (Mankar et al., 2021; Periyasamy et al., 2022), mechanical milling significantly improves the digestibility of pretreated materials and therefore represents a valuable approach to alter the physical structure of biomass.

Milling is included in the mechanical actions, including impact, shearing, compressing, crushing, friction, and stretching. It is frequent to find the terms milling and grinding used equally in the literature. During milling, the material is subjected to intense mechanical stress, causing a series of effects on the physicochemical features of the raw biomass, which finally result in an increase in its reactivity.

As a widely accepted method to efficiently modify the structural features of solid biomass, milling is frequently combined with other pretreatment methods as a first step in processing raw lignocellulosic materials, both at a laboratory and industrial scale. A major and significant effect is exerted on cell membranes, particularly on the cellulose structure, by disrupting the cellulose fibres and decreasing the crystallinity and degree of polymerisation (Mankar et al., 2021). In addition, Zhou and Tian (2022) have reported an increase in the surface area accessible for the action of the enzymes. Supporting this statement, several research works have proven that smaller sizes of biomass particles are less resistant to enzymatic hydrolysis (EH) than larger ones. For example, Gu et al. (2018b) found an about 5-fold increase in the sugar production rate of Douglas-fir forest residuals milled for 30 min in a ball mill, compared to untreated biomass.

2.1. Milling technologies

A substantial number of milling processes have been developed and tested until now, as well as specific machines for each type of technology. Various reviews have been published in the last years describing the modes of action, devices and main effects in raw materials of milling methods as biomass processing techniques (Barakat et al., 2014; Lomovsky et al., 2016; Mayer-Laigle et al., 2018; Lomovskiy et al., 2020; Shen et al., 2020; Sitotaw et al., 2021). For example, Lomovsky et al. (2016) focus on the type of impact in the particles during milling, distinguishing between constrained or abrasive impact mills (a high probability of interaction and chemical reactions between particles), and free impact mills (interaction of a single particle with the milling body, much lower probability of contact among particles). The first group would include disk mills, bead mills, ball mills, planetary or tumbling mills, vibrational mills, vibrocentrifugal mills, and roller mills. The second would comprise pin mills or disintegrators, hammer and knife mills and jet mills. A scheme of the mode of action of a few milling technologies is presented in Fig. 2. Also, a brief overview of the main actions exerted in the most common types of milling that have been tested in LB pretreatment is provided in Table 2, with relevant operational parameters and some examples of specific applications in LB feedstock. In general, running time is a key parameter for any milling technique, so it is not included in Table 2 and is considered to affect all of them.

A search of up-to-date literature references about the application of almost all milling techniques in LB conversion allows concluding that the most common milling modes are hammer milling, (wet) disk milling, and, above all, ball milling (in the different existing types).

2.2. Hammer and disk milling

Hammer milling causes the impact (collision) of the biomass particles with grinding bodies (hammers) of large size that are placed in a gyratory rotor, plus the crushing and abrasion action of the particles pressed through a screen that is mounted under the rotor. Recently, Maitra and Singh (2021) have tested a novel approach to pretreat

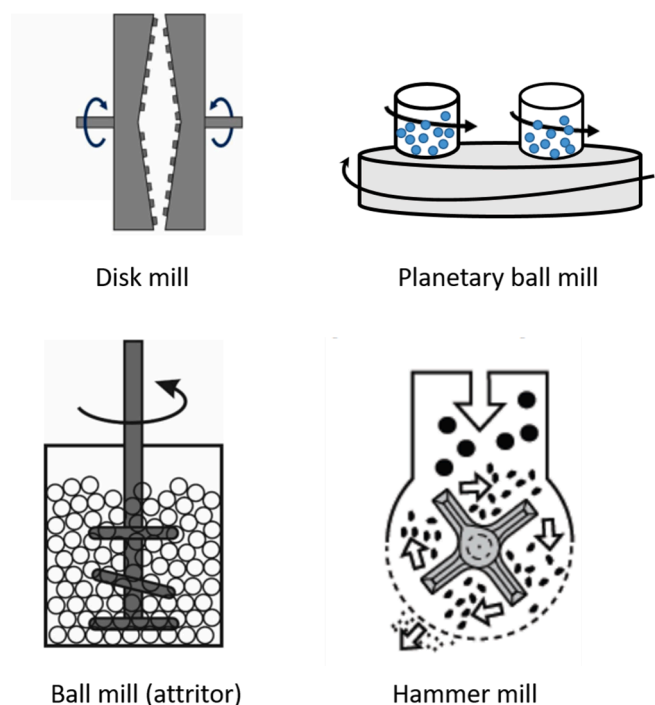


Fig. 2. Scheme of the mode of action of different types of milling. Adapted from Lomovsky et al., (2016) and Sitotaw et al. (2021).

Table 2
Main milling technologies and selected examples of relevant applications from literature.

Type of milling	Main mode of action	Relevant variables to consider	Biomass feedstock	Application	Main outcomes	Reference
Disk	Friction Beating Shearing Pressing	- Distance between disks - Disk design	Corn stover	Fermentable sugar production (thermochemical + disk refining)	- Differences in sugar yield in relation to lignin extracted and final lignin content - Significant effect of disk refiner's gap size on net specific energy consumption	Chen et al. (2020)
(Wet) disk	Shearing Crushing	Solid/liquid ratio	Sugarcane bagasse	Ethanol production (+LHW)	Substantial increase of ethanol production by combining LHW under low severity conditions and wet-disk milling	Wang et al. (2018)
Hammer	Crushing Abrasion	- Number of grinding bodies - Mesh size of screen	Wheat straw	Biogas production	Significant increase of biochemical methane production and EH yield in pretreated biomass, compared to untreated biomass (13.5 and 20.6 % respectively)	Victorin et al. (2020)
Knife	Cutting Crushing Abrasion	- Number and position of knives - Mesh size of screen	Wheat straw	Ethanol production	The use of large particle size (mm) may be advantageous over smaller sizes (≤ 0.5 mm) when total sugar yield (pretreatment + EH) is compared	Yang et al. (2022)
Ball-thumbler	Impact Compression Shearing Collision	- Ball/biomass ratio - Material of ball - Rotation frequency - Bead type and diameter	Corn stover	Biomass deconstruction	Demonstration of modification of the supramolecular structure of cellulose hemicelluloses-lignin matrix and depolymerization of polymeric structure of cell wall	Liu et al. (2019)
Stirred ball-attritor	Grinding Dispersion Shearing	- Impeller rotation speed - Bead filling ratio	Cedar wood	Glucose and ethanol production through simultaneous enzymatic saccharification and comminution (SESC)	Saccharification efficiencies of 80 % (laboratory scale) and 60 % (large scale). High fermentation yield of SESC-slurry	Navarro et al. (2018)
Planetary ball	Impact Friction Shearing	Rotation speed	Pine wood waste	Biobutanol production	Good pretreatment performance in terms of high saccharification and improved biobutanol yields and low inhibitory compounds production	Kwon et al. (2016)
Vibrational ball	Crushing Impact	- Vibrational frequency - Amplitude of vibration	Corn stover	Sugar production by EH	Structural changes at cellular level: size reduction, increased surface area, decrease in crystallinity index. Significant improvement in cellulose conversion	Chen et al. 2022
Roller	Abrasion Crushing	- Space between rollers - Number of rollers	Corn straw	Sugar production by EH	Decrease of crystallinity index, increase of specific surface area (SSA) and specific pore volume. Two fold increase in carbohydrate hydrolysis	Bychkov et al. (2014)
Rod	Impact Friction	- Operation speed - Rod diameter	Wheat straw	Biomass pyrolysis	Reduction of particle size and cellulose crystallinity, and increased SSA and pore volume. Improvement of pyrolysis efficiency	Bai et al. (2018)
Jet	Collision Impact	- Acceleration speed - Air flow	Sugarcane bagasse	Sugar production by EH	Improvement of cellulose hydrolysis yield, but negligible effect on crystallinity index. Comparison with other milling techniques	Licari et al. (2016)

sugarcane bagasse by hydrothermal pretreatment with cryogenic grinding to minimise inhibitor production and increase sugar recovery. The cryogenic grinding was carried out after the hydrothermal process (140–200 °C for 10 min) in a hammer mill microfine grinder device prepared with a 0.5 mm sieve and liquid nitrogen, being continuously fed into the mill in a ratio of 10:1 (v/w) of liquid nitrogen: biomass in each milling cycle (five). The results support a good perspective in the utilisation of this novel strategy with hydrothermal pretreatment at low temperatures (150–170 °C), thus contributing to a low-severity approach.

Disk mills consist of two disks with grooves and bars that rotate (counter-rotating or one rotating and other stationary). At the same time, the material passes between them, causing shearing, friction, beating and pressing (Table 2). This milling process has been successfully applied to pretreat several biomass feedstocks aimed at improving sugar release by EH. For example, Hu et al. (2017) investigated and modelled at the laboratory scale the response during EH tests of maize straw pretreated with a disk micro-grinder until reaching different particle sizes (from 53 to 180 μ m) for sugar production. Interestingly, the authors found that the effect of milling mainly influences the available surface area of pretreated material and increases the affinity of the enzyme towards this surface.

On the other hand, in the wet-disk mill, particles are scattered in a

liquid to form a slurry, which is pumped through a grinding chamber. The particles ride along in the liquid and are crushed among the grinding media, using the recirculation process to achieve the targeted particle size. Wet milling is claimed as a low-energy consuming process, and several studies report the application of this pretreatment alone or in combination with other pretreatments to obtain sugars (Zakaria et al., 2015; Huang et al., 2019) or cellulose nanofibers from oil palm fibers (Ariffin et al., 2021).

2.3. Ball milling

Focusing on ball milling technology, an overview of the state of the art of the main ball milling modes (tumbling, attrition, vibratory and planetary) is provided in a recent review by Sitotaw et al. (2021). The authors describe the fundamentals of each type of milling and discuss in depth the main factors influencing the results of such a technique: the characteristics of milling balls, the milling time and temperature, the filling volume, the rotational speed of the milling pot, the grinding ball to biomass ratio and if it is performed using dry or fresh biomass. Moreover, the effects of ball milling in the LB features are discussed, focusing on the crystallinity index, the morphology, and specific surface area of pretreated materials. In the same line of contribution, the thermo-physical and optical properties of lignocellulosic biomass of

corn cob subjected to ball milling have been analysed in depth by Zhang et al. (2019) using updated methodologies such as scanning electron microscope, X-rays diffractometer, thermogravimetric analysis, and Fourier transform infrared spectroscopy. It is proven that changes in ball milling parameters significantly affect the crystallinity of cellulose, the content of both cellulose and hemicellulose and the thermal decomposition pattern of the biomass, which can be used to select the best operation conditions for a specific target product. In this case, the authors focus on producing bio-hydrogen, representing a novel application of mechanical pretreatment as ball milling. Liu et al. (2019) provide evidence of the effect of ball milling in lignocellulosic fibers by increasing material digestibility in studies carried out in corn stover. The results of this study reveal that ball milling causes depolymerisation of the polysaccharide chains, disruption of the orderly fibrillar matrices and the degradation of lignin-carbohydrate complex bonds.

Another recent and novel advance using ball milling considers its application intermittently during EH of aspen branches leftovers at low enzyme doses (Wu et al., 2021). The authors claim a positive effect of milling in the distribution of enzymes into the cellulose, improving the efficiency of the enzymatic attack during the static period and resulting in a shortening of the incubation time to reach a similar final sugar concentration than in a conventional EH incubation. The combination of milling and EH has also been demonstrated to be effective in a simultaneous enzymatic saccharification and comminution (SESC) process in cedar softwood at a large scale (ball milling equipment with a processing capacity of 10 L of aqueous slurry) for ethanol (Navarro et al., 2018) and methane (Navarro et al., 2020) production. In this line of applications of ball milling in biological biomass processing, Balch et al. (2020) report on an innovative application of this technology in the fermentation of various biomasses (corn stover, poplar and switchgrass) by *Clostridium thermocellum* and four other fermenting microorganisms in a custom-made ball milling bioreactor (named cotreatment). This interesting research proves that ball milling can boost carbohydrate solubilisation for all three feedstocks without previous pretreatment or added enzymes, with significant differences in the tolerance of the studied microorganisms to milling under the conditions tested.

The review by Sitotaw et al. (2021) also examines the ball milling-assisted chemical pretreatment, which combines ball milling and a chemical agent, such as acids, alkalis, organosolvents and metal salts, providing a summary of updated studies performed in feedstocks such as corn stover, barley straw or sugarcane bagasse. Shen et al. (2020) explore the same concept. They introduced the term “mechanochemical-assisted pretreatment” in reference to the utilisation of auxiliary reagents during ball milling, aimed at improving the effectiveness of mechanical action and decreasing energy consumption. According to Zhou and Tian (2022), this combined pretreatment has the advantage of reducing the amount of solvent used and constitutes a promising new method in biorefining.

Summing up, the research carried out in the last years has demonstrated that mechanical comminution or milling is an efficient technology in biomass processing, both as a sole pretreatment process and in combination with other techniques. Moreover, it facilitates the storage, densification and, ultimately, the supply chain of raw materials in a biomass processing plant, contributing to ease the logistic operations (Barakat et al., 2014). Another advantage of milling is the low concentration of inhibitory compounds released during this pretreatment process, which eases the downstream processing and constitutes a clear advantage compared to traditional techniques using catalysts and/or high temperatures and pressures (Kwon et al., 2016; Mankar et al., 2021). In addition, Shen et al. (2020) highlighted the lower biomass losses occurring during milling technology, such as ball milling, compared to other pretreatment methods.

Nevertheless, it is crucial to consider that milling is a high-energy consumption technology that may hinder its scalability due to high economic and energy costs. However, it always depends on the equipment used, the operational parameters, the physicochemical features of

the biomass and the desired particle size (Barakat et al., 2014; Lomovsky et al., 2016). Thus, hardwood requires notably more energy for particle reduction than herbaceous materials, as proven by Cadoche and López (1989). For the same final particle size (1.6 mm) and mill type (hammer mill), these authors found that the energy required was 14.8 kWh/kg for corn stover, 42 kWh/kg for wheat straw and as much as 130 kWh/kg for hardwood. The same authors also studied the effect of the particle size on the energy spent to grind 22.4 mm hardwood chips in a knife mill, which notably increased from 8 kWh/kg for a slight particle reduction of 12.7 mm to 130 kWh/kg when the final particle size was 1.6 mm. Thus, selecting the most suitable grinding machine and the most favourable process parameters is crucial to promote the efficiency of this processing step (Moiceanu et al., 2019). Ball milling is known for its high-energy consumption compared to other milling devices. To overcome this handicap, multi-step grinding strategies or the combination of ball milling with chemical or physicochemical processes have been proposed, achieving substantial reductions in energy consumed (Sitotaw et al., 2021). On the other hand, the scalability of any milling methodology has been recognised as determining feature of the potential application in a large-scale LB processing strategy (Kim et al., 2016). The scalability is linked to the productivity or milling capacity of each type of method and clearly limits the potential of a particular technology to be used at an industrial scale.

Further research is therefore needed to overcome the drawbacks and limitations mentioned earlier and to develop more energy-efficient machines and novel applications of the different types of milling technologies. This will undoubtedly contribute to the more effective implementation of the most applicable milling techniques in biomass processing and conversion, paving the way to innovative advances in this research line.

3. Extrusion

Extrusion is a continuous physical pretreatment that unites mechanical and thermal effects in a single machine. It is carried out in extruders, which consist of one or two axis with different screw elements that can be adjusted to the desirable screw profile (see [supplementary material](#)). The screws spin inside a tight barrel whose temperature can be regulated. The biomass is continuously fed to the machine, where it is transported and forced to pass through the narrow space between the screw and the barrel wall, generating high shearing forces that alter fibres structures mechanically (Duque et al., 2017).

The main effects of extrusion pretreatment are particle size reduction and fibrillation (Chen et al., 2013; Tian et al., 2019). The impact of this pretreatment on the crystalline structure of lignocellulose is unclear. Some authors report an increase in the crystallinity index of extruded biomasses (Banville et al., 2021; Gu et al., 2018b). Others observe a decrease (Ai et al., 2020; Lu et al., 2018) or no changes at all (Marone et al., 2019).

When used alone, extrusion does not seem to affect the chemical composition of lignocellulosic biomass (Duque et al., 2018; Hjorth et al., 2011; Marone et al., 2019; Tian et al., 2022). However, the use of different reagents can promote the solubilisation of lignin (Liu et al., 2018), hemicellulose (Han et al., 2020; Lu et al., 2022) and other non-structural compounds (Duque et al., 2014b; Lu et al., 2018). Reactive extrusion is a particular mode of operation in which a chemical catalyst is used in the process, adding a chemical effect to the physical alteration of the biomass and improving the global performance of the pretreatment. The mechanical compaction of the material caused by extrusion removes air and water, enhancing the penetration of solvents into the biomass fibres (Liu et al., 2018; Lu et al., 2018). For instance, Liu et al. (2018) have proved the synergy of physical and chemical effects during extrusion processing. They extruded corn stover using NaOH as a catalyst and then compared the results obtained with those of an alkaline pretreatment followed by Paperindustriens Forskningsinstitutet (PFI) refining. They found that the sugar yield of the NaOH-extruded corn

stover was notably higher (78.75 %) than the yield obtained using only the alkaline pretreatment (50.08 %) or applying the sequential alkali plus mechanical refining treatment (54.83 %). Alkaline extrusion using NaOH has been widely studied, and promising results have been obtained from this pretreatment in the last years (Doménech et al., 2020; Duque et al., 2018; Liu et al., 2018; Tian et al., 2022). However, recent studies have explored the addition of other chemicals that are more environmentally friendly, such as ionic liquids (da Silva et al., 2013; Guiao et al., 2022b; Han et al., 2020), deep eutectic solvents (Ai et al., 2020), or glycerol (Lu et al., 2018). For example, Ai et al. (2020) highlighted the advantages of using a neutral-pH and biocompatible deep eutectic solvent (choline chloride: glycerol) to enable the continuous pretreatment of sorghum bagasse at high solids loading, improving the enzymatic digestibility of the extruded biomass up to 85 %. In some instances, the catalysts added during reactive extrusion also play a crucial role as flow modifiers, enabling a continuous and stable material flow inside the machine. In fact, extrusion of dry lignocellulosic biomass can lead to wearing of the machine and excessive torque values (Duque et al., 2017; Han et al., 2020) and water, in the form of moisture or added externally, may sometimes not be enough either (Duque et al., 2018; Kuster Moro et al., 2017).

Herbaceous materials have traditionally been considered more suitable for extrusion processing than woods and other highly lignified residual biomasses due to their greater softness (Duque et al., 2017; Ismail et al., 2022). However, the most recent publications about extrusion pretreatment show a renewed interest in using woody species and less common feedstocks, such as eucalyptus (Duque et al., 2018), Douglas fir (Gu et al., 2018a), aspen (Tian et al., 2019), pussy willow (Han et al., 2020), bamboo (Lu et al., 2018), olive stones (Doménech et al., 2020), or vegetal tomato plant waste (Moreno et al., 2021).

Extrusion technology has also been employed to pretreat food wastes, such as pecan nut shell (Villasante et al., 2021), soybean residue (Lee et al., 2019), fish by-products (Makoure et al., 2020), or grapefruit peel (Trujillo-Juárez et al., 2021). The aim of these investigations was to promote the release of sugars, or the extraction of interesting bio-products (lipids, essential oils).

Continuous operation and the capability to work at high solids loadings are two of the most distinctive characteristics of extrusion pretreatment (Ai et al., 2020; Duque et al., 2014a; Zheng et al., 2014). The superior mixing capacity of extrusion, especially at high solids loadings, as well as the adaptability of extruders to the different process needs, are other of the advantages of this pretreatment (Duque et al., 2017; Fu et al., 2018; Gatt et al., 2019; Santala et al., 2013). In this respect, the modular configuration of some extruders allows them to carry out multiple operations. For instance, the bioextrusion process presented by Duque et al. (2014a) integrates the pretreatment, conditioning of the pretreated biomass and beginning of the EH, in a continuous process conceived to be performed in just one extrusion machine. Several variables influence the performance of extrusion, such as screw speed, temperature, liquid-to-solid ratio, torque or screw profile, all of which have been extensively studied in the literature (Duque et al., 2018; Gu et al., 2019; Han et al., 2020; Negro et al., 2015). Residence time inside the extruder is relatively short, varying between 2 and 15 min, according to the values reported in the literature (Choi et al., 2017; Gatt et al., 2019). Extrusion has been reported to shorten the time required for the pretreatment compared to batch experiments: i.e. da Silva et al. (2013) pretreated sugarcane bagasse with the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate and compared the results carrying out the process in an extruder with a batch reactor. A glucose yield of 91 % could be obtained in approximately 8 min of extrusion, while the time consumed in the batch reactor was 120 min for a similar 94 % glucose yield. However, for slower processes, the residence time may not be enough to complete the reactions, and extended incubation time is needed, as it is the case of hydrolytic enzymes (Vandenbossche et al., 2014). Alkaline extrusion with NaOH could also benefit from an external reaction time extension, as suggested by Liu et al. (2013). Other

researchers have sought to extend the reaction time by recirculating the extruded material for successive extrusion passes (Ai et al., 2020; Banville et al., 2021; da Silva et al., 2013; Kuster Moro et al., 2017; Tian et al., 2022).

Sequential or hybrid pretreatments can be the answer for specific fractionation necessities in biorefineries. Extrusion has been proposed as a secondary pretreatment after milling (Fu et al., 2018), alkaline thermal pretreatment (Doménech et al., 2021), or steam explosion (Oliva et al., 2017). It has also been used as a first step before the diluted acid steam explosion (Ismail et al., 2022), ultrasonication (Byun et al., 2020; Zhang et al., 2020), ozone pretreatment (Karunanithy et al., 2014b) and MW (Karunanithy et al., 2014a). These sequential configurations usually successfully improved the production of sugars with respect to the first applied pretreatment. Another clear objective of these configurations is to use milder conditions in one or both pretreatments. For instance, Byun et al. (2020) tested alkaline extrusion followed by ultrasonication. They obtained 7 % more sugar production, higher lignin removal (17 % more), and a reduction of 26 % in the amount of alkali used compared to the case without ultrasonication. According to Karunanithy et al. (2014b), the previous extrusion of switchgrass and big bluestem reduced the time and ozone consumption compared to applying only ozonation. Furthermore, some authors highlight the advantage of sequential pretreatments to achieve chemical-free processes without losing effectivity (Fu et al., 2018; Karunanithy et al., 2014a; Zhang et al., 2020). Nevertheless, the actual application of these sequential pretreatments remains uncertain since all the tests so far have only been carried out at the laboratory or bench-scale, and the integration of the different technologies could be challenging at a greater scale, also in terms of increased costs.

There is few information in the scientific literature about the energy aspects of extrusion pretreatment (Guiao et al., 2022a). The mechanical energy consumption in extrusion is usually expressed as the amount of energy required to produce a kg of pretreated material (specific mechanical energy, SME), and it heavily depends on several variable operations, namely the torque, the motor power, the screw speed and the mass flow inside the extruder. SME values vary for different feedstocks and processes, with typical values between 80 and 370 Wh/kg (Doménech et al., 2020; Duque et al., 2018; Gu et al., 2020). The energy input can be further reduced when a previous chemical method is applied to soften the rigid lignocellulosic structure (Tian et al., 2019). Extrusion pretreatment has been considered less energy-intensive than conventional pretreatments for certain applications. For instance, using extrusion resulted in up to 63 % energy saving compared to ultra-fine grinding (Rol et al., 2017). A comparison study among different milling strategies concluded that extrusion had a much lower specific energy consumption than grinding mills, i.e. 0.14 kWh/kg (extrusion) compared to 0.26 kWh/kg (hammer milling) or 0.74 kWh/kg (impact milling) (Fu et al., 2018). Furthermore, the energy balance for biogas production using extrusion as pretreatment was positive, with energetic gains between 10 and 68 % (Hjorth et al., 2011; Souza et al., 2022).

To sum up, the scientific community continues nowadays exploring the potential of extrusion as a pretreatment method to produce a diversity of bio-based products. The latest studies have tested the performance of new biomasses, new catalysts and process configurations. Some have offered new insights into how extrusion affects lignocellulosic biomass. Table 3 summarises some examples of the most recent advances. In spite of the uncertainties about the energetic and economic costs and the fact that the current research has not yet reached the level of development necessary for industrial applications, the technology is expected to continue attracting research interest for its use in biorefineries in the following years, given the flexibility and adaptability of extrusion pretreatment.

4. Ultrasonication

Ultrasonication is another common physical technology applied to

Table 3

Selected examples of recent publications involving extrusion pretreatment.

Feedstock	Type of extruder	Operating conditions	Application	Main findings	Reference
Barley straw / Vine shoots	Twin-screw extruder	Addition of water 0.2 L/S; 500 rpm; 85 °C	• Anaerobic digestion	• Increase of the surface area exposed using extrusion. • No positive effect on the biodegradability of the biomasses due to accumulation of volatile fatty acids.	Hidalgo et al. (2022)
Corn stover	Twin-screw extruder	Addition of NaOH 0.06 g NaOH/g dry matter 2 L/S Heat preservation, 1 h, 99 °C	• Bioethanol production	• 50 % more delignification using alkaline extrusion than only alkali. • Higher total sugar yield obtained using alkaline extrusion (79 %) than alkaline pretreatment (51 %), or sequential alkali plus refining (55 %). • Synergy between chemical and physical effects in reactive extrusion.	Liu et al. (2018)
Vegetal tomato plant waste	Twin-screw extruder	Addition of NaOH 0.06 or 0.12 g NaOH/g dry matter 150 rpm; 100 °C 1 or 3 passes	• Sugars production	• Recovery of the major part of extractable compounds in vegetal tomato plant waste. • Enhancement of the enzymatic digestibility. Increase with the amount of catalyst and number of passes in the extruder.	Moreno et al. (2021)
Olive stones	Twin-screw extruder	Addition of NaOH 0.05 or 0.15 g NaOH/g dry matter 2 L/S; 150 rpm; 100–125–150 °C Neutralization with H ₂ SO ₄	• Sugars production	• Most of the carbohydrates in olive stones recovered in the solid fraction. • Increase of the enzymatic digestibility at high NaOH loading and temperature up to 125 °C. • 60 % conversion of carbohydrates to glucose and xylose.	Doménech et al. (2020)
Sorghum bagasse	Twin-screw extruder	Addition of choline chloride:glycerol (CholCl:Gly) 1–2 L/S; 35 rpm; 150 or 180 °C 4 to 10 passes	• Fractionation for the production of sugars and lignin	• Reduction of pretreatment time to 16 min and increase of the solids loading up to 50 % compared to batch experiments (2 h, 10 % solids). • Higher destructuration and increased enzymatic digestibility. • Positive impact of the number of passes and temperature. • Lignin kept the basic structure characteristics after the pretreatment.	Ai et al. (2020)
Pussy willow powder	Twin-screw extruder	Addition of 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate (EmimAC) (plus dimethyl sulfoxide, DMSO) 1–6 L/S; 2–15 rpm; 140 or 160 °C	• Sugars production	• Disruption and fibrillation of the cell wall, solubilization of components, destruction of the crystalline structure and increase of the enzymatic digestibility. • Addition of DMSO to EmimAc did not improve the results • Better results at low screw speed and high temperature.	Han et al. (2020)
Bamboo	Single-screw extruder	Biomass impregnated in glycerol, 1:8 ratio, 120 °C, 2 h 55 rpm; 50 °C 2 passes	• Lignocellulose nanofibrils	• Removal of lignocellulose and ash, retention of hemicellulose and cellulose. • Small decrease in crystallinity to 48 % compared to 58 % without extrusion. • Increase of the solvent absorption ration from 30 to 78 % after two extrusion passes. • 60 kWh/ton energy consumption, less than conventional refining.	Lu et al. (2018)

lignocellulosic biomass and wastes materials in biorefining processes. Ultrasonication technology is based on the cavitation effect caused during radiation with ultrasonic energy, an acoustic wave that oscillates at frequencies above 16 kHz.

Acoustic cavitation is induced when the ultrasonic wave is propagated in a specific liquid medium, promoting compression (when the molecules of the solvent are pressed together) and rarefaction (when the molecules of the solvent are separated) cycles that form microbubbles containing gas. The collapse of such microbubbles triggers different physical and chemical effects, including heating, acoustic cavitation, acoustic streaming, nebulisation, and radical formation, thus altering biomass structure (Flores et al., 2021; Gallo et al., 2018). The chemical effect (*i.e.*, radical formation) is more intense at sonication frequencies of ca. 300 kHz. In contrast, the microbubbles generated at frequencies around 20–50 kHz, produced in lower numbers but exhibiting higher diameters, release higher mechanical energy (Bussemaker & Zhang, 2013). Most ultrasonication pretreatment processes operate at frequencies below 50 kHz, making the physical effects the main mechanisms influencing biomass structure, although chemical hydroxide attacks can also occur. In addition, the energy released from the bubbles collapse during ultrasonication of biomass has low penetration potential

and is therefore retained on the surface of the corresponding material. This makes delignification and extraction of high-added-value chemicals the main applications of ultrasonication on biomass (Ong et al., 2021; Sharma et al., 2021; Sharma et al., 2022; Subhedar et al., 2018). Ultrasonication induces lignin removal, as it is the external component of lignocellulosic biomass and is in direct contact with the solvent (Ong et al., 2021; Subhedar et al., 2018). On the other hand, ultrasonication can promote erosion and fragmentation of vegetal structures, increasing the accessibility of the corresponding solvent to biomass and leading to the solubilisation of the product(s) of interest (Chemat et al., 2017).

The most recent advances in using ultrasonication technology for both delignification of lignocellulosic residues and the extraction of added-value compounds from food waste are summarised in Table 4. Compared to conventional technologies (*e.g.*, alkali extraction, organosolv), ultrasonication-assisted methods require lower process times and temperatures, and the reactor can operate at atmospheric pressure. These ultrasonic-assisted treatments also result in higher extraction/delignification efficiencies. For instance, ultrasonication of grass clipping slightly modified the chemical composition of this raw material. At the same time, ultrasound-assisted alkaline pretreatment with 0.5 % NaOH or 0.5 % Ca(OH)₂ reduced the lignin content by 40.5 % and 36.6

Table 4

Examples of ultrasound and ultrasound-assisted methods for biomass pretreatment and extraction of industrially relevant products.

Feedstock	Treatment	Operating conditions	Application	Main findings	Reference
Agave leaves	Ultrasound bath	42 kHz and 132 W, 30–60 min	Enzyme production	• 20–25 % lower extractives and ash • Increase phenol recovery • Delignification increases at longer residence times	Contreras-Hernández et al. (2018)
Grass clipping	Ultrasonic cell crusher/ultrasound-assisted alkaline pretreatment	25 kHz and 5 W/mL, in presence and absence of 0.5 % NaOH or 0.5 % Ca(OH) ₂	Sugar recovery	• Similar chemical composition with ultrasonication alone • Assisted-method decreased the lignin content by 37–41 % compared to 31–36 % with alkaline treatment alone • 2 times higher saccharification yields	Wang et al. (2017b)
Oil palm frond	Ultrasound-assisted alkaline treatment combined with aqueous deep eutectic solvent (DES)	Horn-type ultrasonicator, 20 kHz, amplitude of 70 % for 30 min; 1:4 water to DES ratio and 2.5 % (w/v) NaOH-aqueous DES	Sugar recovery	• 50 % delignification • Ultrasonication increased lignin removal by 1.5 times	Ong et al. (2021)
Rice straw	Ultrasound-assisted Fenton process	Horn-type ultrasonicator, 22 kHz, 200–600 W for 3 h; 1:1 solution of 1.76 M H ₂ O ₂ and 0.04 M FeSO ₄ ·7H ₂ O, both with a pH value of 2.5	Sugar recovery	• 1.5 times higher saccharification yields than treatment without ultrasonication • Higher specific surface area available • Lower DP (degree of polymerization) values	Xiong et al. (2017)
Sugarcane bagasse	Ultrasonication combined with surfactant-assisted ionic liquid treatment	horn-type ultrasonicator, 20 kHz, 100 W for 60 min; 5 g of 1-butyl-3-methylimidazolium chloride [Bmim]Cl and 300 mg of surfactant PEG-8000	Sugar recovery	• 1.3–1.5 higher sugar yields compared to ultrasound and surfactant-assisted ionic liquid treatments, respectively • Promising green solvent strategy • Increase in surface area • Reduce crystallinity due to swelling and solubilization of cellulose	Sharma et al. (2021)
Birch sawdust	Ultrasound-assisted biological delignification (<i>Myrothecium verrucaria</i>)	Ultrasonic Generator, 200 W for 20 min at 1:20 solid to liquid ratio	Delignification	• Delignification increased up to 70 % with combined pretreatment (1.5 and 5 times higher than with <i>M. verrucaria</i> and ultrasonication alone) • Significant modification of the surface morphology and chemical structure	Wang et al. (2017a)
Out hulls	Ultrasound-assisted alkaline pretreatment	35 kHz for 10 min in water, followed by an incubation in 5 M NaOH at 80 °C for 9 h	Hemicellulose extraction	• Recovery of 72 % of the total hemicellulose content • Higher yields than autoclaving, microwave, deep eutectic solvents and alkaline treatments	Schmitz et al. (2021)
Orange peel waste	Ultrasound-assisted dilute acid hydrolysis	40 kHz and 60 W for 34.2 min; working at 5.8 % solid loading with 1.2 % sulfuric acid concentration	Extraction of essential oils, pectin and bacterial cellulose	• Maximum production yields: 0.12 % w/w essential oils; 45 % w/w pectin; 5.82 g of bacterial cellulose per 100 g of waste. • Similar yields at laboratory and pilot scales	Karanicola et al. (2021)
Microalgae (<i>Nannochloropsis oceanica</i>)	Ultrasound-assisted N, N, N', N'-tetraethyl-1,3-propanediamine (TEPDA)	20 kHz and 0.5 W/mL power intensity at a volume ratio of 1:4 microalgae:TEPDA	Extraction of lipids	• Effective disruption of microalgae cell wall • Rearrangement of the cell membrane, resulting in cell membrane leakage • Almost complete lipid extraction within 2 h	Guo et al. (2022)
Corn stover	Combined ultrasound treatment with ball milling and hydrothermal methods as well as with pulsed electric field (PEF)	Ball milling at 220 rpm for 1, 3, and 5 h, ultrasonic generator, 40 kHz and 360 W for 30 min, followed by hydrothermal treatment (185–230 °C) for 1–1.5 h	Extraction of xylooligosaccharides (XOS)	• Recovery of 80.4 % XOS, containing 27 % of the functional XOS (X2–X4) • The solid residue reduced the lignin content by 35 % • Very high yields (93 %) during the saccharification step	Zhang et al. (2022)
Grape stems	Combination of PEF with ultrasound	35 KHz and 320 W; low-electric field strength; 1 kV/cm for 30 min	Extraction of polyphenol and volatile compounds	• Combined treatment increase polyphenol recovery by 17 % in 1:1 (v/v) methanol:water • Ultrasonication extraction increased polyphenol recovery	Ntourtoglou et al. (2022)

(continued on next page)

Table 4 (continued)

Feedstock	Treatment	Operating conditions	Application	Main findings	Reference
				by 35 % when using water alone as solvent • Higher concentrations of volatile compounds can be obtained (from 0.73 to 2.44 mg/Kg)	

%, respectively, compared to 36.2 % and 31.4 % delignification rate of the alkaline treatment alone (Wang et al., 2017b). This ultrasound-assisted strategy also doubled the subsequent saccharification yields, underlying the high potential of this method for lignocellulose pretreatment. Ultrasound-assisted alkaline treatment has also been combined with an aqueous deep eutectic solvent (DES) for the delignification of oil palm fronds (Ong et al., 2021). This treatment reached delignification values as high as 47 %, increasing lignin removal by 1.5 times compared to treatment without ultrasonication (30.9 % delignification rate). An interesting approach has been published by Sharma et al. (2021), who sequentially combined ultrasonication with surfactant-assisted ionic liquid treatment, which is considered a promising 'green solvent' for biorefineries. This strategy increased sugar yields by 1.3–1.5, compared to ultrasound and surfactant-assisted ionic liquid treatments, from 176 mg/g and 199 mg/g to 254 mg/g, respectively. Biological delignification coupled with ultrasound assistance has also resulted in higher lignin removal when compared to ultrasound or biological processes alone. Wang et al. (2017a) treated birch sawdust with the fungus *Myrothecium verrucaria* and ultrasonication for lignin degradation. Compared to the separated processes, the use of fungal and ultrasound treatments resulted in a lignin degradation increase up to 68.0 % in comparison to 45.5 % and 13.8 %, respectively. Together with lignin removal, polysaccharide solubilisation can also be observed during biomass ultrasonication due to the formed radicals' oxidising capacity. Ultrasound-assisted alkaline pretreatment was the most effective method for hemicellulose recovery from out hulls (72 % of the total hemicellulose content) compared to autoclaving, ultrasonication, MW, deep eutectic solvents, and alkaline treatments (Schmitz et al., 2021).

Ultrasound and ultrasound-assisted treatments have also been applied to processing food-derived waste to produce industrial-relevant bio-based products within a circular bioeconomy perspective. These approaches have been previously reviewed in the literature elsewhere (Esteban-Lustres et al., 2022; Sharma et al., 2021; Sharma et al., 2022; Sirohi et al., 2020). Production of valuable commodities such as essential oils, pectin and bacterial cellulose can be obtained by ultrasound-assisted dilute acid hydrolysis from orange peel waste (Karanicola et al., 2021). Similarly, ultrasound treatment has also been combined with ball milling, hydrothermal methods, and pulsed electric field (PEF) treatment. Combination of ultrasound, ball milling and hydrothermal treatment allowed to recover of 80.4 % of xylooligosaccharides (XOS) from corn stover, containing about 27 % of the functional XOS (X2-X4) (Zhang et al., 2022). In addition, the remaining solid residue also reduced the lignin content by 35 % and reached 92.6 % glucose yield during the EH step. On the other hand, combining PEF with ultrasound technology promoted the extraction of volatile compounds and polyphenols from grape stems (Ntourtoglou et al., 2022).

Ultrasonication is an attractive physical pretreatment with a high potential for processing lignocellulosic residues and waste materials, either alone or in combination with other novel and conventional methods, to increase pretreatment efficiencies and promote process intensification during biomass conversion. Still, this technology is highly energy demanding. Depending on biomass type and process targets, sonication-specific energies vary greatly. In this regard, Bundhoo and Mohee (2018) reviewed the use of ultrasound irradiation for organic matter solubilisation and biofuel (biogas and biohydrogen)

production, listing specific energies inputs between 0.5 kJ/g of total solids and 234 kJ/g of volatile solids. Overall, there is a need to investigate ultrasonication further to provide more information and optimise essential parameters, including energy requirements, to overcome current challenges and advance towards scaling up these processes.

5. Microwave radiation

A pretreatment that currently focuses much interest is pretreatment through MW irradiation. This technology enhances hydrothermal biomass fractionation by promoting the interaction between substrate and reaction medium, although applying low pretreatment severities (Tsubaki et al., 2016).

Microwaves are non-ionising radiations using wavelengths of 0.01–1 m and 300–300,000 MHz (Hassan et al., 2018; Kostas et al., 2017). MW heating promotes two main mechanisms that induce rapid heating in the presence of ions or polar molecules: ionic conduction and dipole rotation. The dipole rotations mechanism forces to realign the polar molecules with the electric field generated by MW. During this phenomenon, molecules interact with themselves, realising energy in the form of heat through dielectric loss and molecular friction. In the presence of an MW-absorbing material, this energy is absorbed irreversibly, causing rapid volumetric heating (Kostas et al., 2017). This unique heating mechanism benefits the MW system by reducing heating time, offering a uniform and selective volumetric heating performance, and increasing energy transfer efficiency. To promote selective heating, substrates must be heterogeneous, containing different materials or phases with varying dissipation factors. The latter are defined as the relation between the dielectric loss factor (the ability of the material to dissipate in the form of heat the absorbed electromagnetic energy) and the dielectric constant (the ability of the material to store electromagnetic energy) (Kostas et al., 2017; Tsubaki et al., 2018). Selective heating provides better control of the heating process, reducing the risk of generating biomass degradation products that can inhibit hydrolytic enzymes and fermentative microorganisms in subsequent conversion process steps. In addition, selective heating has no temperature requirements (i.e., MW-based pretreatments can be performed in cold environments), thus avoiding the need of ablative surfaces or hot gases, and results in higher heat transfer rates when compared to conventional heating systems. These advantages offer the possibility of processing large particle sizes and using smaller MW processing facilities, which positively impacts capital costs and may contribute to obtaining a wider range of bioproducts.

MW technologies have also emerged as advanced techniques in extracting various added-value compounds due to multiple advantages, such as improving extraction yields, reducing process time, and low solvent consumption. However, some of the drawbacks of this technique are the need for special equipment, low selectivity and the possible degradation of some bioactive compounds. Using suitable solvents and adjusting operating conditions during MW-assisted extraction make it possible to extract compounds of interest, such as anthocyanins, flavonoids or essential oils. Castro-Muñoz et al. (2022) review the latest insights on emerging techniques, including MW-assisted extraction, high voltage electrical discharge or ultrasound-assisted extraction, to extract compounds of industrial relevance from agro-food waste. The application of technologies that use MW on biomass has been widely studied in recent decades. Its use in a previous phase of drying, especially

applicable as a previous phase to the processes of transformation of biomass through thermochemical processes, or the prevention of the degradation of possible bioactive compounds of biomass, has been reported (Chojnacka et al., 2021). Particularly the use of MW-assisted pyrolysis of biomass without oxygen under high temperatures (>400 °C) to convert biomass to liquid (bio-oil), solid (biochar) and gaseous (syngas) fraction (Siddique et al., 2022; Suriapparao and Tejasvi, 2022) or gasification (Arpia et al., 2022) has been considered.

During the pretreatment of MW lignocellulosic feedstocks, specific polar regions of this heterogeneous material support selective heating and create internal 'hotspots' that promote biomass disruption and swelling (Kostas et al., 2017). The internal fragmentation contributes to reducing particle size and cellulose crystallinity index and increasing the available surface area, improving process performance during the subsequent hydrolysis step (Hassan et al., 2018).

Most published MW pretreatment works are combined with other pretreatments (Table 5 shows some examples).

Regarding the limitations of MW technology, there is a need of experimental data about the performance of MW reactors for biomass pretreatment (Aguilar-Reynosa et al., 2017). Moreover, further research efforts must be done to develop novel MW systems and reactors that allow operating at high solid loads, while promoting a homogeneous heat transfer. In addition, Kostas et al., 2017 have pointed out at the necessity to make progress in the understanding of the changes occurred in LB pretreated by MW that would eventually support the design of more realistic and scalable biorefining strategies using this technology.

6. Research Needs and Future Directions

Using alternative and novel feedstocks to obtain biofuels and bio-products in a biorefinery-type strategy requires applying efficient and selective fractionation techniques that maximise the use of all biomass components while at the same time contributing to the sustainability of

Table 5
Examples of microwave assisted methods for biomass pretreatment.

Type	Feedstock	Operating conditions	Main findings	Application	Reference
Combined mechanical/microwave	Wheat Straw, <i>Miscanthus</i> , Short-rotation willow	200 °C –10 min (Microwave reactor) followed by wet-milling pretreatment (10 min milling time)	- Supplementary milling led to a 1.3×, 1.6 × and 3 × enhancement in glucose saccharification yield after 24 h for straw, <i>Miscanthus</i> and willow, respectively - Milling energy savings of 98, 97 and 91 % compared to the unmilled case	Sugars production	Ibbett et al. (2018)
One-stage microwave-alkali-assisted pretreatment	Wheat straw	Temperature 100 °C 3 %NaOH concentration, 20 min.	- Evidence of the effect of temperature. Existence of the non-thermal effect of MW in MW-assisted biomass treatment. - Microwaves could reduce approximately 50 %–75 % of the reaction time or 67 % of the chemical consumption in comparison with traditional heating hydrolysis	Cellulose fibre isolation	Liu et al. (2021)
Combined Deep eutectic solvents; /microwave	<i>Miscanthus</i> , corn stover, switchgrass	800 W power, temperature 152 °C, and 45 s ChCl: LA, 10 wt % solid loading.	- Lignin and xylan were substantially removed while most of cellulose was retained. - The pretreatment increased the cellulose digestibility by 2–5 folds. - Lignin was recovered with relatively high purity (85–87 %). - Microwave-assisted DES pretreatment appeared to require much less energy than DES pretreatment (3.6×10^4 J vs 2.49×10^6 J)	Biomass fractionation	Chen & Wan (2018)
One-stage microwave–chemical–assisted pretreatment.	Maize stillage	300 W (power of microwave generator), 54 PSI, 15 min	Highest glucose concentrations (104 mg/g of stillage DW) and the highest total yield of cellulose hydrolysis (75.8 %), a relatively low concentration of by-products was observed (6.8 mg HMF/g of DW; 6.0 mg furfural/g of DM).	Bioethanol	Mikulski et al. (2019)
Microwave-assisted extraction	Brewer's spent grain (BSG), Kale Stem spent coffee ground	110 °C, 10 min, 0.5 M NaOH (BSG) 102 °C, 15.3 min, uncatalyzed (Kale)	- Best results microwave-alkali assisted (protein extraction yield 94 %) 72.59 % protein extraction yield for kale	Recovery protein from agro-food waste	Barrios et al. (2022)
Microwave plus deep eutectic solvent	Sugarcane bagasse	Choline chloride: Ethylene glycol: NiCl ₂ ·6H ₂ O (CC:EG:NI) at a molar ratio 1:2:0.016 with 20w%; 100 °C microwave heating for 30 min	84 % delignification and 99 % digestibility of sugarcane bagasse	Production fermentable sugars	Chourasia et al. (2022)
Microwave-assisted acid pretreatment	Sugarcane straw	50-Hz reactor 162 °C and 0.6 % sulphuric acid (w/v) for 2 min.	- Total sugars recovery 72.2 % - Hydrolysates with low inhibitors concentrations which allows the hydrolysates to be fermented without a detoxification	Production bio-butyric acid	Fonseca et al. (2021)
Diluted acid/microwave	Agave	H ₂ SO ₄ 1.5 % (v/v); Biomass/H ₂ SO ₄ ratio 1:36 (w/v); at 140 °C 10 min	- Hemicellulose removal was superior in pretreatment-assisted with microwave (MW) (77.5 %) - Enzymatic hydrolysis yield was 2-fold higher in agave pretreated with MW. - Hydrolysates from MW resulted in a high glucose concentration without inhibitors. - MW pretreatment significantly reduce time compared to conventional heating.	Sugars production	Ríos-González et al. (2021)

the whole biomass conversion process. The considerable interest that the application of physical technologies as described herein to pretreat biomass feedstocks has raised is shown in the substantial number of investigations carried out in the last decade using a great variety of different biomass materials, including food wastes and lignocellulosic residues. Nevertheless, despite the amount of research already carried out, there are still gaps in the knowledge that hinder their industrial application potential. For instance, energy consumption is the primary concern associated physical pretreatment method, which is often overlooked in research studies. Some works do give figures for the energy demand of the equipment (Cadoche and López, 1989; Vidal et al., 2011), but these data need to be put in a critical context that goes beyond the machine and reaches the whole production process. In this regard, techno-economic analysis is an essential tool to determine the potential of the chosen pretreatments and highlight their advantages over conventional systems.

Furthermore, the machines where the physical pretreatments take place usually have a high degree of complexity, which raises some doubts about their scaling up for their use in industries with high production volumes. Alternatively, applications in the field of low-volume, high-added value bioproducts seem to be more convenient for this kind of pretreatments, especially for ultrasonication and MW (Castro-Muñoz et al., 2022; Ong et al., 2021). Thus, the adequate selection of the targeted bioproduct is crucial to promote the implementation of physical pretreatments at an industrial scale.

The analysis of the recent scientific literature reveals that combined pretreatments are the best way to exploit the full potential of physical and chemical methods to alter the biomass structure. The combination of a physical pretreatment with chemicals or catalysts usually results in a synergic effect that can lead to a reduction of the chemical consumption and/or the use of milder operation conditions (Liu et al. (2018), Zhou and Tian (2022)). In this respect, it is essential to study the environmental and economic impact of combined process in comparison to separate pretreatments, advancing in the reduction and possible recycling of the catalysts used. In addition, the mechanistic basis that induce the changes in biomass structure at a molecular level still need to be fully understood, and the advance of fundamental research in this area must be considered.

A particularly interesting field of study that is recently emerging is the coupling of physical pretreatments with the biological conversion of biomass. To date, only a few studies have addressed this type of cotreatment process, using hydrolytic enzymes and microorganisms in combination with milling, extrusion or ultrasound methods (Balch et al., 2020; Duque et al., 2014a; Navarro et al., 2018; Wang et al. 2017a; Wu et al., 2021). This combined process presents clear advantages, such as mild temperature conditions and no chemicals addition; therefore, they constitute a promising line of research to explore. Research should advance the knowledge of the underlying mechanisms of cotreatment. Furthermore, techno-economic analyses that include the energy requirements should be performed to evaluate the cotreatment under industrial conditions.

Finally, the bibliographic review concluded that there is still further room for optimising ultrasonication and microwave conditions for biomass pretreatment. Although different studies can be found related to the use of MW technology in drying and extraction systems on a pilot scale, there are few studies on using MW reactors for biomass pretreatment. As Aguilar-Reynosa et al. (2017) pointed out, that this aspect should devote further research efforts. It is also advisable to advance in developing novel MW systems and reactors to operate at high solid loads and to favour homogeneous heat transfer. It is also crucial to understand the different behaviours of major lignocellulosic biomass components and their dielectric properties to design better processes for this technology (Kostas et al., 2017).

7. Conclusions

The high versatility of physical pretreatments is well demonstrated in the substantial number of applications tested up to now, leading to the obtaining of different compounds or products from biomass bio-refining. These technologies, alone or in combination with other hydrothermal, chemical or even biological pretreatments have been proven to be effective to alter the structure of a great variety of biomass feedstocks, representing a step forward in the search of a specific fractionation technique for biomass processing. However, there is still a need for further research to boost their application at a scale close to industrial conditions.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

Acknowledgements

Authors acknowledge MCIN/AEI/ (10.13039/501100011033) for funding this publication by PID2020-119403RB-C22 and PID2020-112594RB-C32 projects. MGG also thanks MCIN/AEI/ (10.13039/501100011033) and “ESF Investing in your future” for the PRE2018-086317 grant.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128397>.

References

- Ab Rasid, N.S., Shamjuddin, A., Abdul Rahman, A.Z., Amin, N.A.S., 2021. Recent advances in green pre-treatment methods of lignocellulosic biomass for enhanced biofuel production. *J. Clean. Prod.* 321, 129038.
- Aguilar-Reynosa, A., Román, A., Rodríguez-Jasso, R., Aguilar, C.N., Garrote, G., Ruiz, H. A., 2017. Microwave heating processing as alternative of pretreatment in second-generation biorefinery: An overview. *Energy Convers. Manage.* 136, 50–65.
- Ai, B.L., Li, W.Q., Woomer, J., Li, M., Pu, Y.Q., Sheng, Z.W., Zheng, L.L., Adedeji, A., Ragauskas, A.J., Shi, J., 2020. Natural deep eutectic solvent mediated extrusion for continuous high-solid pretreatment of lignocellulosic biomass. *Green Chem.* 22 (19), 6372–6383.
- Ariffin, H., Yasim-Anuar, T.A.T., Norrahim, M.N.F., Hassan, M.A., 2021. Synthesis of cellulose nanofiber from oil palm biomass by high-pressure homogenisation and wet disk milling. In: *Nanocellulose: Synthesis, Structure, Properties and Applications*. World Scientific, Singapore, pp. 51–64.
- Arpia, A.A., Nguyen, T.-B., Chen, W.-H., Dong, C.-D., Ok, Y.S., 2022. Microwave-assisted gasification of biomass for sustainable and energy-efficient biohydrogen and biosyngas production: A state-of-the-art review. *Chemosphere* 287, 132014.
- Bai, X., Wang, G., Yu, Y., Wang, D., Zhiqin, W., 2018. Changes in the physicochemical structure and pyrolysis characteristics of wheat straw after rod-milling pretreatment. *Bioresour. Technol.* 250, 770–776.
- Balch, M.L., Chamberlain, M.B., Worthen, R.S., Holwerda, E.K., Lynd, L.R., 2020. Fermentation with continuous ball milling: Effectiveness at enhancing solubilisation for several cellulosic feedstocks and comparative tolerance of several microorganisms. *Biomass Bioenergy* 134, 105468.
- Banville, G., Gatt, E., Belgacem, N., Bras, J., 2021. Cellulose fibers deconstruction by twin-screw extrusion with in situ enzymatic hydrolysis via bioextrusion. *Bioresour. Technol.* 327, 124819.
- Barakat, A., Mayer-Laigle, C., Solhy, A., Arancon, R.A.D., de Vries, H., Luque, R., 2014. Mechanical pretreatments of lignocellulosic biomass: towards facile and environmentally sound technologies for biofuels production. *RSC Adv.* 4 (89), 48109–48127.
- Barrios, C., Fernández-Delgado, M., López-Linares, J.C., García-Cubero, M.T., Coca, M., Lucas, S., 2022. A techno-economic perspective on a microwave extraction process for efficient protein recovery from agri-food wastes. *Ind. Crop Prod.* 186, 115166.

- Bundhoo, Z.M.A., Mohee, R., 2018. Ultrasound-assisted biological conversion of biomass and waste materials to biofuels: A review. *Ultrason. Sonochem.* 40, 298–313.
- Bussemaker, M.J., Zhang, D., 2013. Effect of ultrasound on lignocellulosic biomass as a pretreatment for biorefinery and biofuel applications. *Ind. Eng. Chem. Res.* 52 (10), 3563–3580.
- Bychkov, A.L., Buchtoyarov, V.A., Lomovsky, O.I., 2014. Mechanical pretreatment of corn straw in a centrifugal roller mill. *Cellul. Chem. Technol.* 48 (5–6), 545–551.
- Byun, J., Cha, Y.-L., Park, S.-M., Kim, K.-S., Lee, J.-E., Kang, Y.-G., 2020. Lignocellulose pretreatment combining continuous alkaline single-screw extrusion and ultrasonication to enhance biosugar production. *Energies* 13 (21), 5636.
- Cadoche, L., López, G.D., 1989. Assessment of size reduction as a preliminary step in the production of ethanol from lignocellulosic wastes. *Biol. Wastes* 30 (2), 153–157.
- Castro-Muñoz, R., Díaz-Montes, E., Gontarek-Castro, E., Boczkaj, G., Galanakis, C.M., 2022. A comprehensive review on current and emerging technologies toward the valorisation of bio-based wastes and by products from foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 21 (1), 46–105.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.S., Abert-Vian, M., 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason. Sonochem.* 34, 540–560.
- Chen, J., Adjallé, K., Lai, T.T., Barnabé, S., Perrier, M., Paris, J., 2020. Effect of mechanical pretreatment for enzymatic hydrolysis of woody residues, corn stover and alfalfa. *Waste Biomass Valoriz.* 11 (11), 5847–5856.
- Chen, S.-J., Chen, X., Zhu, M.-J., 2022. Xylose recovery and bioethanol production from sugarcane bagasse pretreated by mild two-stage ultrasonic assisted dilute acid. *Bioresour. Technol.* 345, 126463.
- Chen, X., Kuhn, E., Wang, W., Park, S., Flanagan, K., Trass, O., Tenlep, L., Tao, L., Tucker, M., 2013. Comparison of different mechanical refining technologies on the enzymatic digestibility of low severity acid pretreated corn stover. *Bioresour. Technol.* 147, 401–408.
- Chen, Z., Wan, C., 2018. Ultrafast fractionation of lignocellulosic biomass by microwave-assisted deep eutectic solvent pretreatment. *Bioresour. Technol.* 250, 532–537.
- Choi, W.I., Ryu, H.J., Kim, S.J., Oh, K.K., 2017. Thermo-mechanical fractionation of yellow poplar sawdust with a low reaction severity using continuous twin screw-driven reactor for high hemicellulosic sugar recovery. *Bioresour. Technol.* 241, 63–69.
- Chojnacka, K., Mikula, K., Izdoreczek, G., Skrzypczak, D., Witek-Krowiak, A., Moustakas, K., Ludwig, W., Kułażyński, M., 2021. Improvements in drying technologies – Efficient solutions for cleaner production with higher energy efficiency and reduced emission. *J. Clean. Prod.* 320, 128706.
- Chourasia, V.R., Bisht, M., Pant, K.K., Henry, R.J., 2022. Unveiling the potential of water as a co-solvent in microwave-assisted delignification of sugarcane bagasse using ternary deep eutectic solvents. *Bioresour. Technol.* 351, 127005.
- Contreras-Hernández, M.G., Ochoa-Martínez, L.A., Rutiaga-Quinones, J.G., Rocha-Guzmán, N.E., Lara-Ceniceros, T.E., Contreras-Esquivel, J.C., Prado Barragán, L.A., Rutiaga-Quinones, O.M., 2018. Effect of ultrasound pre-treatment on the physicochemical composition of Agave durangensis leaves and potential enzyme production. *Bioresour. Technol.* 249, 439–446.
- da Silva, A.S., Teixeira, R.S.S., Endo, T., Bon, E.P.S., Lee, S.H., 2013. Continuous pretreatment of sugarcane bagasse at high loading in an ionic liquid using a twin-screw extruder. *Green Chem.* 15 (7), 1991–2001.
- Dharma Patria, R., Rehman, S., Vuppalaadiyam, A.K., Wang, H., Lin, C.S.K., Antunes, E., Leu, S.-Y., 2022. Bioconversion of food and lignocellulosic wastes employing sugar platform: A review of enzymatic hydrolysis and kinetics. *Bioresour. Technol.* 352, 127083.
- Doménech, P., Duque, A., Higuera, I., Iglesias, R., Manzanares, P., 2020. Biorefinery of the olive tree—production of sugars from enzymatic hydrolysis of olive stone pretreated by alkaline extrusion. *Energies* 13 (17), 4517.
- Doménech, P., Manzanares, P., Álvarez, C., Ballesteros, M., Duque, A., 2021. Comprehensive study on the effects of process parameters of alkaline thermal pretreatment followed by thermomechanical extrusion in sugar liberation from *Eucalyptus grandis* wood. *Holzforchung* 75 (3), 250–259.
- Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Gonzalez, A., Ballesteros, M., 2014a. Sugar production from barley straw biomass pretreated by combined alkali and enzymatic extrusion. *Bioresour. Technol.* 158, 262–268.
- Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Saez, F., Ballesteros, M., 2014b. Study of process configuration and catalyst concentration in integrated alkaline extrusion of barley straw for bioethanol production. *Fuel* 134, 448–454.
- Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, M., 2017. Extrusion as a pretreatment for lignocellulosic biomass: Fundamentals and applications. *Renew. Energy* 114, 1427–1441.
- Duque, A., Manzanares, P., González, A., Ballesteros, M., 2018. Study of the application of alkaline extrusion to the pretreatment of eucalyptus biomass as first step in a bioethanol production process. *Energies* 11 (11), 2961.
- Esteban-Lustres, R., Torres, M.D., Piñeiro, B., Enjamio, C., Domínguez, H., 2022. Intensification and biorefinery approaches for the valorisation of kitchen wastes – A review. *Bioresour. Technol.* 360, 127652.
- FAO. 2019. The State of Food and Agriculture 2019. Moving forward on food loss and waste reduction. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Flores, E.M.M., Cravotto, G., Bizzi, C.A., Santos, D., Iop, G.D., 2021. Ultrasound-assisted biomass valorisation to industrial interesting products: State-of-the-art, perspectives and challenges. *Ultrason. Sonochem.* 72, 105455.
- Fonseca, B.C., Reginatto, V., López-Linares, J.C., Lucas, S., García-Cubero, M.T., Coca, M., 2021. Ideal conditions of microwave-assisted acid pretreatment of sugarcane straw allow fermentative butyric acid production without detoxification step. *Bioresour. Technol.* 329, 124929.
- Fu, Y., Gu, B.J., Wang, J., Gao, J., Ganjyal, G.M., Wolcott, M.P., 2018. Novel micronised woody biomass process for production of cost-effective clean fermentable sugars. *Bioresour. Technol.* 260, 311–320.
- Gallo, M., Ferrara, L., Naviglio, D., 2018. Application of ultrasound in food science and technology: A perspective. *Foods* 7 (10), 164.
- Gatt, E., Khatri, V., Bley, J., Barnabe, S., Vandenbossche, V., Beauregard, M., 2019. Enzymatic hydrolysis of corn crop residues with high solid loadings: New insights into the impact of bioextrusion on biomass deconstruction using carbohydrate-binding modules. *Bioresour. Technol.* 282, 398–406.
- Gu, B.J., Dhumal, G.S., Wolcott, M.P., Ganjyal, G.M., 2019. Disruption of lignocellulosic biomass along the length of the screws with different screw elements in a twin-screw extruder. *Bioresour. Technol.* 275, 266–271.
- Gu, B.-J., Wang, J., Michael, P.W., Ganjyal, G.M., 2018a. Increased sugar yield from pre-milled Douglas-fir forest residuals with lower energy consumption by using planetary ball milling. *Bioresour. Technol.* 251, 93–98.
- Gu, B.J., Wolcott, M.P., Ganjyal, G.M., 2018b. Pretreatment with lower feed moisture and lower extrusion temperatures aids in the increase in the fermentable sugar yields from fine-milled Douglas-fir. *Bioresour. Technol.* 269, 262–268.
- Gu, B.-J., Wolcott, M.P., Ganjyal, G.M., 2020. Optimised screw profile design proved to inhibit re-agglomeration that occurs during extrusion of fine-milled forest residuals for producing fermentable sugars. *Ind. Crop Prod.* 154, 112730.
- Guiao, K.S., Gupta, A., Tzoganakis, C., Mekonnen, T.H., 2022a. Reactive extrusion as a sustainable alternative for the processing and valorisation of biomass components. *J. Clean. Prod.* 355, 131840.
- Guiao, K.S., Tzoganakis, C., Mekonnen, T.H., 2022b. Green mechano-chemical processing of lignocellulosic biomass for lignin recovery. *Chemosphere* 293, 133647.
- Guo, H., Cheng, J., Mao, Y., Qian, L., Yang, W., Park, J.Y., 2022. Synergistic effect of ultrasound and switchable hydrophilicity solvent promotes microalgal cell disruption and lipid extraction for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 343, 126087.
- Han, S.-Y., Park, C.-W., Endo, T., Febrianto, F., Kim, N.-H., Lee, S.-H., 2020. Extrusion process to enhance the pretreatment effect of ionic liquid for improving enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Wood Sci. Technol.* 54 (3), 599–613.
- Hassan, S.S., Williams, G.A., Jaiswal, A.K., 2018. Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 262, 310–318.
- Hassan, S.S., Williams, G.A., Jaiswal, A.K., 2019. Lignocellulosic biorefineries in Europe: current state and prospects. *Trends Biotechnol.* 37 (3), 231–234.
- Hidalgo, D., Martin-Marroquín, J.M., Castro, J., Gómez, M., Garrote, L., 2022. Influence of cavitation, pelleting, extrusion and torrefaction pretreatments on anaerobic biodegradability of barley straw and vine shoots. *Chemosphere* 289, 133165.
- Hjorth, M., Granitz, K., Adamsen, A.P.S., Møller, H.B., 2011. Extrusion as a pretreatment to increase biogas production. *Bioresour. Technol.* 102 (8), 4989–4994.
- Hu, J., Jing, Y., Zhang, Q., Guo, J., Duu-Jong, L., 2017. Enzyme hydrolysis kinetics of micro-grinded maize straws. *Bioresour. Technol.* 240, 177–180.
- Huang, J., Zhu, Y., Liu, T., Sun, S., Ren, J., Wu, A., Li, H., 2019. A novel wet-mechanochemical pretreatment for the efficient enzymatic saccharification of lignocelluloses: Small dosage dilute alkali assisted ball milling. *Energy Convers Manag* 194, 46–54.
- Ibbett, R., Gaddipati, S., Tucker, G., 2018. Understanding the mechanisms of cooperative physico-chemical treatment and mechanical disintegration of biomass as a route for enhancing enzyme saccharification. *Biomass Convers Biorefin* 8 (2), 293–304.
- Ismail, K.S.K., Matano, Y., Sakihama, Y., Inokuma, K., Nambu, Y., Hasunuma, T., Kondo, A., 2022. Pretreatment of extruded Napier grass by hydrothermal process with dilute sulfuric acid and fermentation using a cellulose-hydrolysing and xylose-assimilating yeast for ethanol production. *Bioresour. Technol.* 343, 126071.
- Karanicola, P., Patsalou, M., Stergiou, P.Y., Kavallieratou, A., Evripidou, N., Christou, P., Panagiotou, G., Damianou, C., Papamichael, E.M., Koutinas, M., 2021. Ultrasound-assisted dilute acid hydrolysis for production of essential oils, pectin and bacterial cellulose via a citrus processing waste biorefinery. *Bioresour. Technol.* 342, 126010.
- Karunanithy, C., Muthukumarappan, K., Gibbons, W.R., 2014a. Sequential extrusion–microwave pretreatment of switchgrass and big bluestem. *Bioresour. Technol.* 153, 393–398.
- Karunanithy, C., Muthukumarappan, K., Gibbons, W.R., 2014b. Sequential extrusion–ozone pretreatment of switchgrass and big bluestem. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172 (7), 3656–3669.
- Kim, S.M., Dien, B.S., Singh, V., 2016. Promise of combined hydrothermal/chemical and mechanical refining for pretreatment of woody and herbaceous biomass. *Biotechnol. Biofuels* 9, 97.
- Kostas, E.T., Beneroso, D., Robinson, J.P., 2017. The application of microwave heating in bioenergy: A review on the microwave pre-treatment and upgrading technologies for biomass. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 77, 12–27.
- Kuster Moro, M., Sposina Sobral Teixeira, R., Sant’Ana da Silva, A., Duarte Fujimoto, M., Albuquerque Melo, P., Resende Secchi, A., Pinto da Silva Bon, E., 2017. Continuous pretreatment of sugarcane biomass using a twin-screw extruder. *Ind. Crop Prod.* 97, 509–517.
- Kwon, J.H., Kang, H., Sang, B.-I., Kim, Y., Min, J., Robert, J.M., Lee, J.H., 2016. Feasibility of a facile butanol bioproduction using planetary mill pretreatment. *Bioresour. Technol.* 199, 283–287.
- Lee, J.J.L., Cooray, S.T., Mark, R., Chen, W.N., 2019. Effect of sequential twin-screw extrusion and fungal pretreatment to release soluble nutrients from soybean residue for carotenoid production. *J. Sci. Food Agri* 99 (5), 2646–2650.

- Licari, A., Monlau, F., Solhy, A., Buche, P., Barakat, A., 2016. Comparison of various milling modes combined to the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioenergy production: Glucose yield and energy efficiency. *Energy* 102, 335–342.
- Lindorfer, J., Lettner, M., Hesser, F., Fazeni, K., Rosenfield, D., Annevelink, B., Mandl, M., 2019. Technical, economic and environmental assessment of biorefinery concepts: Developing a practical approach for characterisation. In *IEA Bioenergy Task (Vol. 42)*.
- Liu, H., Chen, X., Ji, G., Yu, H., Gao, C., Han, L., Xiao, W., 2019. Mechanochemical deconstruction of lignocellulosic cell wall polymers with ball-milling. *Bioresour. Technol.* 286, 121364.
- Liu, Q., He, W.-Q., Aguedo, M., Xia, X., Bai, W.-B., Dong, Y.-Y., Song, J.-Q., Richel, A., Goffin, D., 2021. Microwave-assisted alkali hydrolysis for cellulose isolation from wheat straw: Influence of reaction conditions and non-thermal effects of microwave. *Carbohydr. Polym.* 253, 117170.
- Liu, H., Pang, B., Zhao, Y., Lu, J., Han, Y., Wang, H., 2018. Comparative study of two different alkali-mechanical pretreatments of corn stover for bioethanol production. *Fuel* 221, 21–27.
- Liu, C., van der Heide, E., Wang, H.S., Li, B., Yu, G., Mu, X.D., 2013. Alkaline twin-screw extrusion pretreatment for fermentable sugar production. *Biotechnol. Biofuels* 6.
- Lomovskiy, I., Bychkov, A., Lomovsky, O., Skripkina, T., 2020. Mechanochemical and size reduction machines for biorefining. *Molecules* 25 (22), 5345.
- Lomovsky, O., Bychkov, A., Lomovsky, I., 2016. Mechanical Pretreatment. In: *Biomass fractionation technology for a lignocellulosic feedstock based biorefinery*. Solange, Elsevier inc, p. 647.
- Lu, H.L., Zhang, L.L., Liu, C.C., He, Z.B., Zhou, X.F., Ni, Y.H., 2018. A novel method to prepare lignocellulose nanofibrils directly from bamboo chips. *Cellul.* 25 (12), 7043–7051.
- Lu, H.L., Zhang, L.L., Yan, M., Wang, K., Jiang, J.C., 2022. Screw extrusion pretreatment for high-yield lignocellulose nanofibrils (LCNF) production from wood biomass and non-wood biomass. *Carbohydr. Polym.* 277, 118897.
- Maitra, S., Singh, V., 2021. Balancing sugar recovery and inhibitor generation during energycane processing: Coupling cryogenic grinding with hydrothermal pretreatment at low temperatures. *Bioresour. Technol.* 321, 124424.
- Mak, T.M.W., Xiong, X., Tsang, D.C.W., Yu, I.K.M., Poon, C.S., 2020. Sustainable food waste management towards circular bioeconomy: Policy review, limitations and opportunities. *Bioresour. Technol.* 297, 122497.
- Makoure, D., Arhaliass, A., Echhelh, A., Legrand, J., 2020. Valorisation of fish by-products using reactive extrusion for biodiesel production and optimisation. *Waste Biomass Valoriz.* 11 (11), 6285–6293.
- Mankar, A.R., Pandey, A., Modak, A., Pant, K.K., 2021. Pretreatment of lignocellulosic biomass: A review on recent advances. *Bioresour. Technol.* 334, 125235.
- Marone, A., Trably, E., Carrere, H., Prompsy, P., Guillon, F., Joseph-Aime, M., Barakat, A., Fayoud, N., Bernet, N., Escudie, R., 2019. Enhancement of corn stover conversion to carboxylates by extrusion and biotic triggers in solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103 (1), 489–503.
- Martínez, R.D., Balmori, J.-A., Llana, F.D., Bobadilla, I., 2020. Wood density determination by drilling chips extraction in ten softwood and hardwood species. *Forests* 11, 383.
- Mayer-Laigle, C., Blanc, N., Rajaonarivony, R.K., Rouau, X., 2018. Comminution of dry lignocellulosic biomass, a review: Part I. from fundamental mechanisms to milling behaviour. *Bioengineering* 5 (2), 41.
- Mehariya, S., Patel, A.K., Obulisamy, P.K., Punniyakotti, E., Wong, J.W.C., 2018. Co-digestion of food waste and sewage sludge for methane production: Current status and perspective. *Bioresour. Technol.* 265, 519–531.
- Mikulski, D., Kłosowski, G., Menka, A., Koim-Puchowska, B., 2019. Microwave-assisted pretreatment of maize distillery stillage with the use of dilute sulfuric acid in the production of cellulosic ethanol. *Bioresour. Technol.* 278, 318–328.
- Moiceanu, G., Paraschiv, G., Voicu, G., Dinca, M., Negoita, O., Chitoiu, M., Tudor, P., 2019. Energy consumption at size reduction of lignocellulose biomass for bioenergy. *Sustainability* 11 (9), 2477.
- Moreno, A.D., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2020. 5 – Biorefineries for the valorisation of food processing waste. In: *Galanakis, C. (Ed.), II: The Interaction of Food Industry and Environment*. Academic Press, pp. 155–190.
- Moreno, A.D., Duque, A., Gonzalez, A., Ballesteros, I., Negro, M.J., 2021. Valorisation of greenhouse horticulture waste from a biorefinery perspective. *Foods* 10 (4), 814.
- Navarro, R.R., Otsuka, Y., Nojiri, M., Ishizuka, S., Nakamura, M., Shikimaka, K., Matsuo, K., Sasaki, K., Kimbara, K., Nakashimada, Y., Kato, J., 2018. Simultaneous enzymatic saccharification and comminution for the valorisation of lignocellulosic biomass toward natural products. *BMC Biotech.* 18, 79.
- Navarro, R.R., Otsuka, Y., Matsuo, K., Sasaki, K., Hori, T., Habe, H., Nakamura, M., Nakashimada, Y., Kimbara, K., Kato, J., 2020. Combined simultaneous enzymatic saccharification and comminution (SESC) and anaerobic digestion for sustainable biomethane generation from wood lignocellulose and the biochemical characterisation of residual sludge solid. *Bioresour. Technol.* 300, 122622.
- Negro, M.J., Duque, A., Manzanares, P., Sáez, F., Oliva, J.M., Ballesteros, I., Ballesteros, M., 2015. Alkaline twin-screw extrusion fractionation of olive-tree pruning biomass. *Ind. Crop. Prod.* 74, 336–341.
- Ntoutoglou, G., Drosou, F., Chatzimitikos, T., Athanasiadis, V., Bozinou, E., Dourtoglou, V.G., Elhakem, A., Sami, R., Ashour, A.A., Shafie, A., Lalas, S.I., 2022. Combination of pulsed electric field and ultrasound in the extraction of polyphenols and volatile compounds from grape stems. *Appl. Sci.* 12 (12), 6219.
- Oliva, J., Negro, M., Manzanares, P., Ballesteros, I., Chamorro, M., Sáez, F., Ballesteros, M., Moreno, A., 2017. A sequential steam explosion and reactive extrusion pretreatment for lignocellulosic biomass conversion within a fermentation-based biorefinery perspective. *Fermentation* 3 (2), 15.
- Ong, V.Z., Wu, T.Y., Chu, K.K.L., Sun, W.Y., Shak, K.P.Y., 2021. A combined pretreatment with ultrasound-assisted alkaline solution and aqueous deep eutectic solvent for enhancing delignification and enzymatic hydrolysis from oil palm fronds. *Ind. Crop. Prod.* 160, 112974.
- Periyasamy, S., Karthik, V., Kumar, P.S., Isabel, J.B., Temesgen, T., Hunegnaw, B.M., Melese, B.B., Mohamed, B.A., Vo, D.V.N., 2022. Chemical, physical and biological methods to convert lignocellulosic waste into value-added products. A review. *Environ. Chem. Lett.* 20 (2), 1129–1152.
- Ríos-González, L.J., Medina-Morales, M.A., Rodríguez-De la Garza, J.A., Romero-Galarza, A., Medina, D.D., Morales-Martínez, T.K., 2021. Comparison of dilute acid pretreatment of agave assisted by microwave versus ultrasound to enhance enzymatic hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 319, 124099.
- Rol, F., Karakashov, B., Nechiporchuk, O., Terrien, M., Meyer, V., Dufresne, A., Belgacem, M.N., Bras, J., 2017. Pilot-Scale twin screw extrusion and chemical pretreatment as an energy-efficient method for the production of nanofibrillated cellulose at high solid content. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 5 (8), 6524–6531.
- Santala, O., Nordlund, E., Poutanen, K., 2013. Use of an extruder for pre-mixing enhances xylanase action on wheat bran at low water content. *Bioresour. Technol.* 149, 191–199.
- Schmitz, E., Karlsson, E.N., Adlercreutz, P., 2021. ultrasound assisted alkaline pretreatment efficiently solubilises hemicellulose from oat hulls. *Waste Biomass Valoriz.* 12 (10), 5371–5381.
- Searle, S., Malins, C., 2015. A reassessment of global bioenergy potential in 2050. *GCB Bioenergy* 7 (2), 328–336.
- Sharma, P., Gaur, V.K., Sirohi, R., Varjani, S., Hyoun Kim, S., Wong, J.W.C., 2021. Sustainable processing of food waste for production of bio-based products for circular bioeconomy. *Bioresour. Technol.* 325.
- Sharma, P., Vishvakarma, R., Gautam, K., Vimal, A., Kumar Gaur, V., Farooqui, A., Varjani, S., Younis, K., 2022. Valorisation of citrus peel waste for the sustainable production of value-added products. *Bioresour. Technol.* 351, 124684.
- Shen, F., Xiong, X., Fu, J., Yang, J., Qiu, M., Qi, X., Tsang, D.C.W., 2020. Recent advances in mechanochemical production of chemicals and carbon materials from sustainable biomass resources. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 130, 109944.
- Siddique, I.J., Salema, A.A., Antunes, E., Vinu, R., 2022. Technical challenges in scaling up the microwave technology for biomass processing. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 153, 111767.
- Sirohi, R., Tarafdar, A., Singh, S., Negi, T., Gaur, V.K., Gnansounou, E., Bharathiraja, B., 2020. Green processing and biotechnological potential of grape pomace: Current trends and opportunities for sustainable biorefinery. *Bioresour. Technol.* 314, 123771.
- Sitotaw, Y.W., Habtu, N.G., Gebreyohannes, A.Y., Nunes, S.P., Van Gerven, T., 2021. Ball milling as an important pretreatment technique in lignocellulose biorefineries: a review. *Biomass. Convers. Bioref.*
- Souza, M.F., Devriendt, N., Willems, B., Guisson, R., Biswas, J.K., Meers, E., 2022. Techno-economic Feasibility of Extrusion as a Pretreatment Step for Biogas Production from Grass. *Bioenergy Res.* 15 (2), 1232–1239.
- Subhedar, P.B., Ray, P., Gogate, P.R., 2018. Intensification of delignification and subsequent hydrolysis for the fermentable sugar production from lignocellulosic biomass using ultrasonic irradiation. *Ultrason. Sonochem.* 40, 140–150.
- Suriapparao, D.V., Tejasvi, R., 2022. A review on role of process parameters on pyrolysis of biomass and plastics: Present scope and future opportunities in conventional and microwave-assisted pyrolysis technologies. *Process Saf. Environ. Prot.* 162, 435–462.
- Tian, D., Shen, F., Yang, G., Deng, S., Long, L., He, J., Zhang, J., Huang, C., Luo, L., 2019. Liquid hot water extraction followed by mechanical extrusion as a chemical-free pretreatment approach for cellulosic ethanol production from rigid hardwood. *Fuel* 252, 589–597.
- Tian, C.C., Yan, M., Huang, X.Y., Zhong, Y.D., Lu, H.L., Zhou, X.F., 2022. Highly acetylated lignocellulose prepared by alkaline extrusion pretreatment assisted acetylation reaction. *Cellul.* 29 (3), 1487–1500.
- Trujillo-Juárez, L.G., Hernández-Meléndez, Ó., Gimeno, M., Gracia-Fadrique, J., Bárzana, E., 2021. Extraction of essential oil from waste grapefruit peel using a pilot-scale twin-screw extruder. *ACS Food Sci. Technol.* 1 (7), 1198–1205.
- Tsubaki, S., Azuma, J.I., Yoshimura, T., Maitani, M.M., Suzuki, E., Fujii, S., Wada, Y., 2016. Microwave-induced biomass fractionation. In: *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*, S. Mussato (Ed), pp. 103–126.
- Tsubaki, S., Azuma, J.I., Fujii, S., Singh, R., Thallada, B., Wada, Y., 2018. Microwave-driven biorefinery for utilisation of food and agricultural waste biomass. In: *Waste Biorefinery: Potential and Perspectives*. H. Bhaskar, A. Pandey, S. V. Mohan, D.-J. Lee, S. K. Khanal (Eds), Elsevier pp. 393–408.
- Vandenbosche, V., Brault, J., Vilarem, G., Hernández-Meléndez, O., Vivaldo-Lima, E., Hernández-Luna, M., Barzana, E., Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, M., Mata, J., Castellón, E., Rigal, L., 2014. A new lignocellulosic biomass deconstruction process combining thermo-mechano chemical action and bio-catalytic enzymatic hydrolysis in a twin-screw extruder. *Ind. Crop. Prod.* 55, 258–266.
- Victorin, M., Davidsson, Å., Wallberg, O., 2020. Characterisation of Mechanically Pretreated Wheat Straw for Biogas Production. *Bioenergy Res.* 13 (3), 833–844.
- Vidal, B.C., Dien, B.S., Ting, K.C., Singh, V., 2011. Influence of feedstock particle size on lignocellulose conversion-A Review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 164 (8), 1405–1421.
- Villasante, J., Espinosa-Ramírez, J., Pérez-Carrillo, E., Heredia-Olea, E., Almajano, M., 2021. Extrusion and solid-state fermentation with the phenolic compounds and radical scavenging activity of pecan nut shell. *Brit. Food J.* 123 (12), 4367–4382.

- Wang, Z., Dien, B.S., Rausch, K.D., Tumbleson, M.E., Singh, V., 2018. Fermentation of undetoxified sugarcane bagasse hydrolyzates using a two stage hydrothermal and mechanical refining pretreatment. *Bioresour. Technol.* 261, 313–321.
- Wang, S., Li, F., Zhang, P., Jin, S., Tao, X., Tang, X., Ye, J., Nabi, M., Wang, H., 2017b. Ultrasound assisted alkaline pretreatment to enhance enzymatic saccharification of grass clipping. *Energy Convers. Manage.* 149, 409–415.
- Wang, Q.F., Niu, L.L., Jiao, J., Guo, N., Zang, Y.P., Gai, Q.Y., Fu, Y.J., 2017a. Degradation of lignin in birch sawdust treated by a novel *Myrothecium verrucaria* coupled with ultrasound assistance. *Bioresour. Technol.* 244, 969–974.
- Wu, Y., Ge, S., Xia, C., Mei, C., Kim, K.-H., Cai, L., Smith, L.M., Lee, J., Shi, S.Q., 2021. Application of intermittent ball milling to enzymatic hydrolysis for efficient conversion of lignocellulosic biomass into glucose. *Renew Sustain. Energy Rev.* 136, 110442.
- Xiong, Z.Y., Qin, Y.H., Ma, J.Y., Yang, L., Wu, Z.K., Wang, T.L., Wang, W.G., Wang, C.W., 2017. Pretreatment of rice straw by ultrasound-assisted Fenton process. *Bioresour. Technol.* 227, 408–411.
- Yang, Y., Zhang, M., Zhao, J., Wang, D., 2022. Effects of particle size on biomass pretreatment and hydrolysis performances in bioethanol conversion. *Biomass Convers. Biorefinery*.
- Zakaria, M.R., Norraahim, M.N.F., Hirata, S., Hassan, M.A., 2015. Hydrothermal and wet disk milling pretreatment for high conversion of biosugars from oil palm mesocarp fiber. *Bioresour. Technol.* 181, 263–269.
- Zhang, Y.W., Li, T.T., Shen, Y.B., Wang, L., Zhang, H., Qian, H.F., Qi, X.G., 2020. Extrusion followed by ultrasound as a chemical-free pretreatment method to enhance enzymatic hydrolysis of rice hull for fermentable sugars production. *Ind. Crop. Prod.* 149, 112356.
- Zhang, F., Lan, W., Zhang, A., Liu, C., 2022. Green approach to produce xylo-oligosaccharides and glucose by mechanical-hydrothermal pretreatment. *Bioresour. Technol.* 344, 126298.
- Zhang, Z., Tahir, N., Li, Y., Zhang, T., Zhu, S., Zhang, Q., 2019. Tailoring of structural and optical parameters of corncobs through ball milling pretreatment. *Renew. Energy* 141, 298–304.
- Zheng, J., Choo, K., Bradt, C., Lehoux, R., Rehmann, L., 2014. Enzymatic hydrolysis of steam exploded corncob residues after pretreatment in a twin-screw extruder. *Biotechnol. Rep.* 3, 99–107.
- Zhou, M., Tian, X., 2022. Development of different pretreatments and related technologies for efficient biomass conversion of lignocellulose. *Int. J. Biol. Macromol.* 202, 256–268.

ARTÍCULO IV

REVIEW

Open Access



Challenges and prospects of yeast-based microbial oil production within a biorefinery concept

María Gallego-García^{1,2}, Ana Susmozas¹, María José Negro^{1*} and Antonio D. Moreno¹

Abstract

Biodiesel, unlike to its fossil-based homologue (diesel), is renewable. Its use contributes to greater sustainability in the energy sector, mainly by reducing greenhouse gas emissions. Current biodiesel production relies on plant- and animal-related feedstocks, resulting in high final costs to the prices of those raw materials. In addition, the production of those materials competes for arable land and has provoked a heated debate involving their use food vs. fuel. As an alternative, single-cell oils (SCOs) obtained from oleaginous microorganisms are attractive sources as a biofuel precursor due to their high lipid content, and composition similar to vegetable oils and animal fats. To make SCOs competitive from an economic point of view, the use of readily available low-cost substrates becomes essential. This work reviews the most recent advances in microbial oil production from non-synthetic sugar-rich media, particularly sugars from lignocellulosic wastes, highlighting the main challenges and prospects for deploying this technology fully in the framework of a Biorefinery concept.

Keywords Lignocellulose, Biowaste, Biofuel, Circular bioeconomy, Oleaginous yeast, Microbial oil

Introduction

The development and implementation of a circular bio-based economy have been extensively promoted in recent years as an alternative to the use of fossil resources. This transformative process will definitely contribute to the UN's Sustainable Development Goals, involving a wide range of economic sectors and industries (e.g., food, forestry, pharmaceuticals, chemistry and textiles) [1]. Among the diverse bioproducts available, biofuels have a central role in developing such a bioeconomy, and

extensive research efforts have been targeted at placing these compounds on the market. Independently of the raw material from which biofuels are produced, these bio-based products can enable energy independence, reduce greenhouse gas emissions, and enhance sustainable economic development [2]. In addition, costs can be decreased by the use of residual products. Among the different residues, low-input farming have the smallest carbon and nitrogen footprints and are usually cheaper feedstocks.

Biodiesel is the second most-produced liquid biofuel after bioethanol worldwide, reaching 48 billion litres in 2021 [2]. Current biodiesel production is based on vegetable oils and animal fats. These raw materials are usually associated with limited availability, competition with arable land and high costs. In contrast, single-cell oils (SCOs, also known as microbial lipids) obtained from oleaginous microorganisms have been positioned as a

*Correspondence:

María José Negro
mariajose.negro@ciemat.es

¹Advanced Biofuels and Bioproducts Unit, Department of Energy, Research Center for Energy, Environment and Technology (CIEMAT), Avda. Complutense 40, Madrid 28040, Spain

²Department of Biomedicine and Biotechnology, University of Alcalá de Henares, Alcalá de Henares, Spain



© The Author(s) 2023. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

promising alternative for intermediate hydrocarbon biofuel production. In addition to having a similar composition to vegetable oils, these feedstocks do not depend on geographic location, seasonal changes, harvest schedules or transportation, and they usually exhibit fast production rates and are easy to scale up for industrial processing [3, 4]. However, large-scale biodiesel production from microbial oils still requires overcoming some obstacles, including harsh microbial culture conditions and difficulties during microbial harvesting and oil extraction [5].

Oleaginous microorganisms are bacteria, yeasts, filamentous fungi, and microalgae that may accumulate lipids intracellularly with concentration of over 20% (w/w) of their dry weight and, under special condition, up to 80% (w/w) [5–7]. These microorganisms may grow in a wide range of substrates, from pure glucose to organic wastes, the latter the preferred choice due to the possible cost reduction [8]. In addition to the lower prices, the use of wastes for microbial oil production will reduce the overall discarded waste figures, thus contributing to the zero-waste target of the circular economy.

Oleaginous microorganisms can also co-produce compounds with biotechnological potential in a biorefinery process. Therefore, besides obtaining SCOs, the process may benefit from recovering other high-added-value products that can make production more economically attractive. These compounds include citric acid, carotenoids, biosurfactants, glycerol and mannitol, among others [9–12]. The present article highlights the recent advances in using low-cost, non-synthetic sugar-rich media, including lignocellulosic residues and industrial wastes for SCO production, targeting and discussing the main achievements in the case of microbial lipid production by yeasts. In addition, the most promising co-products will be listed and critically discussed from an integrated biorefining perspective.

Microbial oil production: process overview and cultivation strategies

To reduce the impact of scaling up production and to increase the chances of placing SCO-based biofuel on the market, developing robust bioprocesses is key [13].

Productivity in terms of high concentrations generated in relatively short periods of time is one of the most critical considerations in microbial oil production. Furthermore, an oil content of 40% has been set as the threshold-accumulated amount to reduce waste production during downstream processing [14]. Optimising process parameters and designing effective fermentation strategies have been the main targets for improving the conversion of raw materials into SCO [15].

Yeast cells trigger lipid production mainly under nutrient-limiting conditions and in the presence of high carbon/nitrogen (C/N) ratios [5, 16, 17]. Nitrogen, sulphur

and phosphorus are the main nutrient-limiting factors used to activate lipogenesis. However, low concentrations of a specific nutrient usually result in low cell biomass and may even cause cell growth inhibition [18]. André et al. reported a maximum cell biomass concentration of 4.2–8.2 g/L dry cell weight (DCW) when the yeast *Yarrowia lipolytica* was grown on a medium having crude glycerol (30 g/L) and ammonium sulphate and yeast extract (0.5 g/L each) as major carbon and nitrogen sources. Although the lipid accumulation found was low (maximum 0.20 g lipids/g DCW), non-negligible amounts of citric acid and mannitol were found in the growth medium. [19]. Similarly, *Rhodotorula glutinis* reached a cell biomass of 5.3 g/L when grown in pure glycerol at about 700 C/N ratio [20]. Glucose-based media have also yielded low cell biomass concentration (4.5 g DCW /L) when using *Y. lipolytica* at a C/N ratio of about 75 [21]. High lipid accumulation (47.5 w/w) was obtained using *Y. lipolytica* in a glucose-based media limited in nitrogen and magnesium [22]. Subsequently, by applying an adaptive laboratory evolution strategy of the same strain used in the work, as mentioned earlier, it was possible to increase the lipid content by 30%. The evolved strain was obtained after 77 generations in lack of nitrogen and magnesium while using glucose as a carbon source [23]. Final cell biomass concentrations are directly linked to the final microbial oil concentrations. Hence, final cell biomass concentrations of about 4.5–6.5 g/L DCW can result in up to 2 g/L of lipids, with oil content ranging from 30 to 45% [21–23]. *Y. lipolytica*, has also shown the capacity to accumulate endo-polysaccharides in the early stages of culture despite the presence of nitrogen in the medium [24]. This interesting trait has also been reported in other yeast such as *Rhodospiridium toruloides*, *Cryptococcus curvatus* and *Lipomyces starkeyi*. These endo-polysaccharides can be therefore considered as advantageous co-products increasing the economic viability and sustainability of the SCO bioprocess [25–27].

In contrast to the batch operational mode, using fed-batch and continuous cultivation modes can improve substrate utilisation, thus contributing to higher conversion yields [28, 29]. These alternatives favour greater productivity and prevent the systems from inhibiting cell growth. Karamerou and Webb have reviewed how these operational modes influence the process to provide the necessary nutrients during each growth phase and support high lipid production titers [13].

In fed-batch culture, the substrate is fed to the system at different stages during the cultivations phase, while the product remains in the bioreactor until the end of the run. Two common fed-batch strategies are used for SCO production: (1) fed-batch cultivations with pulse-feeding medium addition and (2) fed-batch cultivations

with continuous medium supply. Regardless of the strategy use, fed-batch cultivation effectively increases final cell biomass and lipid concentrations [30]. For instance, a fed-batch strategy using a glucose medium increased the cell biomass concentration of *Candida viswanathii* from 17 g/L DCW with the batch strategy to 21 g/L DCW [31]. In addition to the higher final cell biomass concentration, these authors reported an increase in the oil content from 33 to 50%, doubling the final lipid concentration (from 5.6 g/L to 10.5 g/L). Raimondi et al. also increased the final oil concentration obtained with the yeast *Candida freyschussii* using a fed-batch strategy with pure glycerol media [32]. In that study, 2-pulse, 4-pulse and continuous fed-batches increased SCO content 2.0-, 4.4- and 6.1-fold, respectively, for final lipid concentrations of 9.1 g/L, 20 g/L and 28 g/L compared to the 4.6 g/L concentration obtained with the batch strategy. In contrast to the study with *C. viswanathii* which increased its intracellular oil content by 1.5 times [31], *C. freyschussii* always produced an oil content in the range of 30–35% independent of the operation mode and the feeding strategy [32].

The fed-batch operation mode with a pulsed medium addition strategy can follow different feeding patterns based on parameters such as a specific nutrient concentration (commonly the carbon source), the dissolved oxygen levels and the fermentation time [20, 33–35]. One of the main approaches used for the further addition of the carbon source is when this nutrient is at low levels. Maina et al. fed the system with a glucose solution when the concentration of this component decreased to around 5 g/L [33]. A similar strategy was followed by Thiru et al., where the system was fed with a concentrated glycerol solution when the concentration was below 3 g/L [34]. This feeding strategy contributes to increased final cell biomass concentrations. For instance, a final cell biomass concentration as high as 110 g/L DCW was obtained by Tsakona et al. when growing *Lipomyces starkeyi* in a flour-rich hydrolysate using pulse addition when glucose content dropped below 20 g/L [36]. The relative dissolved oxygen level is another parameter that can be used to design the feeding strategy. Dissolved oxygen content increases when the metabolic activity of the fermentative microorganism decreases, mainly due to carbon source depletion. When observing such a shift in the system, the carbon source is then fed accordingly. This strategy was followed by Meesters et al. using *Cryptococcus curvatus* as the fermentative microorganism and 87% pure glycerol as the carbon source [37]. Although very high final cell biomass concentrations of up to 118 g/L were obtained, the authors reported a maximum oil content of only 25%. In addition to monitoring the carbon concentration and oxygen levels, the feeding strategy can be done by simply considering a specific time interval. *R. glutinis* was cultured in a glycerol-based medium following a

fed-batch strategy where the fresh substrate was added to the system every 24 h, almost doubling the final cell biomass concentration (9.4 g/L vs. 5.3 g/L) and the lipid content (2.6 g/L vs. 1.7 g/L) [20]. Uçkun Kiran et al. also followed this process scheme with *Rhodospiridium toruloides* using crude glycerol as the carbon source [38]. After a batch phase of 72 h, crude glycerol was added to the system every 24 h to achieve final concentrations of 70–90 g/L. This approach produced a final cell biomass concentration of 23.1 g/L and a lipid content of 9.4 g/L, compared to 12.1 g/L and 6.1 g/L, respectively, obtained in the batch mode.

As an alternative to the pulse-feeding strategy, the substrate can be fed to the system continuously. With the continuous fed-batch strategy, finding the optimal feeding rate is of utmost importance for effective lipid production, although only a few studies have addressed this point [13, 31, 32, 39]. For instance, Zhao et al. designed a continuous feeding strategy to keep the glucose concentration at low levels (< 5 g/L) during the feeding phase [39]. This process scheme increased the cell biomass concentration and oil content from 89 g/L DCW and 52.2% to 127.5 g/L DCW and 61.8% compared to a pulsed-feeding strategy. In contrast, Raimondi et al. followed a continuous feeding strategy using glycerol as the carbon source, which resulted in glycerol accumulation in the medium at the initial stages of substrate addition [32]. However, it also produced a higher cell biomass concentration when compared to the pulsed-feeding strategies. Other alternatives to the constant feeding of the substrate for SCO production are exponential and variable feeding, where the feeding rate is adjusted according to specific equations or to maintain a particular parameter (e.g. C/N ratio) [40, 41]. These strategies have also resulted in high cell biomass concentration with a high accumulation percentage. For example, fed-batch cultivation of *R. glutinis* with exponential feeding resulted in a final cell biomass concentration of about 40 g/L with an oil content of 43% [41]. On the other hand, a final cell biomass concentration as high as 132 g/L DCW with an oil content of about 55% was observed when culturing *Trichosporon oleaginosus* with a feeding strategy based on maintaining a constant C/N ratio [40].

During fed-batch fermentation, it is essential to consider the dilution effect to avoid reducing cell density and to keep nutrient concentrations at adequate levels [13]. In this context, using concentrated substrate solutions containing all required nutrients during the feeding phase is essential [32].

Continuous cultivation in SCO production is also of interest because it increases productivity compared to the batch fermentation mode [18]. This system continuously provides carbon and nitrogen sources while allowing continuous collection of products and cells. A constant

C/N ratio is preserved when reaching the steady state phase at a specific dilution rate (D). Under these conditions, cell concentration remains constant since growth and substrate uptake rates do not vary, while lipid production is promoted by controlling the nitrogen concentration. The dilution rate is the main parameter affecting the final cell biomass concentration and lipid content. In this regard, Papanikolaou and Aggelis observed a reduction in the lipid content from 3.5 to 0.3 g/L and in the cell biomass concentration from 8.1 to 3.8 g/L after increasing the dilution rate from 0.03 h⁻¹ to 0.13 h⁻¹ during the continuous cultivation of *Y. lipolytica* LGAM S(7)1 in crude glycerol [42]. Similar results have also been found when using other carbon sources and microbial strains. For instance, continuous fermentation of *R. toruloides* AS 2.1389 in glucose media at D ranging 0.02–0.20 h⁻¹ resulted in cell biomass concentrations of 1.63–8.67 g/L DCW and lipids content of 0.21–5.36 g/L, the lower values being obtained with the higher dilution rates [43]. Similarly, cell biomass concentration and lipid content in *C. curvatus* decreased from 5.1 to 0.8 g DCW/L and 3.4 to 0.12 g lipid/L after increasing D values from 0.01 to 0.11 h⁻¹ in an acetate-based medium [44].

In addition to affecting lipid production, the feeding rate in continuous cultivation is critical in directing carbon flux and cellular metabolism to energy, maintenance and product synthesis [42, 45]. This system benefits from continuously harvesting cells that can be processed directly after collection. Nevertheless, long-term fermentation can suffer from media sedimentation and biofilm formation. Furthermore, there is a high risk of contamination, and the yield can fluctuate depending on cellular changes [15].

Other advanced cultivation systems have been developed to optimise the process of SCO production. One such system is two-stage fermentation, which first targets producing cell biomass in nutrient-rich conditions and then on lipid accumulation under nutrient limitations and in an excess of carbon [46]. Therefore, the two-stage lipid production process focuses seeks to improve lipid production by optimising both cell proliferation and lipid accumulation stages. The accumulation stage requires optimisation when using this cultivation system, since cell growth only requires nutrient-rich media. In this context, these cultivation systems can follow a two-stage batch or two-stage strategy with a feeding addition [45, 47].

Lignocellulosic biomass and industrial wastes as raw material

During SCO production, the cost of raw materials can account for 40–70% of the total overall costs, with highly refined polysaccharides such as industrial-grade glucose and sucrose accounting for about 80% of such costs

[47–51]. Using low-cost substrates, including lignocellulosic biomass and industrial waste, are promising alternatives for microbial lipid production [52–54].

Residual lignocellulosic biomass and waste-derived substrates are excellent candidates as carbon sources to make this process both cost-effective and environmentally friendly. In this context, sugarcane bagasse residues, cheese whey, corn stover, potato wastewater or orange peel extracts have been previously investigated for SCO production [55–59]. Table 1 summarises the most recent literature on using biomass residues for SCO production, mainly focusing on lignocellulosic sources.

Oleaginous yeasts can also use hydrophilic and hydrophobic substrates to accumulate lipids via two pathways: *de novo* and *ex novo* lipid synthesis [60]. Notably, both pathways offer distinct advantages: *de novo* lipid fermentation can generate a high quantity of lipids. In contrast, *ex novo* lipid fermentation can modify the lipid compositions to satisfy the requirements of the chemical or food industries. Thus, improving and upgrading fatty materials utilized as substrates can produce “tailor-made” lipids of high-added value [61]. The combined production of *de novo* and *ex novo* lipids has been studied, for instance, by using the yeast *Trichosporon dermatis* and a mixed medium combining an acid hydrolysate of corn cob and a soybean. That study confirms the potential of using both substrates (hydrophilic and hydrophobic) for the production of lipids with application in the production of biodiesel or lipid-based chemical compounds. [62].

For SCO production, lignocellulosic biomass feedstock processing is required to obtain the corresponding fermentable sugars. This processing step depends a great deal on the biomass. Sugars contained in non-lignocellulosic wastes, such as agri-food residues, can be easily obtained by crushing and centrifugation processes [48, 86, 87]. In contrast, lignocellulosic biomass is highly recalcitrant to hydrolysis, and biomass pretreatment is required to alter its structure and increase the accessibility of hydrolytic enzymes to the sugar polymers before the saccharification step. A wide range of pretreatment methods using physical, chemical, physicochemical or biological approaches has been investigated towards this aim. Pretreatment processes have been extensively reviewed to summarise and update the main most important new developments and features from each technology. There is no universal pretreatment technology that can be applied to lignocellulose, since biomass is a heterogeneous category including materials that are sufficiently distinct as to require different approaches [88]. In general, biomass pretreatment usually requires severe conditions, such as high temperatures (> 160 °C), high pressures (5–30 bar) and/or the addition of an acid/alkali catalyst [89]. These conditions lead to biomass degradation and the generation of certain inhibitory compounds

Table 1 Recent literature on lipid production by oleaginous yeast from lignocellulosic biomass

Microorganisms	Lignocellulosic raw material/Pretreatment	Cultivation mode	Lipid content (w/w)	Lipid Yield Yp/s	Lipid concentration	Reference
<i>C. curvatus</i>	Rice straw Pretreatment (Glycerol-FeCl ₃)	Batch	46.8%	0.17 g lipid/g	8.8 g/L	[63]
<i>C. curvatus</i> DSM 70022	Wastepaper Oxidising pretreatment (hydrogen peroxide 120°C-30 min)	Batch (Flask Erlenmeyer)	37.8%	0.234 g lipid/g	5.75 g/L	[64]
<i>C. curvatus</i> DSM 70022	Wastepaper pretreated (diluted acid)	Batch (Flask Erlenmeyer)	43.1%	0.141 g lipid/g	4.95 g/L	[64]
<i>Cryptococcus sp</i> MTCC 5455	<i>Brassica juncea</i> Microwave-Assisted Dilute Alkali Pretreatment	Batch (Flask Erlenmeyer)			11.05 g/L	[65]
<i>C. oleaginosum</i>	Corn stover Alkali organosolv pretreatment (NaOH:Methanol, 80 °C, 1 h)	Batch (Erlenmeyer Flask) Fed-batch (2 pulses)	61.7%	0.18 g lipid/g	31.3 g/L	[66]
<i>L. starkeyi</i>	Sugarcane bagasse (hydrolysate) 1.5% sulfuric acid (w/v) at a solid-to-liquid ratio of 1:10 in an autoclave at 120 °C for 20 min	Batch (Erlenmeyer Flask) Bioreactor (3 L) Continuous	26.1% 27.3%	0.14 g lipid/g 0.18 g lipid/g	2.1- g/L 3.14 g/L	[67]
<i>L. starkeyi</i> DMS 90276	Sugarcane bagasse (hemicellulose hydrolysate) Pretreatment dilute acid (1.5% (w/v) H ₂ SO ₄ at 120 °C for 20 min)	Batch (Erlenmeyer Flask)	44.8%	0.16 g lipid/g	3.53 g/L	[68]
<i>L. starkeyi</i> DSM 70295	Oil palm empty fruit bunch Alkali pretreatment (3.75 M NaOH, 120° C, 1 h)	Batch (Erlenmeyer Flask)	40%	0.162 g lipid/g	4.9 g/L	[69]
<i>L. starkeyi</i> NRRL Y-11557	Corn stover Ammonia fiber explosion (AFEX) pretreatment	Batch (Erlenmeyer Flask)	38%	0.14 g lipid/g	9 g/L	[70]
<i>M. pulcherrima</i>	Starch hydrolysate	Batch fermentation (250 L)	34.3%	0.21 g lipid/g	15.8 g/L	[71]
<i>M. pulcherrima</i>	Starch hydrolysate	Semi-continuous (250 L)	32.6%	0.16 g lipid/g	11.6 g/L	[71]
<i>R. babjevae</i> DVBPG 8058	Wheat straw hydrolysate (steam explosion 190°C 10 min; 1% acetic acid (soaked overnight)	Batch (0.5 L Bioreactor)	64.8%	0.24 g lipid/g	18.1 g/L	[72]
<i>R. fluvialis</i>	Sugarcane top (alkaline-hydrogen pretreatment)	Bath	63.1%	0.23 g lipid/g	19.1 g/L	[73]
<i>R. fluvialis</i>	Sugarcane top (alkaline-hydrogen pretreatment) plus crude glycerol	Fed-batch (3 L fermenter) (continuous fed crude glycerol solution)	61.4%	0.33 g lipid/g	23.6 g/L	[73]
<i>R. glutinis</i>	Corn cob Acid pretreatment (sulfuric acid + phosphoric acid, S/L ratio 1/3, 123°C 60 min)	Batch (5 L fermentor) High cell density culture with two-stage nitrogen feeding strategy	47.2%	0.159 g lipid/g	33.5 g/L	[74]
<i>R. glutinis</i> + <i>C. pyrenoidosa</i>	Cassava bagasse enzymatic hydrolysate (concentrated)	Batch (Erlenmeyer Flask)	58.73%	0.230 g lipid/g	17.7 g/L	[75]
<i>R. taiwanensis</i>	Corn cob hydrolysate (sulphuric acid 2.5% 121 2.5 h) detoxified	Batch (5 L fermenter)	60.3%	0.056 g oil/g corn cob	11.2 g/L	[76]
<i>R. toruloides</i>	Maple Wood Alkali pretreatment (NaOH 1%, S/L 1/10 (w/v) 121°C 15 psi, 30 min)	Erlenmeyer	36.68%	n.a.	6.25 g/L	[77]

Table 1 (continued)

Microorganisms	Lignocellulosic raw material/Pretreatment	Cultivation mode	Lipid content (w/w)	Lipid Yield Yp/s	Lipid concentration	Reference
<i>R. toruloides</i> AS 2.1389	Corn stover Dry acid pretreatment and biodegradation (2.5 g H ₂ SO ₄ /100 g dry corn stover; 175 °C, 5 min followed by biological detoxification process with <i>Amorphotheca resinae</i>)	Flasks SSLP (simultaneous saccharification and lipid production) PSSLP (prehydrolysis SSLP)		0.062 g/g corn stover 0.08 g/g corn stover 0.077 g/g corn stover	6.2 g/L 10.1 g/L 11.4 g/L	[78]
<i>R. toruloides</i> CBS 14	Wheat straw Acid-based steam explosion hydrolysate (10%) + crude glycerol	Batch (0.5 L Bioreactor)	46.8%	0.25 g lipid/g	10.6 g/L	[79]
<i>R. toruloides</i> CBS 14	Wheat straw Hydrolysate (steam explosion 190°C 10 min; 1% acetic acid (soaked overnight))	Batch (0.5 L Bioreactor)	39.31%	0.15 g lipid/g	11.72 g/L	[72]
<i>R. toruloides</i> CBS 14	Wheat straw Steam explosion (Acid-soaked (1% acetic acid), steam explosion 190 °C, 10 min.)	Batch (2 L Bioreactor)	41%	0.13 g lipid/g		[80]
<i>R. toruloides</i> DSMZ 4444	Corn stover (Combined pretreatment) NaOH 80°C 2 h/sulfuric acid preimpregnation 2 h, 160°C-10 min)	Batch DO-Fed-batch Pulse-Fed-batch Online-FB	56.67% 59.81% 61.54% 58.76%	0.19 g lipid/g 0.23 g lipid/g 0.24 g lipid/g 0.29 g lipid/g	21.2 g/L 25.2 g/L 26.7 g/L 31.7 g/L	[81]
<i>R. toruloides</i> NRLL	Fir wood (NaOH 1%, S/L 1/10 (w/v) 121°C 15 psi, 30 min)	Batch (Erlenmeyer Flask)	35.24%	n.a.	6.88 g/L	[77]
<i>R. toruloides</i> CCT 7815	<i>Eucalyptus urograndis</i> Hemicellulose hydrolysate, 160°C 195 min	Batch (Erlenmeyer Flask)	50%	0.13 g lipid/g		[82]
<i>Trichosporium dermatis</i>	Dilute acid corn stover (1% w/w H ₂ SO ₄ 160°C-10 min), pretreated biomass without washing. (1% H ₂ SO ₄ 180°C-10 min), pretreated biomass with washing.	Batch (Erlenmeyer Flask)	24.23% 45.06%	0.104 g lipid/g 0.156 g lipid/g	7.46 g/L 11.43 g/L	[83]
<i>T. dermatis</i>	Alkali pretreated corn stover (2% w/w, 120 °C, 20 min) -pretreated biomass without washing -pretreated biomass with washing	Batch (Erlenmeyer Flask)	28.4% 55.97%	0.101 g lipid/g 0.186 g lipid/g	6.81 g/L 20.36 g/L	[83]
<i>T. oleaginosus</i>	Shorghum stalk Swithgrass Alkali pretreatment (10%, w/v loading solid, 1.25%, w/v NaOH, 121°C, 30 min, 1 h)	Batch (Erlenmeyer Flask)	60% 58%	0.29 g lipid/g 0.27 g lipid/g	13.1 g/L 12.3 g/L	[84]
<i>Y. lipolytica</i>	Grass <i>Cyperus distans</i> Hydrothermal pretreatment (200°C 60 min plus delignification with diluted alkaline)	Batch (5 L bioreactor)	53.62%	n.a.	10.58 g/L	[85]

n.a., not available

that limit the subsequent saccharification and fermentation steps. The concentration and nature of these inhibitors are directly correlated with the raw material (i.e., herbaceous biomass, hardwood, softwood), the pretreatment technology and the conditions used (temperature, use of catalysts, the residence time, pH, pressure). Inhibitors are classified into weak organic acids, furan derivatives, and phenolic compounds. The inhibition mechanisms of these compounds differ between these

groups, and are usually highly interactive and synergistic, thus limiting biomass conversion processes by affecting both hydrolytic enzymes and fermentative microorganisms strongly. Different detoxification methods and/or increasing cell robustness of fermentative microorganisms have been investigated to overcome such inhibitory effects. Traditionally, pretreated biomass has been separated into liquid and solid fractions, and the solids are further subjected to a washing step before enzymatic

hydrolysis to allow conversion of that sugar-rich fraction. By washing the resulting pretreated solid fractions, Yu et al. increased lipid yield from dilute acid pretreated and dilute alkali pretreated corn stover about 1.5-fold and 1.8-fold (from 0.101 to 0.104 g/g to 0.156 and 0.186 g/g), respectively [58].

In addition to washing, several detoxification methods have been tested to reduce the inhibitory potential of lignocellulosic pretreated substrates. Major detoxification methods are classified into chemical treatment (e.g., overliming, surfactant addition), adsorption methods (e.g., resins, activated carbon) and biological treatment processes (e.g., enzyme and microbial treatment) [90]. In situ bi detoxification strategies are attractive approaches compared to other detoxification methods due to the cost reduction possible. In this context, increasing cell robustness against lignocellulosic-based inhibitors will provide novel microorganisms that can tolerate higher concentrations of these compounds [71]. For instance, the adaptation of *R. toruloides* was successful in increasing tolerance to inhibitors present in sugarcane hydrolysates and lipid production as compared to the parental strain [52]. Liu et al. subjected *R. toruloides* to evolutionary engineering using a wheat straw hydrolysate, increasing its growth performance in a highly challenging medium [91].

According to the recent literature (Table 1), the yeasts *C. curvatus* [63–65, 92, 93], *L. starkeyi* [67–70], *Metschnikowia pulcherrima* [71], *Y. lipolytica* [85]; and species belonging to the *Rhodospiridium* and *Rhodotorula* genera [72–74, 76–82, 94] are the main microbial strains being used for microbial lipid production with lignocellulosic biomass residues. These yeast strains have been tested for lipid production using different raw materials, including agricultural wastes (e.g., corn stover, wheat/rice straw, sugarcane bagasse), woody residues (e.g., maple wood, fir wood, eucalyptus) and energy crops (e.g., switchgrass) pretreated with a wide range of technologies including alkali/acid pretreatment, organosolv, oxidising pretreatment and ionic liquids, among other methods. In these studies, the intracellular lipid content, the lipid concentration and the lipid yields ranged from 2 to 65%, 2–33 g/L and 0.06–0.33 g lipid/g substrate, respectively. The highest intracellular lipid content using native oleaginous yeast strains has been reported in 60–65% (w/w) [72]. Brandenburg et al. reported a total intracellular lipid content of about 64.8% (with a total lipid production of 18.1 g/L and a conversion yield of 0.24 g/g) using a steam-pretreated wheat straw hydrolysate (steam explosion 190°C, 10 min; impregnated with 1% acetic acid) and the yeast *Rhodotorula babjevae* DVBPG 8058 [72]. Poontawee et al. estimated an intracellular lipid content of 63.1% in the yeast *Rhodospiridium fluvialys* using sugarcane top biomass pretreated

by alkaline-hydrogen pretreatment [73]. A total lipid content of about 60% has also been accumulated by the yeasts *Cutaneotrichosporon oleaginosum*, *R. toruloides*, *Rhodotorula taiwanensis* and *Trichosporon oleaginosus*, with yields ranging from 0.056 to 0.29 g/g [66, 76, 81, 84].

Despite previous examples showing very high lipid content, this parameter in non-genetically modified strains usually accounts for up to 30–40% of the total CDW. Cell biomass production and intracellular lipid content can be increased by co-utilising different substrates. For instance, crude glycerol (a by-product obtained during the transesterification reaction from biodiesel production) has been combined with different hemicellulosic hydrolysates obtained from herbaceous and woody biomass. Chmielarz et al. used *R. toruloides* to ferment a mixture of steam-exploded wheat straw hydrolysate and crude glycerol, resulting in shorter fermentation times [79]. A total lipid titer of 10.6 g/L with lipid yields of 0.25 g lipids/g consumed carbon was observed. Saini et al. combined a woody hemicellulosic hydrolysate with crude glycerol in a 60:40 ratio, which resulted in the consumption of 90% of the sugars and glycerol from the media and reporting a maximum intracellular lipid content of 56.3% (w/w) [95]. In that work, biomass and lipid volumetric productivity values were 0.28 g/L h and 0.15 g/L h, respectively. Furthermore, these authors reported a reduction in the fermentation time of about 50%, which represents a significant advantage for the process, as it saves energy and ultimately lowers total production costs.

The internal recycling nutrients and wastewater effluent for subsequent cultures represents an attractive strategy to improve both the economic viability and sustainability of bioprocessing for microbial oil production. For example, this concept has been applied to improve lipid production by recycling spent cell mass and lipid fermentation wastewater in microbial oil production from corn stalk hydrolysates obtained after alkali pretreatment by *R. toruloides* Y4. Results obtained in that study showed that up to three cycles could be applied in fully recycling the resources with only slightly reduced lipid production [96]. In addition to recycling the resulting wastewater internally during lipid production, the composition of this resource makes it appropriate to further use it in other bioprocesses to produce high-value products. For instance, the fermentation broth obtained after lipid production, during the fermentation of a corn-cob acid hydrolysate by *Trichosporon cutaneum*, which mainly contained the residual sugars and extracellular polysaccharides, was successfully used as substrate for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* [97]. In addition, the wastewater resulting from lipid fermentations has been also used as a maceration water

for the production of edible and medicinal mushrooms within a biorefinery concept [98].

An essential factor that must be considered during SCO production is the co-production of CO_2 during the process. The production of CO_2 may account for up to 35–50% (w/w) of the carbon in the raw material. A smart solution that has been proposed to reduce these values is the capture of CO_2 by integrating the production of lipids with microalgae cultivation [99]. Liu et al. investigated using a mixed culture between *R. glutinis* and *Chlorella pyrenoidosa* to produce lipids from an enzymatic hydrolysate obtained from cassava bagasse [75]. This co-culture strategy was also combined with a fed-batch cultivation mode, obtaining promising results in terms of lipid concentrations (18.47 g/L), intracellular content (58.73% w/w) and lipid yields (0.23 g/g of consumed sugar). Similarly, Zuccaro et al. investigated a mixed culture using *Chloroidium saccharophyllum* and the yeast *L. starkeyi* for lipid accumulation [100]. Among the benefits of this co-culture is the high capacity of *C. saccharophyllum* to assimilate CO_2 , its ability to grow under heterotrophic conditions, and its high tolerance to acidic environments, together with the ability of *L. starkeyi* to catabolise the inhibitors that are present in the lignocellulosic hydrolysates. Despite the potential of using such co-culture, the enzymatic hydrolysate obtained from steam-pretreated *Arundo donax* as medium (steam explosion: 210°C for 4 min; enzymatic hydrolysis: 5% substrate loading, 50°C, 15 FPU cellulases/g cellulose; 30 CBU beta-glucosidase/g

cellulose) resulted in low final lipid concentrations and lipid yields when compared to the results obtained with other consortia [75]. These authors attributed the lower final yields to a low sugar concentration during the experimental assays.

The biorefinery concept: taking advantage of co-production possibilities

In addition to using low-cost substrates, the economics of SCO production may also benefit from obtaining co-products of interest to industry, such as citric acid, carotenoids, biosurfactants, glycerol or mannitol [9–12, 48, 101] (Fig. 1). Yeasts capable of accumulating lipids and co-producing carotenoids, enzymes and other functional products have been considered excellent candidates for their potential use in biorefineries [102–104]. Among these products, carotenoids have been recognised as attractive food additives and nutritional supplements. Some carotenes (e.g., β -carotene) can be used as antioxidants, protecting cells, tissues and organs from the damaging effect of free radicals, thus preventing the development of some disorders such as cancer and/or heart disease [105, 106]. In 2022, the global β -carotene market reached \$575 million, which is expected to increase to \$955 million by 2032 [107]. Carotenoids are currently obtained from plant materials through extraction processes, microbial-based biosynthesis, and chemical synthesis [108]. More than 90% of commercial carotene is produced by chemical synthesis, which has

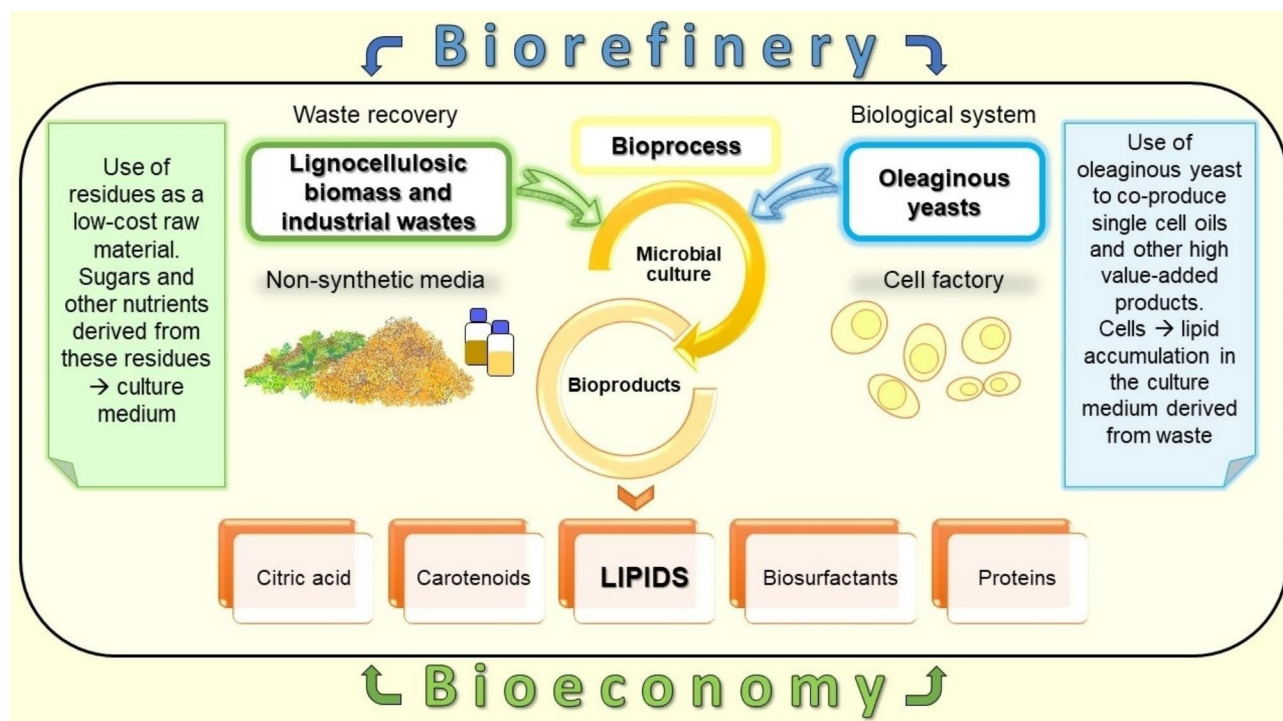


Fig. 1 Yeast cell factory for microbial oil production and value-add co-products

been criticised for the high toxicity of the reagents used and the formation of unwanted by-products.

To obtain these products more sustainably and meet the increasing demand, new emerging technologies are under investigation. Therefore, using microbial cells as biocatalysts for carotenoid production represents an attractive approach for achieving this goal. This strategy also offers additional advantages, including a short and environmentally friendly production cycle. Yeasts belonging to *Rhodotorula* species have exhibited the ability to produce carotenoids such as β -carotene, γ -carotene, torularhodin and torulene, and oil-lipids with an extensive profile of fatty acids. All these products can be obtained from a wide range of substrates, including lignocellulosic residues and industrial wastes such as sisal bagasse, sugarcane bagasse, corncob, wheat bran, switchgrass and wheat straw, camelina waste [91, 104, 109–113] (Table 2).

Yeasts produce carotenoids as antioxidant molecules to protect them from the cell damage resulting from the intracellular formation of reactive oxygen species (ROS), which are generated under stress-related conditions [114]. The kinetic parameters for carotenoid production are not only dependent on the yeast strain used but also on the specific culture conditions. As with the lipid production processes, different optimisation strategies have been tested to maximise carotenoid production [103]. The synthesis of carotenoids is influenced by factors involving microbial growth, including sugar concentration, temperature, pH, aeration rate and salt addition. Being an aerobic process, aeration and/or oxygenation is essential for carotenogenesis. In addition, culture supplementation with salts can stimulate the metabolic pathway of carotenoid-synthesising enzymes [112] allowing, in addition, work in non-aseptic conditions [115]. [91]

Non-sterile fermentation can be a potential strategy to lower the costs associated with fermentation processes [116]. Singh et al. observed an increase of 10% in carotenoid production by *R. toruloides* when using 5% NaCl [108, 117]. Temperature and pH also influence carotenoid compound production. For instance, Da Silva et al. increased carotenoids production titers in *Rhodotorula mucilaginosa* by 3.3 times (from 0.34 g/L to 1.13 g/L) after reducing the cultivation temperature from 34 °C to 22 °C [104]. These authors also reported the benefit of lowering pH from 7.0 to 5.0 to favour carotenoid production.

The great potential of carotenoids in the biotechnology sector has stimulated developments in the industrialisation of cultures and genetic modification technologies. Park et al. reviewed different approaches to genetic engineering in *R. toruloides* in order to explore its full potential as a biotechnological platform for the bioproduction of industrially relevant compounds [118]. In this sense, the development of synthetic and system biology tools in this yeast species has increased our knowledge about its genomic organisation, metabolic pathways and their regulation, and the generation of essential genetic components (e.g., promoters, markers, terminators) required to advance genetic engineering approaches.

Enzymes (e.g., lipases and endo- β -glucanases), bioethanol, and biosurfactants can also be co-produced during lipid accumulation as value-added compounds for increased process cost-effectiveness. Pi et al. engineered the oleaginous red yeast *R. glutinis* to simultaneously produce β -carotene (up to 27.13 mg/g) and cellulase enzymes without affecting the ability of the microorganism to accumulate lipids and to tolerate relatively high salt concentrations [121]. Cai et al. suggested an integrated biorefinery process to obtain microbial oil and

Table 2 Carotenoids produced by non-conventional oleaginous yeast from lignocellulosic biomass

Microorganism	Bio-product	Concentration/content	Raw material	Reference
<i>R. mucilaginosa</i>	Carotenoids	1.13 mg/L	Sisal bagasse hydrolysate (121°C, 3 h Sulphuric acid solution (5.5%) S/L ratio 1:10	[104]
<i>R. pacifica</i> INDKK	β -carotene	210.4 mg/L	5% (v/v) molasses supplemented with enzymatically hydrolysis alkali-pretreated sugarcane bagasse hydrolysate (35% v/v).	[113]
<i>R. toruloides</i> ATCC 204091	β -Carotene	62 mg/L 57 mg/L	Waste 'extract' from fruit peels and inedible/discarded parts of vegetables as culture medium	[119]
<i>R. toruloides</i> CBS 14	Carotenoids	1.99 mg/100 dry cell weight	Wheat straw Acid-soaked (1% acetic acid) steam explosion 190 °C/Enzymatic hydrolysis with cellulases	[80]
<i>R. toruloides</i> CBS 14	β -Carotene	1.48 mg/100 dry cell weight	Wheat straw hydrolysate (steam explosion 190°C 10 min; 1% acetic acid (soaked overnight)	[80]
<i>R. toruloides</i> DSM 4444	β -Carotene	16 mg/mL	Camelina meal as carbon source (SSF)	[120]
<i>R. toruloides</i> NRRL Y-1091 (evolved by adaptive laboratory evolution	carotenoids	14.09 mg/g dry cell weight	Wheat straw, hydrothermal pretreatment (195°-45 min)	[91]
<i>R. toruloides</i> NRRL Y 1091	carotenoids	15 mg/L	Switchgrass (Deep eutectic solvent pretreatment	[111]
<i>R. toruloides</i> RP15	carotenoids	12.7 mg/L	Sugarcane bagasse (Diluted acid pretreatment)	[112]

bioethanol from corncob bagasse [122]. These authors used the liquid fraction obtained after dilute acid pretreatment (0.27wt % H_2SO_4 , 120 °C, 120 min, solid/liquid ratio 10%) for microbial lipid production, while the enzymatic hydrolysate resulting from the solid fraction was used for bioethanol production. This processing strategy resulted in 131.3 g of bioethanol/kg raw material and 11.5 g of microbial lipids/kg raw material using the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *R. glutinis*, respectively. Brandenburg et al. studied the possibility of co-producing furfural, ethanol or lipids using wheat straw as the raw material [123]. The lignocellulosic biomass was pretreated by a patented thermochemical method. For ethanol production, they used the yeast *S. cerevisiae*; while for lipids, they used the oleaginous yeast *R. babjevae*. From 1 kg of wheat straw, 110 g of furfural, 111 g of ethanol or 33 g of lipids were obtained [124]. In addition, *R. babjevae* produced considerable amounts of heptadecenoic acid and α and γ -linolenic acid. Deeba et al. recently proposed a novel integrated biorefinery strategy to convert sugarcane industry waste into biodiesel, β -carotene, animal feed and xylooligosaccharides [113]. Xylooligosaccharides are obtained from the liquid fraction collected after alkali pretreatment and enzymatic treatment with xylanases, while lipids and β -carotene are obtained through fermentation with the red yeast *Rhodotorula pacifica* INDKK. Overall, this strategy resulted in 11.8 g/L of lipids, 210.4 mg/L of β -carotene, 7.1 g of animal feed, and 20.6 g/L of xylooligosaccharides.

Biosurfactants are also useful microbial-based compounds that yeast, fungi and bacteria can obtain. These compounds exhibit amphipathic chemical structures, mainly anionic or neutral, although cationic biosurfactants contain amine groups. The hydrophobic moiety is a long-chain fatty acid, and the hydrophilic moiety can be a carbohydrate, cyclic peptide, amino acid, phosphate, carboxylic acid, or alcohol [125]. They can be classified according to their chemical composition as glycolipids, lipopeptides or lipoproteins, polymers, fatty acids, neutral lipids and phospholipids. Biosurfactants have numerous advantages over synthetic surfactants, including higher biodegradability, low toxicity, thermal stability, resistance to extreme pH values, and ionic strength [125, 126]. Araújo et al. evaluated the production of biosurfactants by *R. mucilaginosa* LPP5 using an acid-catalysed hydrolysate from brewer's spent grain as substrate [127]. The resulting biosurfactant was anionic in nature (most likely a glycolipid-type biosurfactant) and showed functional properties to form stable emulsions under different conditions such as temperature, pH, and salinity.

Implementing microbial lipids production from lignocellulosic materials and industrial wastes on a large scale also requires simplifying and integrating the different steps of the process. Simultaneous Saccharification and

Fermentation (SSF) has been one of the most significant advances involving lignocellulosic ethanol production. However, configuring this process demands further development concerning microbial lipid production. Consolidated Bioprocessing (CBP) –which combines all the necessary stages (i.e., enzyme production, pretreatment, enzymatic hydrolysis, and sugar fermentation) to transform lignocellulose into lipids in a single reactor– is another promising integrated process. During CBP processes, a single microorganism or a mixture of microorganisms provides all the enzymatic activities needed to pretreat and hydrolyse a biomass and convert solubilised sugars into the product of interest [128]. Although CBP processes must be investigated thoroughly to optimise lipid production under this configuration, some examples can already be found in the literature. For instance, Intasit et al. proposed a CBP strategy for lipid production by co-cultivating the oleaginous fungus *Aspergillus tubingensis* TSIP 9 and different oleaginous yeasts (*Trichosporonoides spathulata* JU4-57, *Candida tropicalis* X37, *R. mucilaginosa* G43 and *Y. lipolytica* TISTR 5151) [129]. The highest lipid concentration and yield were obtained by combining *A. tubingensis* and *Y. lipolytica*, yielding 149.3 mg/g of palm empty fruit bunch.

Similarly, Doan et al. proposed the combination of the oleaginous fungus *Aspergillus oryzae* 32 and the oleaginous yeast *L. starkeyi* as a CBP system, reaching a lipid accumulation of 10.9 g/g of lime-pretreated rice straw (representing 8.5 g/100 g of raw rice straw) [130]. A single culture CBP strategy to produce microbial lipids from grasses has been investigated by Chuengcharoenphanich et al. using the cellulolytic oleaginous yeast *Cyberlindbera rhodanensis* CU_CV7 combined with an alkaline hydrogen peroxide pretreatment [131]. Using this strategy, the highest lipid titer and yield were 1.01 g/L and 50 mg/g, respectively, using Napier (Lampang ecotype) forage grass. Another interesting strategy combining SSF and CBP processes has been investigated by Zhao et al. These authors subjected a mixture of alkali-pretreated corn stover and cassava starch to fermentation with *L. starkeyi*, reporting a synergistic effect in lipid production using a lower enzyme dose, compared to using these substrates separately [132].

Future perspectives

In recent years, producing lipids from low-cost substrates such as lignocellulosic biomass and industrial wastes has been researched intensively, highlighting the importance of these conversion processes. Figure 2 identifies the main aspects of the lipid production processes and summarises the major challenges that must be investigated further. An essential aspect that requires further research before scaling up SCO production processes from lignocellulosic feedstocks and industrial wastes is the increase



Fig. 2 Important aspects requiring further investigation towards reaching cost-effective microbial oil production

in lipid yield and volumetric productivity values. The presence of biomass-derived inhibitory compounds in the corresponding hydrolysates is currently an important limiting factor that needs more attention. Developing new strains capable of degrading and/or tolerating these inhibitors at higher concentrations might pave the way towards cost-effectiveness. In addition to evolutionary engineering strategies, targeted metabolic engineering using system and synthetic biology approaches will contribute to obtaining new microbial strains with increased robustness against inhibitory compounds and higher productivity values. In addition, these engineering techniques may also contribute to the design of novel metabolic pathways to obtain valuable co-products, an unusual lipid composition with industrial applications and/or easy lipid recovery by secretion of these compounds. Novel genome editing tools recently developed, such as the CRISPR/Cas9, system, are helping to achieve this goal by introducing genetic changes in microbial strains whose genomes were previously difficult to edit.

Process optimisation is also an important element to consider during microbial oil production. In this sense, it is important to improve further the cultivation strategy by selecting the best bioreactor type (e.g., stirred tank, airlift/bubble columns), working with high cell densities, finding the appropriate substrate feeding system during the accumulation phase (e.g., pulse-feeding, two-batch and continuous feeding strategy), and evaluating effective co-cultivation methods allow increased total lipid production and maximising co-product recovery.

Optimisation of process parameters, including media composition, pH, temperature and aeration rate, is also crucial. The use of new technology using big data analytics and/or machine learning algorithms might contribute towards process optimisation. Finally, downstream processing also demands further research efforts in order to develop and implement novel methods for product recovery, including the use of solvent-free or green solvent methodologies to improve the sustainability of the overall process scheme. These downstream processing technologies must also be targeted at developing new processes allowing the continuous treatment of cell biomass and harvesting the product of interest.

Conclusions

Using low-cost substrates becomes essential in making SCO competitive from an economic perspective. In addition, the co-production of value-added compounds with biotechnological potential within an integrated biorefinery concept will significantly contribute to cost-competitiveness during microbial lipid production from biomass residues. Research efforts have helped to develop different process strategies to increase SCO production using native oleaginous yeast strains. Still, implementing microbial lipids production from large amounts of lignocellulosic materials and industrial wastes requires simplifying and integrating the different process steps to deploy their full potential.

Acknowledgements

Authors acknowledge MCIN/AEI/ (<https://doi.org/10.13039/501100011033>) for funding this work by PID2020-119403RB-C22 project. MGG also thanks MCIN/AEI/ (<https://doi.org/10.13039/501100011033>) and "ESF Investing in your future" for the PRE2018-086317 grant.

Authors' contributions

M.G.-G. Contributed to writing-original draft and literature review, Writing – review & editing. A.S. Contributed to Writing – review & editing and literature review. A.D.M. contributed to conceptualization, writing-original draft, Methodology and literature review; writing – review & editing. M.J.N. contributed to conceptualization, writing-original draft, Writing – review & editing, literature review and Funding acquisition. All authors read, reviewed and approved the final manuscript.

Funding

This research has been supported by the project BIOMIO + CAR; grant PID2020-119403RB-C2-2) funded by MCIN/AEI/ (<https://doi.org/10.13039/501100011033>).

The grant PRE2018-086317 funded by MCIN/AEI/ (<https://doi.org/10.13039/501100011033>) and by "ESF Investing in your future".

Data Availability

Not applicable.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest

Received: 6 October 2023 / Accepted: 17 November 2023

Published online: 05 December 2023

References

1. D'Amato D, Bartkowski B, Droste N. Reviewing the interface of bioeconomy and ecosystem service research. *Ambio*. 2020;49:1878–96.
2. IEA RIEA, Paris. Available from: <https://iea.blob.core.windows.net/assets/ada7af90-e280-46c4-a577-df2e4fb44254/Renewables2022.pdf> (accessed on 31 May 2023).
3. Dong T, Knoshaug EP, Pienkos PT, Laurens LML. Lipid recovery from wet oleaginous microbial biomass for biofuel production: a critical review. *Appl Energ*. 2016;177:879–95.
4. Abghari A, Chen S. *Yarrowia lipolytica* as an oleaginous cell factory platform for production of fatty acid-based biofuel and bioproducts. *Front Energy Res*. 2014;2.
5. Ma Y, Gao Z, Wang Q, Liu Y. Biodiesels from microbial oils: opportunity and challenges. *Bioresour Technol*. 2018;263:631–41.
6. Abeln F, Chuck CJ. The history, state of the art and future prospects for oleaginous yeast research. *Microb Cell Factories*. 2021;20:221.
7. Huang C, Chen XF, Xiong L, Chen XD, Ma LL, Chen Y. Single cell oil production from low-cost substrates: the possibility and potential of its Industrialization. *Biotechnol Adv*. 2013;31:129–39.
8. Tomás-Pejó E, Morales-Palomo S, González-Fernández C. Microbial lipids from organic wastes: Outlook and challenges. *Bioresour Technol*. 2021;323:124612.
9. Kumar LR, Yellapu SK, Yan S, Tyagi R, Drogui P. Elucidating the effect of impurities present in different crude glycerol sources on lipid and citric acid production by *Yarrowia lipolytica* SKY7. *J Chem Technol Biotechnol*. 2021;96:227–40.
10. Derguine-Mecheri L, Kebbouche-Gana S, Khemili-Talbi S, Djenane D. Screening and biosurfactant/bioemulsifier production from a high-salt-tolerant halophilic *Cryptococcus* strain YLF isolated from crude oil. *J Pet Sci Eng*. 2018;162:712–24.
11. Gonçalves C, Ferreira C, Gonçalves LG, Turner DL, Leandro MJ, Salema-Oom M, Santos H, Gonçalves P. A new pathway for mannitol metabolism in yeasts suggests a link to the evolution of alcoholic fermentation. *Front Microbiol*. 2019. 10.
12. Taskin M, Sisman T, Erdal S, Kurbanoglu EB. Use of waste chicken feathers as peptone for production of carotenoids in submerged culture of *Rhodotorula glutinis* MT-5. *Eur Food Res Technol*. 2011;233:657–65.
13. Karamerou EE, Webb C. Cultivation modes for microbial oil production using oleaginous yeasts – A review. *Biochem Eng J*. 2019;151:107322.
14. Ratledge C, Cohen Z. Microbial and algal oils: do they have a future for biodiesel or as commodity oils? *Lipid Technol*. 2008;20:155–60.
15. Soccol CR, Dalmas Neto CJ, Soccol VT, Sydney EB, da Costa ESF, Medeiros ABP, Vandenbergh LPdS: pilot scale biodiesel production from microbial oil of *Rhodospiridium toruloides* DEBB 5533 using sugarcane juice: performance in diesel engine and preliminary economic study. *Bioresour Technol*. 2017;223:259–68.
16. Wu S, Hu C, Jin G, Zhao X, Zhao ZK. Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresour Technol*. 2010;101:6124–9.
17. Wu S, Zhao X, Shen H, Wang Q, Zhao ZK. Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions. *Bioresour Technol*. 2011;102:1803–7.
18. Christophe G, Kumar V, Nouaille R, Gaudet G, Fontanille P, Pandey A, Soccol CR, Larroche C. Recent developments in microbial oils production: a possible alternative to vegetable oils for biodiesel without competition with human food?. *Braz Arch Biol Technol*. 2012, 55.
19. André A, Chatzifragkou A, Diamantopoulou P, Sarris D, Philippoussis A, Galiotou-Panayotou M, Komaitis M, Papanikolaou S. Biotechnological conversions of bio-diesel-derived crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* strains. *Eng Life Sci*. 2009;9:468–78.
20. Karamerou EE, Theodoropoulos C, Webb C. A biorefinery approach to microbial oil production from glycerol by *Rhodotorula glutinis*. *Biomass Bioenerg*. 2016;89:113–22.
21. Nambou K, Zhao C, Wei L, Chen J, Imanaka T, Hua Q. Designing of a cheap to run fermentation platform for an enhanced production of single cell oil from *Yarrowia lipolytica* DSM3286 as a potential feedstock for biodiesel. *Bioresour Technol*. 2014;173:324–33.
22. Bellou S, Triantaphyllidou IE, Mizerakis P, Aggelis G. High lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica* cultivated under double limitation of nitrogen and magnesium. *J Biotechnol*. 2016;234:116–26.
23. Daskalaki A, Perdikouli N, Aggeli D, Aggelis G. Laboratory evolution strategies for improving lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019;103:8585–96.
24. Dourou M, Mizerakis P, Papanikolaou S, Aggelis G. Storage lipid and polysaccharide metabolism in *Yarrowia lipolytica* and *Umbelopsis isabellina*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017;101:7213–26.
25. Diamantopoulou P, Sarris D, Tchakouteu SS, Xenopoulos E, Papanikolaou S. Growth response of non-conventional yeasts on Sugar-Rich Media: part 1: high production of lipid by *Lipomyces starkeyi* and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. *Microorganisms*. 2023;11.
26. Filippousi R, Diamantopoulou P, Stavropoulou M, Makris DP, Papanikolaou S. Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* from biodiesel-derived glycerol in shake flasks and bioreactor: impact of initial C/N molar ratio and added onion-peel extract. *Process Biochem*. 2022;123:52–62.
27. Tchakouteu SS, Chatzifragkou A, Kalantzi O, Koutinas AA, Aggelis G, Papanikolaou S. Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* exhibits interplay between biosynthesis of intracellular sugars and lipids. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2015;117:657–72.
28. Alonso S, Rendueles M, Díaz M. Feeding strategies for enhanced lactobionic acid production from whey by *Pseudomonas taetrolens*. *Bioresour Technol*. 2013;134:134–42.
29. Rakicka M, Lazar Z, Dulerio T, Fickers P, Nicaud JM. Lipid production by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* using industrial by-products under different culture conditions. *Biotechnol Biofuels*. 2015;8:104.
30. Anschau A, Xavier MCA, Hernalsteens S, Franco TT. Effect of feeding strategies on lipid production by *Lipomyces starkeyi*. *Bioresour Technol*. 2014;157:214–22.
31. Ayadi I, Kamoun O, Trigui-Lahiani H, Hdiji A, Gargouri A, Belghith H, Guerfali M. Single cell oil production from a newly isolated *Candida viswanathii* Y-E4 and agro-industrial by-products valorization. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2016;43:901–14.

32. Raimondi S, Rossi M, Leonardi A, Bianchi MM, Rinaldi T, Amaretti A. Getting lipids from glycerol: new perspectives on biotechnological exploitation of *Candida freyschussii*. *Microb Cell Factories*. 2014;13:83.
33. Maina S, Pateraki C, Kopsahelis N, Paramithiotis S, Drosinos EH, Papanikolaou S, Koutinas A. Microbial oil production from various carbon sources by newly isolated oleaginous yeasts. *Eng Life Sci*. 2017;17:333–44.
34. Thiru M, Sankh S, Rangaswamy V. Process for biodiesel production from *Cryptococcus curvatus*. *Bioresour Technol*. 2011;102:10436–40.
35. Tsouko E, Papanikolaou S, Koutinas AA. 8 - Production of fuels from microbial oil using oleaginous microorganisms. In *Handbook of Biofuels Production (Second Edition)* Edited by Luque R, Lin CSK, Wilson K, Clark J: Woodhead Publishing; 2016: 201–236.
36. Tsakona S, Kopsahelis N, Chatzifragkou A, Papanikolaou S, Kookos IK, Koutinas AA. Formulation of fermentation media from flour-rich waste streams for microbial lipid production by *Lipomyces starkeyi*. *J Biotechnol*. 2014;189:36–45.
37. Meesters PAEP, Huijberts GNM, Eggink G. High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1996;45:575–9.
38. Uçkun Kiran E, Trzcinski A, Webb C. Microbial oil produced from biodiesel by-products could enhance overall production. *Bioresour Technol*. 2013;129:650–4.
39. Zhao X, Hu C, Wu S, Shen H, Zhao ZK. Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y4 using different substrate feeding strategies. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2011;38:627–32.
40. Capusoni C, Rodighiero V, Cucchetti D, Galafassi S, Bianchi D, Franzosi G, et al. Characterization of lipid accumulation and lipidome analysis in the oleaginous yeasts *Rhodospiridium azoricum* and *Trichosporon oleaginosus*. *Bioresour Technol*. 2017;238:281–9.
41. Yen H-W, Liu YX, Chang J-S. The effects of feeding criteria on the growth of oleaginous yeast—*Rhodotorula glutinis* in a pilot-scale airlift bioreactor. *J Taiwan Inst Chem*. 2015;49:67–71.
42. Papanikolaou S, Aggelis G. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresour Technol*. 2002;82:43–9.
43. Shen H, Gong Z, Yang X, Jin G, Bai F, Zhao ZK. Kinetics of continuous cultivation of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *J Biotechnol*. 2013;168:85–9.
44. Gong Z, Shen H, Zhou W, Wang Y, Yang X, Zhao ZK. Efficient conversion of acetate into lipids by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Biotechnol Biofuels*. 2015;8:189.
45. Karamerou EE, Theodoropoulos C, Webb C. Evaluating feeding strategies for microbial oil production from glycerol by *Rhodotorula glutinis*. *Eng Life Sci*. 2017;17:314–24.
46. Tang M, Zhou W, Liu Y, Yan J, Gong Z. A two-stage process facilitating microbial lipid production from N-acetylglucosamine by *Cryptococcus curvatus* cultured under non-sterile conditions. *Bioresour Technol*. 2018;258:255–62.
47. Koutinas AA, Chatzifragkou A, Kopsahelis N, Papanikolaou S, Kookos IK. Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production. *Fuel*. 2014;116:566–77.
48. Gallego-García M, Susmozas A, Moreno AD, Negro MJ. Evaluation and identification of key economic bottlenecks for cost-effective microbial oil production from fruit and vegetable residues. *Fermentation*. 2022;8:334.
49. Papanikolaou S, Aggelis G. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2011;113:1031–51.
50. Tzamorotas D, Afseth NK, Lindberg D, Kjørlaus O, Axelsson L, Shapaval V. Pretreatment of different food rest materials for bioconversion into fungal lipid-rich biomass. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2018;41:1039–49.
51. Valdés G, Mendonça RT, Aggelis G. Lignocellulosic biomass as a substrate for oleaginous microorganisms: a review. *Appl Sci*. 2020;10:7698.
52. Bonturi N, Crucello A, Viana AJC, Miranda EA. Microbial oil production in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate without nutrient supplementation by a *Rhodospiridium toruloides* adapted strain. *Process Biochem*. 2017;57:16–25.
53. Carvalho AK, Rivaldi JD, Barbosa JC, de Castro HF. Biosynthesis, characterization and enzymatic transesterification of single cell oil of *Mucor circinelloides*—a sustainable pathway for biofuel production. *Bioresour Technol*. 2015;181:47–53.
54. Dias C, Reis A, Santos JAL, Lopes da Silva T. Concomitant wastewater treatment with lipid and carotenoid production by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* grown on brewery effluent enriched with sugarcane molasses and urea. *Process Biochem*. 2020;94:1–14.
55. Braz CA, Carvalho AKF, Bento HBS, Reis CER, De Castro HF. Production of value-added microbial metabolites: oleaginous fungus as a tool for valorization of dairy by-products. *Bioenergy Res*. 2020;13:963–73.
56. Carota E, Crognale S, D'Annibale A, Petruccioli M. Bioconversion of agro-industrial waste into microbial oils by filamentous fungi. *Process Saf Environ Prot*. 2018;117:143–51.
57. Kamat S, Khot M, Zinjarde S, Ravikumar A, Gade WN. Coupled production of single cell oil as biodiesel feedstock, xylitol and xylanase from sugarcane bagasse in a biorefinery concept using fungi from the tropical mangrove wetlands. *Bioresour Technol*. 2013;135:246–53.
58. Yu Y, Xu Z, Chen S, Jin M. Microbial lipid production from dilute acid and dilute alkali pretreated corn stover via *Trichosporon dermatis*. *Biores Technol*. 2020;295:122253.
59. Poontawee R, Yongmanitchai W, Limtong S. Lipid production from a mixture of sugarcane top hydrolysate and biodiesel-derived crude glycerol by the oleaginous red yeast, *Rhodospiridiobolus fluvialis*. *Process Biochem*. 2018;66:150–61.
60. Papanikolaou S, Aggelis G. Lipids of oleaginous yeasts. Part II: technology and potential applications. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2011;113:1052–73.
61. Sun H, Gao Z, Zhang L, Wang X, Gao M, Wang Q. A comprehensive review on microbial lipid production from wastes: research updates and tendencies. *Environ Sci Pollut Res*. 2023;30:79654–75.
62. Huang C, Luo M-T, Chen X-F, Qi G-X, Xiong L, Lin X-Q, et al. Combined *de novo* and *ex novo* lipid fermentation in a mix-medium of corn cob acid hydrolysate and soybean oil by *Trichosporon dermatis*. *Biotechnol Biofuels*. 2017;10:147.
63. Tang S, Dong Q, Fang Z, Cong W-j, Zhang H. Microbial lipid production from rice straw hydrolysates and recycled pretreated glycerol. *Bioresour Technol*. 2020;312:123580.
64. Annamalai N, Sivakumar N, Oleskowicz-Popiel P. Enhanced production of microbial lipids from waste office paper by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Fuel*. 2018;217:420–6.
65. Yadav AK, Kuila A, Garlapati VK. Biodiesel production from *Brassica juncea* using oleaginous yeast. *Appl Biochem Biotechnol*. 2022;194:4066–80.
66. Gong Z, Wang X, Yuan W, Wang Y, Zhou W, Wang G, Liu Y. Fed-batch enzymatic hydrolysis of alkaline organosolv-pretreated corn stover facilitating high concentrations and yields of fermentable sugars for microbial lipid production. *Biotechnol Biofuels*. 2020;13:13.
67. Xavier MCA, Coradini ALV, Deckmann AC, Franco TT. Lipid production from hemicellulose hydrolysate and acetic acid by *Lipomyces starkeyi* and the ability of yeast to metabolize inhibitors. *Biochem Eng J*. 2017;118:11–9.
68. da Cunha Abreu Xavier M, Teixeira Franco T. Obtaining hemicellulosic hydrolysate from sugarcane bagasse for microbial oil production by *Lipomyces starkeyi*. *Biotechnol Lett*. 2021;43:967–79.
69. Thanapimmetha A, Peawsuphon N, Chisti Y, Saisriyoot M, Srinophakun P. Lipid production by the yeast *Lipomyces Starkeyi* grown on sugars and oil palm empty fruit bunch hydrolysate. *Biomass Conv Biofer*. 2021;11:1197–210.
70. Calvey CH, Su Y-K, Willis LB, McGee M, Jeffries TW. Nitrogen limitation, oxygen limitation, and lipid accumulation in *Lipomyces starkeyi*. *Bioresour Technol*. 2016;200:780–8.
71. Abeln F, Hicks RH, Auta H, Moreno-Beltrán M, Longanesi L, Henk DA, Chuck CJ. Semi-continuous pilot-scale microbial oil production with *Metschnikowia pulcherrima* on starch hydrolysate. *Biotechnol Biofuels*. 2020;13:127.
72. Brandenburg J, Blomqvist J, Shapaval V, Kohler A, Sampels S, Sandgren M, Passoth V. Oleaginous yeasts respond differently to carbon sources present in lignocellulose hydrolysate. *Biotechnol Biofuels*. 2021;14:124.
73. Poontawee R, Limtong S. Feeding strategies of two-stage fed-batch cultivation processes for microbial lipid production from sugarcane top hydrolysate and crude glycerol by the oleaginous red yeast *Rhodospiridiobolus fluvialis*. *Microorganisms*. 2020;8:151.
74. Liu Y, Wang Y, Liu H, Zhang J. Enhanced lipid production with undetoxified corn cob hydrolysate by *Rhodotorula glutinis* using a high cell density culture strategy. *Bioresour Technol*. 2015;180:32–9.
75. Liu L, Chen J, Lim PE, Wei D. Enhanced single cell oil production by mixed culture of *Chlorella pyrenoidosa* and *Rhodotorula glutinis* using cassava bagasse hydrolysate as carbon source. *Bioresour Technol*. 2018;255:140–8.
76. Miao Z, Tian X, Liang W, He Y, Wang G. Bioconversion of corn cob hydrolysate into microbial lipid by an oleaginous yeast *Rhodotorula taiwanensis* AM2352 for biodiesel production. *Renew Energy*. 2020;161:91–7.
77. Saini R, Hegde K, Osorio-Gonzalez CS, Brar SK, Vezina P. Evaluating the potential of *Rhodospiridium toruloides* 1588 for high lipid production

- using undetoxified wood hydrolysate as a carbon source. *Energies*. 2020;13:5960.
78. Dai X, Shen H, Li Q, Rasool K, Wang Q, Yu X, et al. Microbial lipid production from corn stover by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* using the PreSSLP process. *Energies*. 2019;12:1053.
79. Chmielarz M, Blomqvist J, Sampels S, Sandgren M, Passoth V. Microbial lipid production from crude glycerol and hemicellulosic hydrolysate with oleaginous yeasts. *Biotechnol Biofuels*. 2021;14:65.
80. Nagaraj YN, Burkina V, Okmane L, Blomqvist J, Rapoport A, Sandgren M, Pickova J, Sampels S, Passoth V. Identification, quantification and kinetic study of carotenoids and lipids in *Rhodotorula toruloides* CBS 14 cultivated on wheat straw hydrolysate. *Fermentation*. 2022;8:300.
81. Fei Q, O'Brien M, Nelson R, Chen X, Lowell A, Dowe N. Enhanced lipid production by *Rhodospiridium toruloides* using different fed-batch feeding strategies with lignocellulosic hydrolysate as the sole carbon source. *Biotechnol Biofuels*. 2016;9:130.
82. Lopes HJS, Bonturi N, Miranda EA. *Rhodotorula toruloides* single cell oil production using *Eucalyptus Urograndis* hemicellulose hydrolysate as a carbon source. *Energies*. 2020;13:795.
83. Yu Y, Xu Z, Chen S, Jin M. Microbial lipid production from dilute acid and dilute alkali pretreated corn stover via *Trichosporon dermatis*. *Bioresour Technol*. 2020;295:122253.
84. Lee J, Vadlani P, Min D. Sustainable production of microbial lipids from lignocellulosic biomass using oleaginous yeast cultures. *J Sustain Bioenergy Syst* 2017, 7.
85. Kommoji S, Gopinath M, Satya Sagar P, Yuvaraj D, Iyyappan J, Jaya Varsha A, et al. Lipid bioproduction from delignified native grass (*Cyperus distans*) hydrolysate by *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour Technol*. 2021;324:124659.
86. Gallego-García M, Moreno AD, González A, Negro MJ. Efficient use of discarded vegetal residues as cost-effective feedstocks for microbial oil production. *Biotechnol Biofuels* Bioprod. 2023;16:21.
87. Moreno AD, Duque A, González A, Ballesteros I, Negro MJ. Valorization of greenhouse horticulture waste from a biorefinery perspective. *Foods* 2021, 10.
88. Duque A, Álvarez C, Doménech P, Manzanera P, Moreno AD. Advanced bioethanol production: from novel raw materials to integrated biorefineries. *Processes*. 2021;9:206.
89. Moreno AD, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro MJ. Chap. 16 - Pretreatment technologies for lignocellulosic biomass deconstruction within a biorefinery Perspective. In *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels (Second Edition)* Edited by Pandey A, Larroche C, Dussap C-G, Gnansounou E, Khanal SK, Ricke S: Academic Press; 2019: 379–399.
90. Zhai R, Hu J, Jin M. Towards efficient enzymatic saccharification of pretreated lignocellulose: enzyme inhibition by lignin-derived phenolics and recent trends in mitigation strategies. *Biotechnol Adv*. 2022;61:108044.
91. Liu X, Radi M, Mohamed ET, Feist AM, Dragone G, Mussatto SI. Adaptive laboratory evolution of *Rhodospiridium toruloides* to inhibitors derived from lignocellulosic biomass and genetic variations behind evolution. *Bioresour Technol*. 2021;333:125171.
92. Nair AS, Al-Bahry S, Gathergood N, Tripathi BN, Sivakumar N. Production of microbial lipids from optimized waste office paper hydrolysate, lipid profiling and prediction of biodiesel properties. *Renew Energy*. 2020;148:124–34.
93. Park GW, Chang HN, Jung K, Seo C, Kim Y-C, Choi JH, Woo HC. Hwang I-j: production of microbial lipid by *Cryptococcus Curvatus* on rice straw hydrolysates. *Process Biochem*. 2017;56:147–53.
94. Poontawee R, Yongmanitchai W, Limtong S. Efficient oleaginous yeasts for lipid production from lignocellulosic sugars and effects of lignocellulose degradation compounds on growth and lipid production. *Process Biochem*. 2017;53:44–60.
95. Saini R, Osorio-Gonzalez CS, Hegde K, Kaur Brar S, Vezina P. A co-fermentation strategy with wood hydrolysate and crude glycerol to enhance the lipid accumulation in *Rhodospiridium toruloides* 1588. *Bioresour Technol*. 2022;364:127821.
96. Yang X, Jin G, Gong Z, Shen H, Bai F, Zhao ZK. Recycling microbial lipid production wastes to cultivate oleaginous yeasts. *Biores Technol*. 2015;175:91–6.
97. Huang C, Guo HJ, Xiong L, Wang B, Shi SL, Chen XF, Lin XQ, Wang C, Luo J, Chen XD. Using wastewater after lipid fermentation as substrate for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Carbohydr Polym*. 2016;136:198–202.
98. Diamantopoulou P, Stoforos NG, Xenopoulos E, Sarris D, Psarianos D, Philippoussis A, et al. Lipid production by *Cryptococcus curvatus* growing on commercial xylose and subsequent valorization of fermentation waste-waters for the production of edible and medicinal mushrooms. *Biochem Eng J*. 2020;162:107706.
99. Dias C, Reis A, Santos JAL, Gouveia L, Lopes da Silva T. Primary brewery wastewater as feedstock for the yeast *Rhodospiridium toruloides* and the microalga *Tetrademus obliquus* mixed cultures with lipid production. *Process Biochem*. 2022;113:71–86.
100. Zuccaro G, del Mondo A, Pinto G, Pollio A, De Natale A. Biorefinery-based approach to exploit mixed cultures of lipomyces starkeyi and *Chloridium saccharophilum* for single cell oil production. *Energies*. 2021;14:1340.
101. Liu X, Lv J, Zhang T, Deng Y. Citric acid production from hydrolysate of pretreated straw cellulose by *Yarrowia lipolytica* SWJ-1b using batch and fed-batch cultivation. *Prep Biochem Biotechnol*. 2015;45:825–35.
102. Banerjee A, Sharma T, Nautiyal AK, Dasgupta D, Hazra S, Bhaskar T, Ghosh D. Scale-up strategy for yeast single cell oil production for *Rhodotorula mucilagenosa* IIP132 from corn cob derived pentosan. *Bioresour Technol*. 2020;309:123329.
103. Li Z, Li C, Cheng P, Yu G. *Rhodotorula mucilagenosa*-alternative sources of natural carotenoids, lipids, and enzymes for industrial use. *Heliyon*. 2022;8:e11505.
104. da Silva J, Honorato da Silva FL, Santos Ribeiro JE, Nóbrega de Melo DJ, Santos FA, Lucena de Medeiros L. Effect of supplementation, temperature and pH on carotenoids and lipids production by *Rhodotorula mucilagenosa* on sisal bagasse hydrolysate. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2020;30:101847.
105. Lee KE, Kwon M, Kim YS, Kim Y, Chung MG, Heo SC, Kim Y. β -carotene regulates cancer stemness in colon cancer *in vivo* and *in vitro*. *Nutr Res Pract*. 2022;16:161–72.
106. Tang W, Wang Y, Zhang J, Cai Y, He Z. Biosynthetic pathway of carotenoids in *Rhodotorula* and strategies for enhanced their production. *J Microbiol Biotechnol*. 2019;29:507–17.
107. <https://www.gminsights.com/industry-analysis/beta-carotene-market>.
108. Singh RV, Sambyal K. An overview of β -carotene production: current status and future prospects. *Food Biosci*. 2022;47:101717.
109. Ayadi I, Belghith H, Gargouri A, Guerfali M. utilization of wheat bran acid hydrolysate by *Rhodotorula mucilagenosa* Y-MG1 for microbial lipid production as feedstock for biodiesel synthesis. *Biomed Res Int* 2019, 2019:3213521.
110. Bertacchi S, Bettiga M, Porro D, Branduardi P. *Camelina sativa* meal hydrolysate as sustainable biomass for the production of carotenoids by *Rhodospiridium toruloides*. *Biotechnol Biofuels*. 2020;13:47.
111. Chen Z, Reznicek WD, Wan C. Deep eutectic solvent pretreatment enabling full utilization of switchgrass. *Bioresour Technol*. 2018;263:40–8.
112. Hassanpour M, Abbasabadi M, Strong J, Gebbie L, Te'o VSJ, O'Hara IM, Zhang Z. Scale-up of two-step acid-catalysed glycerol pretreatment for production of oleaginous yeast biomass from sugarcane bagasse by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresour Technol*. 2020;313:123666.
113. Deeba F, Kiran Kumar K, Ali Wani S, Kumar Singh A, Sharma J, Gaur NA. Enhanced biodiesel and β -carotene production in *Rhodotorula pacifica* INDKK using sugarcane bagasse and molasses by an integrated biorefinery framework. *Bioresour Technol*. 2022;351:127067.
114. Kot AM, Błażej S, Gientka I, Kieliszek M, Bryś J. Torulene and Torularhodin: new fungal carotenoids for industry? *Microb Cell Factories*. 2018;17:49.
115. Tchakouteu SS, Kopsahelis N, Chatzifragkou A, Kalantzi O, Stoforos NG, Koutinas AA, Aggelis G, Papanikolaou S. *Rhodospiridium toruloides* cultivated in NaCl-enriched glucose-based media: adaptation dynamics and lipid production. *Eng Life Sci*. 2017;17:237–48.
116. Chen Z, Wan C. Non-sterile fermentations for the economical biochemical conversion of renewable feedstocks. *Biotechnol Lett*. 2017;39:1765–77.
117. Singh G, Jawed A, Paul D, Bandyopadhyay KK, Kumari A, Haque S. Concomitant production of lipids and carotenoids in *Rhodospiridium toruloides* under osmotic stress using response surface methodology. *Front Microbiol* 2016, 7.
118. Park Y-K, Nicaud J-M, Ledesma-Amaro R. The engineering potential of *Rhodospiridium toruloides* as a workhorse for biotechnological applications. *Trends in Biotechnol*. 2018;36:304–17.
119. Singh G, Sinha S, Bandyopadhyay KK, Lawrence M, Paul D. Triaxial growth of an oleaginous red yeast *Rhodospiridium toruloides* on waste 'extract' for enhanced and concomitant lipid and β -carotene production. *Microb Cell Factories*. 2018;17:182.
120. Bertacchi S, Cantù C, Porro D, Branduardi P. Optimization of carotenoids production from *Camelina sativa* meal hydrolysate by *Rhodospiridium toruloides*. *Fermentation*. 2021;7:208.
121. Pi HW, Anandharaj M, Kao YY, Lin YJ, Chang JJ, Li WH. Engineering the oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for simultaneous β -carotene and cellulase production. *Sci Rep*. 2018;8:10850.

122. Cai D, Dong Z, Wang Y, Chen C, Li P, Qin P, Wang Z, Tan T. Biorefinery of corn cob for microbial lipid and bio-ethanol production: an environmental friendly process. *Bioresour Technol.* 2016;211:677–84.
123. Brandenburg J, Poppele I, Blomqvist J, Puke M, Pickova J, Sandgren M, Rapoport A, Vedernikovs N, Passoth V. Bioethanol and lipid production from the enzymatic hydrolysate of wheat straw after furfural extraction. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018;102:6269–77.
124. Brandenburg J, Blomqvist J, Pickova J, Bonturi N, Sandgren M, Passoth V. Lipid production from hemicellulose with *Lipomyces starkeyi* in a pH regulated fed-batch cultivation. *Yeast.* 2016;33:451–62.
125. Santos DK, Rufino RD, Luna JM, Santos VA, Sarubbo LA. Biosurfactants: multi-functional biomolecules of the 21st century. *Int J Mol Sci.* 2016;17:401.
126. Marcelino PRF, Peres GFD, Terán-Hílares R, Pagnocca FC, Rosa CA, Lacerda TM, dos Santos JC, da Silva SS. Biosurfactants production by yeasts using sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate as new sustainable alternative for lignocellulosic biorefineries. *Ind Crops Prod.* 2019;129:212–23.
127. dos Remedios Araújo Vieira, Neta M, Azevedo MA, Camargo FP, Delforno TP, Bona E, Vicente JGP, Duarte ICS. Potential of acid-hydrolysed brewer's spent grain as substrate for biosurfactant production by *Rhodotorula mucilaginosa* LBP5 oleaginous yeast. *Biomass Conv Bioref* 2023.
128. Singhania RR, Patel AK, Singh A, Haldar D, Soam S, Chen CW, Tsai ML, Dong CD. Consolidated bioprocessing of lignocellulosic biomass: Technological advances and challenges. *Bioresour Technol.* 2022;354:127153.
129. Intasit R, Cheirsilp B, Louhasakul Y, Boonsawang P. Consolidated bioprocesses for efficient bioconversion of palm biomass wastes into biodiesel feedstocks by oleaginous fungi and yeasts. *Bioresour Technol.* 2020;315:123893.
130. Doan HT, Nguyen PTM, Tran TT, Nguyen TK, Tran MD, Nguyen DB. Optimizing lime pretreatment of rice straw for biolipid production using oleaginous microorganisms. *Chemosphere.* 2021;269:129390.
131. Chuengcharoenphanich N, Watsuntorn W, Qi W, Wang Z, Hu Y, Chulalak-sananukul W. The potential of biodiesel production from grasses in Thailand through consolidated bioprocessing using a cellulolytic oleaginous yeast, *Cyberlindnera rhodanensis* CU-CV7. *Energy.* 2023;263:125759.
132. Zhao M, Zhou W, Wang Y, Wang J, Zhang J, Gong Z. Combination of simultaneous saccharification and fermentation of corn stover with consolidated bioprocessing of cassava starch enhances lipid production by the amylolytic oleaginous yeast *Lipomyces Starkeyi*. *Bioresour Technol.* 2022;364:128096.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

