



Artículo / Article

Obtención de azúcares fermentables desde residuos de cartón para cultivar levaduras de interés biotecnológico

Procurement of fermentable sugars from cardboard waste for the cultivation of yeasts for biotechnological use

Yolanda González García¹, Juan Carlos Meza Contreras¹, José Anzaldo Hernández¹ y Rubén Sanjuán Dueñas¹

Resumen

Se estudió el efecto de diferentes condiciones de hidrólisis ácida (tipo y concentración de ácido, relación sólido: líquido, temperatura) sobre la obtención de azúcares fermentables a partir de residuos de cartón. El hidrolizado resultante se describió en términos de la concentración y tipo de azúcares así como del contenido de compuestos fenólicos. Después dicho hidrolizado se evaluó como fuente de carbono para el crecimiento de las levaduras oleaginosas de *Rhodotorula glutinis* y *Cryptococcus curvatus*, que fue previamente destoxificado con carbón activado, con el fin de disminuir la concentración de compuestos inhibidores del crecimiento microbiano, tales como derivados fenólicos generados durante el proceso de hidrólisis ácida. Se obtuvo un hidrolizado con una concentración máxima de azúcares fermentables de 20.9 g L⁻¹ bajo las siguientes condiciones: catalizador, ácido sulfúrico al 10 %, temperatura, 125 °C, relación sólido: líquido, 60 g L⁻¹. La glucosa resultó ser el principal carbohidrato presente y se detectó una pequeña proporción de oligosacáridos. Se encontraron 328.7 mg L⁻¹ de compuestos fenólicos totales como subproductos de la hidrólisis del cartón. Respecto al crecimiento microbiano, los resultados sugieren que *R. glutinis* es tolerante al hidrolizado sin destoxificar, alcanzando hasta 8.1 g L⁻¹ de biomasa, mientras que *C. curvatus* no fue capaz de desarrollarse en este, a pesar de haberse destoxificado con diferentes concentraciones de carbón activado. Se concluye que los residuos de cartón son una fuente importante de azúcares para ser utilizados en procesos de fermentación.

Palabras clave: Azúcares fermentables, cartón, compuestos fenólicos, *Cryptococcus curvatus* (Diddens & Lodder) Golubev, 1981, levaduras oleaginosas, *Rhodotorula glutinis* (Fresen.) F. C. Harrison (1928).

Abstract

The effect of different acid hydrolysis conditions (acid concentration, solid:liquid ratio and temperature) on the production of fermentable sugars from cardboard waste was studied. The hydrolysate so obtained was characterized with regard to the sugar concentration and specific monosaccharides composition as well as to the phenolic compounds content. Next its use as carbon source for the growth of the yeasts *Rhodotorula glutinis* and *Cryptococcus curvatus* was evaluated. The hydrolysate was previously detoxified with activated charcoal in order to decrease the concentration of growth-inhibitory compounds, such as phenolics produced during the acid hydrolysis process. An hydrolysate with a maximum fermentable sugars concentration of 20.9 g L⁻¹ was obtained under the following conditions: catalyst, sulfuric acid 10 %, temperature, 125 °C, solid:liquid ratio, 60 g L⁻¹. The main carbohydrate present in the hydrolysate was glucose. Concerning to the hydrolysis byproducts it was found 328.7 mg L⁻¹ of phenolic compounds. About the microbial growth, the results suggest that *R. glutinis* is able to tolerate the inhibitory compounds present in the hydrolysate producing up to 8.1 g L⁻¹ of biomass, while *C. curvatus* was unable to growth on this carbon source. It is concluded that the findings of the present study demonstrated that the cardboard waste is a potential source of fermentable sugars to be used in biotechnology processes for obtaining microbial metabolites of commercial interest.

Key words: Fermentable sugars, cardboard, phenolic compounds, *Cryptococcus curvatus* (Diddens & Lodder) Golubev, 1981, oleaginous yeasts, *Rhodotorula glutinis* (Fresen.) F. C. Harrison (1928).

Introducción

En la actualidad, existe gran interés por el uso de biomasa lignocelulósica como productora de azúcares fermentables para obtener compuestos de importancia comercial tales como bioetanol, ácido láctico, xilitol y proteína unicelular (Kuloyo *et al.*, 2014; Guerfali *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014).

Una de las principales fuentes de material celulósico residual es sin duda la industria de la madera, celulosa y papel, que genera una gran cantidad de productos y subproductos ricos en carbohidratos. Entre estos destacan los lodos de papel y los residuos de cartón que representan 13.8 % de los residuos sólidos municipales de México (Semarnat, 2012); dichos materiales contienen de 20 a 75 % de celulosa y hemicelulosa en base seca, aunque también incluyen lignina, recubrimientos y aditivos. Su alto contenido de hidratos de carbono los convierte en fuente de azúcares para el cultivo de diferentes microorganismos (Ming-Jun *et al.*, 2011).

Al comparar con otros efectos lignocelulósicos (MLig) como el olote de maíz, la paja de trigo, de arroz, y los bagazos, los residuos de papel y cartón son más susceptibles a los tratamientos de hidrólisis debido a que ya han sido expuestos a un extenso procesamiento mecánico y químico durante el pulpeo (Marques *et al.*, 2008). La hidrólisis y fermentación de estos residuos para obtener etanol han sido previamente estudiados (Fan y Lynd, 2007; Marques *et al.*, 2008), sin embargo, no existen trabajos documentados sobre su uso para el cultivo de levaduras oleaginosas como *Rhodotorula glutinis* (Fresen.) F. C. Harrison (1928) y *Cryptococcus curvatus* (Diddens & Lodder) Golubev, 1981 que son capaces de acumular aceite como materia prima para producir biodiesel. Una opción viable para la producción biotecnológica de lípidos es el cultivo de estas levaduras con residuos de bajo costo (Gao *et al.*, 2014), como los materiales mencionados previamente. En este sentido, la principal limitante para aprovechar la biomasa celulósica como fuente de carbohidratos para fermentaciones es la disponibilidad de los azúcares simples, como glucosa y xilosa, ya que estos forman parte de los polímeros de celulosa y hemicelulosa.

Por lo anterior es necesario llevar a cabo un proceso de hidrólisis para la obtención de los azúcares asimilables por los microorganismos. Los procesos más documentados son el biológico (por medio de microorganismos o enzimas) y el químico (mediante el uso de ácidos o álcalis). La hidrólisis ácida es el método más empleado y se ha implementado a escala comercial desde 1909 en Estados Unidos de América y algunos países de Europa y Asia para generar azúcares fermentables y utilizar madera como sustrato para la producción de bioetanol (Tsao *et al.*, 1978). Incluso, a partir de hidrolizados ácidos de residuos agroindustriales se han desarrollado también fermentaciones para obtener proteína unicelular y otros compuestos químicos (Ferrer *et al.*, 2002).

Introduction

At present, there is great interest for the use of lignocellulosic biomass as a producer of fermentable sugars to obtain compounds of commercial value such as bioethanol, lactic acid, xylitol and unicellular protein (Kuloyo *et al.*, 2014; Guerfali *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014).

One of the major sources of residual cellulosic material is, undoubtedly, the wood, cellulose and paper industry, which generates a great amount of products and sub-products rich in carbohydrates. Among them, the paper muds and the cardboard wastes are outstanding, as they make up 13.8 % of the municipal solid residues produced in Mexico (Semarnat, 2012); such materials have between 20 and 75 % of cellulose and hemicellulose in dry base, even when they include, as well, lignin, coverings and additives. Its high content of carbon hydrates makes them a sugar source for the cultivation of different microorganisms (Ming-Jun *et al.*, 2011).

When comparing other lignocellulosic options (MLig) such as corncob, wheat straw, rice straw and chaff, paper and cardboard wastes are more prone to the hydrolysis treatments, since they have already been exposed to a great mechanical and chemical processing during pulping (Marques *et al.*, 2008). Hydrolysis and fermentation of these wastes to get ethanol have been previously studied (Fan y Lynd, 2007; Marques *et al.*, 2008), however, there are not documented works about their use for the cultivation of oil yeasts such as *Rhodotorula glutinis* (Fresen.) F. C. Harrison (1928) and *Cryptococcus curvatus* (Diddens & Lodder) Golubev, 1981 which are able to store oil as raw material for biodiesel production. One viable option for the biotechnological production of lipids is the cultivation of these yeasts with low cost wastes (Gao *et al.*, 2014), with the aforementioned materials. In the actual study the main limitation to use cellulosic biomass as a carbohydrate source for fermentations is the availability of simple sugars, such as glucose and xylose, since they are part of the polymers of cellulose and hemicellulose.

Based on the previous arguments, it is necessary to carry out a hydrolysis process to obtain these assimilable sugars by microorganisms. The most documented of them are the biological kind (by using microorganisms and enzymes) and the chemical (by using acids or alkali). The acid hydrolysis is the mostly used method and it has been applied at a commercial scale since 1909 at the United States of America, some European and Asian countries, to produce fermentable sugars and take wood as the substrate for the fabrication of bioethanol (Tsao *et al.*, 1978). From hydrolyzed acids coming from agribusiness wastes, fermentations have been produced to obtain unicellular protein and several chemical compounds (Ferrer *et al.*, 2002).



Algunos de los parámetros más estudiados en este proceso han sido la temperatura y el tipo de ácido entre los que destacan el clorhídrico y el sulfúrico, de los cuales el último ofrece mayores ventajas (Pedersen *et al.*, 2010). Sin embargo, los hidrolizados obtenidos por el proceso ácido contienen inhibidores del crecimiento microbiano como el ácido acético, el ácido fórmico, el furfural (Chandel *et al.*, 2013) y compuestos fenólicos que se derivan de la compleja estructura de la lignina (Binder y Raines, 2010), por lo que es importante evaluar el efecto de los mismos sobre el proceso de fermentación.

En este trabajo se estudió la obtención y caracterización química de un hidrolizado ácido de residuos de cartón bajo diferentes condiciones de reacción, su tratamiento con carbón activado para eliminar compuestos inhibidores del crecimiento microbiano y su uso posterior como fuente de carbono para el cultivo de levaduras oleaginosas.

Materiales y Métodos

Residuos de cartón

Se trabajó con residuos de cartón corrugado (malla 40). Se tomaron muestras de cinco lotes diferentes y se describieron de acuerdo a las normas TAPPI (TAPPI, 2007), de acuerdo a los siguientes criterios: humedad, extraíbles totales, celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas.

Hidrólisis ácida del cartón

Se ensayaron el ácido clorhídrico (HCl) y el ácido sulfúrico (H₂SO₄) para la hidrólisis de los residuos de cartón. Se analizó el efecto de su concentración, la temperatura y la relación sólido:líquido sobre la eficiencia de hidrólisis (Rendimiento) y la concentración de azúcares fermentables. Se aplicó un diseño experimental factorial 2³ con dos réplicas, con los tres factores cada uno en dos niveles: concentración de ácido, 2 y 10 %; temperatura de hidrólisis, 100 y 125 °C; relación sólido: líquido (cartón:ácido), 20 y 60 g L⁻¹.

Se realizó un análisis. Obtención de azúcares fermentables obtenidos con cada ácido, con apoyo del *software Statgraphics Plus 5.1* (Manugistics, 2005).

El proceso de hidrólisis se llevó a cabo en tubos de vidrio de 25 mL que fueron colocados en una autoclave durante 120 min, a lo largo de los cuales se tomaron muestras cada 30 min para evaluar la cinética de conversión de los residuos de cartón en azúcares fermentables para lo cual se aplicó la técnica del ácido 3, 5-Dinitrosalisílico (DNS) (Miller, 1959). La eficiencia de sacarificación (rendimiento) se hizo con la siguiente fórmula:

Some of the mostly studied parameters in this process have been temperature and the kind of acid, among which the hydrochloric acid and the sulphuric acid are outstanding, and the latter offers interesting advantages (Pedersen *et al.*, 2010). However, the hydrolyzed obtained from the acid process have microbe growth inhibitors such as the acetic acid, the formic acid (Chandel *et al.*, 2013) and phenolic compounds that come from the complex structure of lignin (Binder and Raines, 2010); so, it is important to assess the effect of them upon the fermentation process.

In this research, it was studied the procurement and chemical description of an acid hydrolyzate of cardboard wastes under different reaction conditions, its treatment with activated carbon to eliminate microbe growth inhibitors and is later use as a carbon source for the cultivation of oil yeasts.

Materials and Methods

Cardboard wastes

Corrugated cardboard wastes (40 mesh) were handled. Samples were taken from five different sets and were described according to the TAPPI regulations (TAPPI, 2007), in regard to the following criteria: humidity, total extractives, cellulose, hemicellulose, lignin and ashes.

Cardboard acid hydrolysis

Hydrochloric acid (HCl) and sulphuric acid (H₂SO₄) were tested for cardboard waste hydrolysis. Their effect upon their concentration, temperature and the solid:liquid ratio effect over the hydrolysis efficiency (yield) and the fermentable sugar concentration were analyzed. A 2³ factorial experimental design with two replications was applied with the three factors in tow levels: acid concentration, 2 and 10 %; hydrolysis temperature, 100 and 125 °C; solid:liquid ratio (cardboard:acid), 20 and 60 g L⁻¹.

An analysis of variance (ANOVA) of the results from each acid was made, by using the *Statgraphics Plus 5.1* software (Manugistics, 2005).

The hydrolysis process was made in 25 mL glass tubes that were placed into an autoclave for 120 min, along which samples were taken every 30 min to assess the kinetics of the conversion of cardboard wastes into fermentable sugars; the 3 5-dinitrosalisylic acid (DNS) (Miller, 1959) technique was used for its calculation. The scarification efficiency (yield) was determined by the following formula:

$$\% = \frac{g \text{ reducing sugars}}{g \text{ dry cardboard}} \times 100$$

$$\% = \frac{\text{g azúcares reductores}}{\text{g cartón seco}} \times 100$$

Posteriormente, al utilizar el método más eficiente, se efectuó una segunda cinética de hidrólisis, y se tomaron muestras cada 20 min, a las cuales se les determinó tanto azúcares reductores, por la misma técnica (Miller, 1959) como compuestos fenólicos totales (subproductos de hidrólisis) por el Método de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). El experimento se realizó por duplicado.

Caracterización del hidrolizado

Los residuos de cartón fueron procesados según el procedimiento establecido previamente y se midió la humedad con un analizador Hohauser modelo MB45, la cantidad de azúcares reductores (Miller, 1959), de compuestos fenólicos totales (Singleton *et al.*, 1999), la concentración de azúcares totales por el Método de Fenol-Sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) y la composición específica de carbohidratos (HPLC). Para esta última técnica se usó un cromatógrafo de líquidos Waters 600 provisto de un detector de índice de refracción (Waters R401), un sistema de bombas cuaternarias, horno y columna BIO RAD (Aminex HPX-87C). Las condiciones de operación fueron las siguientes: temperatura de la columna a 80 °C; flujo eluyente (agua), 0.6 mL min⁻¹; volumen de muestra, 20 mL.

Activación y conservación de cepas

Las levaduras que se estudiaron fueron *Rhodotorula glutinis* (ATCC 204091) y *Cryptococcus curvatus* (ATCC 20509) adquiridas de la Colección Americana de Cultivo Tipo, conocida como ATCC por sus siglas en inglés, las cuales fueron activadas y propagadas en medio YPD. Para su conservación 1.5 mL de suspensión celular de cada levadura colectada en la fase de crecimiento exponencial se metió en un congelador Torrey modelo CH25 a -20 °C en viales de 2 mL con 0.5 mL de glicerol al 20 %.

Evaluación del crecimiento de las levaduras en el hidrolizado

Durante el proceso de hidrólisis química del cartón, debido a la degradación de carbohidratos y lignina, se generan subproductos que pueden resultar inhibitorios para el crecimiento microbiano. Por lo tanto, se evaluó la capacidad de las levaduras para crecer directamente en el hidrolizado, sin detoxificar, y en hidrolizado previamente detoxificado con carbón activado para remover compuestos inhibidores. Cabe mencionar que el pH del hidrolizado fue previamente ajustado a 5.5 mediante hidróxido de calcio y después se le añadió 20, 50 o 100 g L⁻¹ de carbón activado, y se

Afterwards, when using the most efficient method, a second kinetics hydrolysis and samples were taken every 20 min, to which reducing sugars by the same technique (Miller, 1959) as total phenolic compounds (hydrolysis by-products) by the Folin-Ciocalteu Method (Singleton *et al.*, 1999). The experiment was made in duplicate.

Description of the hydrolyzate

Cardboard waste was processed according to the procedure previously set and moisture was measured with a MB45 Hohauser analyzer; the amount of reducing sugars (Miller, 1959), total phenolic compounds (Singleton *et al.*, 1999), total sugar concentration was analyzed by the phenol-sulfuric method (Dubois *et al.*, 1956) and the specific composition of carbohydrate (HPLC). For the latter technique was used a Waters 600 liquid chromatographer equipped with a refractive index detector (Waters R401), quaternary pump system and a BioRad (Aminex HPX-87C) oven and column. Operating conditions were: column temperature at 80 °C; eluent flow (water), 0.6 mL min⁻¹; sample volume, 20 mL.

Activation and conservation of strains

The yeasts studied were *Rhodotorula glutinis* (ATCC 204091) and *Cryptococcus curvatus* (ATCC 20509) purchased from the American Type Culture Collection, (ATCC), which were activated and propagated in YPD medium. For conservation 1.5 mL of cell suspension of each yeast collected in the exponential growth phase was frozen with a CH25 Torrey freezer at -20 °C in 2 mL vials with 0.5 mL of 20 % glycerol.

Evaluation of yeast growth in the hydrolyzate

Due to the degradation of carbohydrates and lignin, during cardboard chemical hydrolysis by-products that may be inhibitory for microbial growth are generated. Therefore, the ability of yeasts to grow directly in the hydrolyzate, without being detoxified and previously detoxified with activated carbon to remove inhibiting compounds, was evaluated. It is noteworthy that the pH of the hydrolyzate was previously adjusted to 5.5 by using calcium hydroxide, and later 20, 50 or 100 g L⁻¹ of activated carbon were added and it was stirred constantly for 12 h. Finally, carbon was removed with a Varifuge Heraeus centrifuge and the concentration of sugars and the supernatant phenolic compounds were analyzed, in order to determine the efficiency of removal of inhibitors from the carbon and the amount of carbohydrates in the adsorbed material.

Detoxified hydrolyzates were used as basis for preparing culture medium for the yeasts to which were added, also, other nutrients (for each hydrolyzate L): (NH₄)₂SO₄, 4 g Peptone, 1 g; KH₂PO₄, 3 g; MgSO₄, 1 g; Trace elements, 1 mL. The composition

agitó constantemente durante 12 horas. Por último, el carbón se removió con una centrifuga Heraeus modelo Varifuge y se analizó la concentración de azúcares y de compuestos fenólicos al sobrenadante, a fin de determinar la eficiencia de remoción de inhibidores por parte del carbón y la cantidad de carbohidratos adsorbidos en el material.

Los hidrolizados destoxificados fueron utilizados como base para preparar medio de cultivo para las levaduras al que se le adicionaron, también, otros nutrientes (por L de hidrolizado): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4 g; peptona, 1 g; KH_2PO_4 , 3 g; MgSO_4 , 1 g; elementos traza, 1 mL. La composición de estos últimos es (por L): CaCl_2 , 3.6 g; ZnSO_4 , 0.75 g; CuSO_4 , 0.13 g; MnSO_4 , 0.5 g; CoCl_2 , 0.13 g; Na_2MoO_4 , 0.17 g; FeSO_4 , 0.025 g; EDTA, 0.04 g. Como medio control se utilizó glucosa como fuente de carbono (20 g L^{-1}) y todos los demás compuestos mencionados previamente disueltos en agua destilada en lugar de en hidrolizado. El pH de los medios se ajustó a 5.5 y para medio sólido se añadieron 16 g L^{-1} de agar.

Para la siembra de las levaduras en las cajas agar-cartón hidrolizado, se desarrolló un pre-inóculo en medio YPD (extracto de levadura, 20 g L^{-1} ; peptona, 20 g L^{-1} ; dextrosa, 20 g L^{-1}) durante 24 h, al término de las cuales se tomaron $10 \mu\text{L}$ de la suspensión celular ($\text{DO}_{600} = 0.3$) y se inocularon sobre el agar (10 puntos de inoculación). Las cajas se metieron en una incubadora Luzeren modelo DHP9162 a 30°C durante 72 h y posteriormente se cuantificaron las colonias desarrolladas. También se realizó una cinética de crecimiento en medio líquido (control y base hidrolizada) para determinar el perfil de crecimiento de las levaduras (producción de biomasa). Este cultivo se llevó a cabo en un matraz Erlenmeyer de 500 mL con deflectores y se incubó a 30°C en agitación a 200 rpm.

Resultados y Discusión

Descripción del cartón

La mayoría de los productos (papel y cartón) y subproductos de la industria papelera (fibras recicladas y lodos) contienen carbohidratos (celulosa y hemicelulosa) en el intervalo de 20 a 75 %, incluyendo lignina, revestimientos y rellenos (Zhu *et al.*, 2011). En los resultados experimentales mostrados en el Cuadro 1, se observa una cantidad total de polisacáridos de 65.6 % (celulosa y hemicelulosa), una proporción superior a la observada en maderas de *Eucalyptus globulus* Labille. (62.3 %) (Parajó *et al.*, 1993) o en *Pinus pinaster* Ait. (59.6 %) (Parajó *et al.*, 1995). Los resultados mostrados indican que el cartón utilizado en este estudio tiene un alto contenido de polisacáridos, lo cual es apropiado para la producción de azúcares fermentables.

Para el caso del contenido de celulosa en cartón, el valor fue superior al citado por Yuan *et al.* (2012) (57 %) y similar al de Yañez

of the latter is (by each L): CaCl_2 , 3.6 g; ZnSO_4 , 0.75 g; CuSO_4 , 0.13 g; MnSO_4 , 0.5 g; CoCl_2 , 0.13 g; Na_2MoO_4 , 0.17 g; FeSO_4 , 0.025 g; EDTA, 0.04 g. As a control, glucose was used as carbon source (20 g L^{-1}) and all other compounds mentioned previously which were dissolved in distilled water instead of the hydrolyzate. The pH of the media was adjusted to 5.5 and 16 g L^{-1} of agar were added to the solid medium.

For the sowing of yeasts in agar-hydrolyzed cardboard boxes, a pre-inoculum in YPD medium (20 g L^{-1} yeast extract; 20 g L^{-1} peptone; 20 g L^{-1} dextrose) was developed for 24 h, after which $10 \mu\text{L}$ of the cell suspension ($\text{OD}_{600} = 0.3$) were collected and inoculated on agar (10 inoculation sites). The boxes were placed into a DHP9162 Luzeren incubator at 30°C for 72 h and then the grown colonies were quantified. Growth kinetics in a liquid medium (control and hydroxylated base) was also performed to determine the profile of yeast growth (biomass production). This culture was carried out in a 500 mL Erlenmeyer flask with baffles and incubated at 30°C under stirring at 200 rpm.

Results and Discussion

Cardboard description

Most products (paper and cardboard) and by-products of the paper industry (recycled fibers and sludge) contain carbohydrates (cellulose and hemicellulose) in the range of 20-75 %, including lignin, coatings and fillers (Zhu *et al.*, 2011). In the experimental results shown in Table 1, a total amount of 65.6 % polysaccharides (cellulose and hemicellulose), a higher amount to that observed in the woods of *Eucalyptus globulus* Labille. (62.3 %) (Parajó *et al.*, 1993) or *Pinus pinaster* Ait. (59.6 %) (Parajó *et al.*, 1995). The results shown indicate that the cardboard used in this study has a high content of polysaccharides, which is appropriate for the production of fermentable sugars. In the case of cardboard fiber content, the value found was higher than reported by Yuan *et al.* (2012) (57 %) and similar to Yañez *et al.* (2004), while the hemicellulose that was found was less than half of the latter mentioned author (13.8 %).

Hemicellulose is the second polysaccharide in the cell wall of plants and it generally makes up around 20 to 35 % of the vegetal biomass (Wyman *et al.*, 2005). However, the quantified amount of this material in cardboard (5.6 %) was lower than that recorded in other Mlig such as bagasse, straw and wood. Probably this is a consequence of the chemical pulping used in the cardboard production process (usually, Kraft), or it is related to the possible use of fibers or recycled pulp for such ending. One of the main components of the Mlig is lignin, which confers sturdiness to the vegetal structure, since it keeps cellulose and hemicellulose together (Ragauskas *et al.*, 2006); also, the latter resists biological attack and the chemical agents, which acts as an obstacle to the efficient hydrolysis of the

et al. (2004), mientras que el de hemicelulosa resultó ser menos de la mitad al mencionado por este último autor (13.8 %).

La hemicelulosa es el segundo polisacárido en la pared celular de plantas, usualmente constituye alrededor de 20-35 % de la biomasa vegetal (Wyman *et al.*, 2005). Sin embargo, la cantidad cuantificada de ese material en el cartón (5.6 %) fue más baja a la registrada en otros Mlig como bagazos, pajas y madera. Este hecho se debe posiblemente al tipo de pulpeo químico empleado en el proceso de producción de cartón (Kraft, por lo general), o al probable uso de fibras o pulpa reciclada para dicho propósito. Otro de los principales componentes de los Mlig es la lignina, la cual le confiere solidez a la estructura vegetal, debido a que mantiene unidas a la celulosa y hemicelulosa (Ragauskas *et al.*, 2006); además es resistente al ataque biológico y agentes químicos, lo que constituye un obstáculo a la eficiente hidrólisis de los polisacáridos de la biomasa celulósica. El contenido de lignina en el cartón (Cuadro 1) fue similar al documentado por Yañez *et al.* (2004) y menor al observado en materiales celulósicos forestales y agrícolas (15-30 %), quizás como consecuencia de la remoción de esta durante el proceso de pulpeo Kraft.

Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida como pretratamiento de Mlig favorece el rompimiento de los polímeros de hemicelulosa y celulosa, a oligosacáridos, glucosa u otros monómeros. Los ácidos a altas concentraciones son muy efectivos para hidrolizar muchos Mlig, lo que da altos rendimientos de glucosa o xilosa a partir de celulosa o hemicelulosa, a baja temperatura y con baja generación de productos de degradación. También el uso de soluciones diluidas de ácidos (H_2SO_4 , HCl, H_3PO_4 , HNO_3 , CH_3COOH) han sido ampliamente investigadas para dicho fin, las de ácido sulfúrico y clorhídrico son las más comúnmente usadas (Linde *et al.*, 2008).

En este estudio, se evaluó la hidrólisis ácida como una de las técnicas más eficientes para el procesamiento de Mlig, comparando el ácido clorhídrico (HCl) y ácido sulfúrico (H_2SO_4). Los resultados muestran el efecto del tipo y la concentración de ácido (Figura 1A y B), así como la concentración de sólidos (cartón) y la temperatura, sobre la producción y rendimientos de azúcares a partir de cartón. En el caso del HCl, los factores que resultaron tener una influencia significativa sobre la cantidad de azúcares fermentables generados, fueron la concentración del ácido y de sólidos (cartón) así como su interacción (cuadros 2 y 3). La máxima concentración de azúcares (14.8 g L^{-1}) se alcanzó con la siguiente combinación de factores: HCl 10 %; 60 g L^{-1} de concentración de sólidos (cartón); temperatura de 100 o 125°C . El rendimiento de la hidrólisis en estas condiciones fue de 25.8 %.

polysaccharides of the cellulosic biomass. The lignin content of cardboard (Table 1) was similar to what Yañez *et al.* (2004) found and less than the observed in forest cellulosic and agriculture materials (15-30 %), probably as a result of its removal during the Kraft pulping process.

Cuadro 1. Composición de los residuos de cartón.

Table 1. Composition of cardboard wastes.

Componente	Porcentaje (%)
Humedad	5.9
Extraíbles totales	10.2
Celulosa	59.9
Hemicelulosa	5.6
Lignina	10.5
Cenizas	7.9

Acid hydrolysis

Acid hydrolysis as Mlig pretreatment promotes the breakdown of hemicellulose and cellulose polymers, oligosaccharides, glucose or other monomers. Acids at high concentrations are effective to hydrolyze many Mlig, which brings high yields of xylose or glucose from cellulose or hemicellulose, low temperature and low generation of degradation products. Also, the use of dilute solutions of acids (H_2SO_4 , HCl, H_3PO_4 , HNO_3 , CH_3COOH) have been extensively investigated for this purpose, being the sulfuric and hydrochloric acids the most commonly used (Linde *et al.*, 2008).

In this study, the acid hydrolysis was assessed as one of the most efficient techniques for Mlig processing by comparing the hydrochloric acid (HCl) and the sulphuric acid (H_2SO_4). Results show the effect of type and concentration of acid (Figure 1A and B) and the concentration of solids (cardboard) and temperature on the production and yield of sugars from cardboard. In the case of HCl, the factors found to have a significant influence on the amount of generated fermentable sugars were acid concentration and solid (cardboard) and their interaction (tables 2 and 3). The maximum concentration of sugars (14.8 g L^{-1}) was achieved with the following combination of factors: HCl 10 %; 60 g L^{-1} of solids concentration (cardboard); temperature of 100 or 125°C . The hydrolysis yield under these conditions was 25.8 %.

In the case of hydrolysis with H_2SO_4 (Figure 1B), the three factors studied were significant as well as the interaction between the acid concentration and solids (tables 4 and 5). By using the following combination of factors the highest sugar concentration (19.2 g L^{-1}) was obtained: H_2SO_4 10 %; 60 g L^{-1} of solids concentration (cardboard) and 125°C . Under these conditions the hydrolysis yield was 31.2 %.

Cuadro 2. Análisis de varianza de los tres factores estudiados en la hidrólisis de cartón para la obtención de azúcares fermentables, usando como catalizador HCl.

Table 2. Analysis of variance of the three factors studied in cardboard hydrolysis to obtain fermentable sugars, using HCl as a catalyst.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Concentración de HCl	67.28	1	67.28	12.56	0.0076
B: Temperatura	1.06	1	1.06	0.20	0.6688
C: Relación sólido:líquido	225.38	1	225.38	42.08	0.0002
A x B	0.77	1	0.77	0.14	0.7144
A x C	32.23	1	32.23	6.02	0.0397
B x C	0.42	1	0.42	0.08	0.7867
A x B x C	5.09	1	5.09	0.95	0.3579
Error total	42.84	8	5.36		
Total (corr.)	375.07	15			

Nivel de confianza del 95%

Confidence level of 95 %

Para el caso de la hidrólisis con H_2SO_4 (Figura 1B), los tres factores estudiados resultaron significativos, así como la interacción entre la concentración de ácido y de sólidos (cuadros 4 y 5). Al utilizar la siguiente combinación de factores se obtiene la mayor concentración de azúcares (19.2 g L^{-1}): H_2SO_4 10 %; 60 g L^{-1} de concentración de sólidos (cartón) y temperatura de 125°C . En estas condiciones el rendimiento de la hidrólisis fue de 31.2 %.

Cuadro 3. Medias de los niveles que tuvieron un impacto significativo en la obtención de azúcares fermentables usando como catalizador HCl.

Table 3. Means levels had a significant impact on the production of fermentable sugars using HCl as a catalyst.

Factor	Nivel	Media LS	Diferencia
Concentración de HCl	2	6.49	-4.10
	10	10.59	
Relación sólido:líquido	20	4.78	-7.51
	60	12.29	

Prueba LSD de Fisher; casos, 8; Sigma LS, 0.82; Límites, +/-2.67.

Fisher LSD test; cases, 8; Sigma LS, 0.82; Limits, +/- 2.67

In general it was observed that when using the low load of solids (20 g L^{-1}), the yield of the hydrolysis increases, even though hydrolyzates of low sugar content are got, conversely, then the solids load is increased (60 g L^{-1}) yield diminishes but the sugar concentration that results is higher.

The greatest sugar production in both acids came from using both, the highest concentration of them (100 %) as well as of solids (60 g L^{-1} cardboard) in the reaction mix. In addition, these values were achieved when a higher temperature was applied (125°C), even though in the case of HCl it was 100°C and significant carbohydrate levels were accomplished as well.

H_2SO_4 under the mentioned conditions favored 30 % more sugars (19.2 g L^{-1}) and their higher yield than 20 % (31.2 %) to that found with HCl (Figure 1 A and B). In this regard, Yañez *et al.* (2004) recorded higher numbers of sugar (29 g L^{-1}) and hemicellulose conversion yield (78 %) when testing 10 % cardboard and 3 % of H_2SO_4 , even using a time (180 min) and temperature (130°C) much higher to those of this work. Recently, Escorza *et al.* (2011) hydrolyzed cardboard chemically (60 % H_2SO_4) and biologically (*Phanerochaete* sp.). With the acid treatment, their yield calculation was 20 %, while the biological test was almost twice (39 %) and a sugar concentration as high as 10 g L^{-1} in a 2 % cardboard load medium. This number was smaller than that of the actual study (19.2 g L^{-1}) under the best hydrolysis state (10 % H_2SO_4 , 60 g L^{-1} cardboard and 125°C) (Figure 1B).



Cuadro 4. Análisis de varianza de los tres factores estudiados en la hidrólisis de cartón para la obtención de azúcares fermentables, usando como catalizador HCl.

Table 4. Analysis of variance of the three factors studied in cardboard hydrolysis to obtain fermentable sugars, using HCl as a catalyst.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Concentración de H_2SO_4	47.13	1	47.13	37.81	0.0003
B: Temperatura	8.67	1	8.67	6.96	0.0298
C: Relación sólido:líquido	460.75	1	460.75	369.65	0.0000
A x B	0.15	1	0.15	0.12	0.7391
A x C	10.08	1	10.08	8.09	0.0217
B x C	1.07	1	1.07	0.86	0.3810
A x B x C	1.946	1	1.95	1.56	0.2468
Error total	9.97	8	1.25		
Total (corr.)	539.77	15			

Nivel de confianza de 95 %

Confidence level of 95 %.

En general se observó que al utilizar la carga de sólidos baja (20 g L⁻¹), el rendimiento de la hidrólisis incrementa, sin embargo se obtienen hidrolizados con bajo contenido de azúcares; mientras que al aumentar la carga de sólidos (60 g L⁻¹) el rendimiento disminuye, pero la concentración de azúcares que se obtiene es superior.

La mayor producción de azúcares en ambos ácidos se obtuvo al utilizar tanto la concentración más alta de ellos (10 %), como de sólidos (60 g L⁻¹ cartón) en la mezcla de reacción. Adicionalmente, estos valores fueron alcanzados cuando se aplicó la temperatura más alta (125 °C), aunque para el caso de HCl a 100 °C también se lograron niveles significativos de azúcares.

El H_2SO_4 en las condiciones mencionadas permitió obtener 30 % más de azúcares (19.2 g L⁻¹) y un rendimiento de estos superior a 20 % (31.2 %), al registrado con HCl (Figura 1 A y B). Al respecto, Yañez *et al.* (2004) determinaron las cantidades más altas de azúcares (29 g L⁻¹) y rendimiento de conversión de hemicelulosa (78 %), cuando utilizaron 10 % de cartón y 3 % de H_2SO_4 , aunque con un tiempo (180 min) y temperatura (130 °C) muy superiores a las del presente trabajo. Recientemente, Escorza *et al.* (2011) hidrolizaron química (60 % H_2SO_4) y biológicamente (*Phanerochaete* sp.) cartón. Los autores indican con el tratamiento ácido un rendimiento de 20 % de azúcares reductores, mientras que con el biológico fue casi del doble (39 %), para una concentración de 10 g L⁻¹ de azúcares en el medio a una carga de cartón de 2 %; esta concentración de carbohidratos fue menor a la registrada en el estudio que aquí se documenta (19.2 g L⁻¹) en las mejores condiciones de hidrólisis (10 % H_2SO_4 , 60 g L⁻¹ cartón y 125 °C) (Figura 1B).

Cuadro 5. Medias de los niveles que tuvieron impacto significativo en la obtención de azúcares fermentables usando como catalizador H_2SO_4 .Table 5. Mean levels that had significant impact on the production of fermentable sugars using H_2SO_4 as catalyst.

Factor	Nivel	Media LS	Diferencia
Concentración de H_2SO_4	2	9.87	-3.43
	10	13.30	
Temperatura	100	10.85	-1.47
	125	12.32	
Relación sólido:líquido	20	6.22	-10.73
	60	16.95	

Prueba, LSD de Fisher; casos, 8; Sigma LS, 0.39; límites, +/- 1.29.

Test, Fisher LSD, cases, 8; Sigma LS, 0.39; Limits, +/- 1.29.

Similar concentrations of these compounds have been recorded by Aguilar *et al.* (2002), (24.6 g L⁻¹) by hydrolyzing sugar cane bagasse (6 %) with H_2SO_4 (2 %, 122 °C, 24 min) and solubilizing 90 % hemicellulose. The effect of temperature identified in this study is consistent with previously published values above 100 °C (120-130 °C), which favor higher concentrations and yields of sugars (Camargo *et al.*, 2014; Reales *et al.*, 2013; Laopai boon *et al.*, 2010; Yañez *et al.*, 2004; Aguilar *et al.*, 2002). In recent times there have also been significant amounts of reducing sugars (33 g L⁻¹) from high loads of plant biomass of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, 12 %) and diluted acid solutions (2.5 % H_2SO_4), with a temperature of 121 °C and time of 20 min, similar to those maintained in this study (Reales *et al.*, 2013).

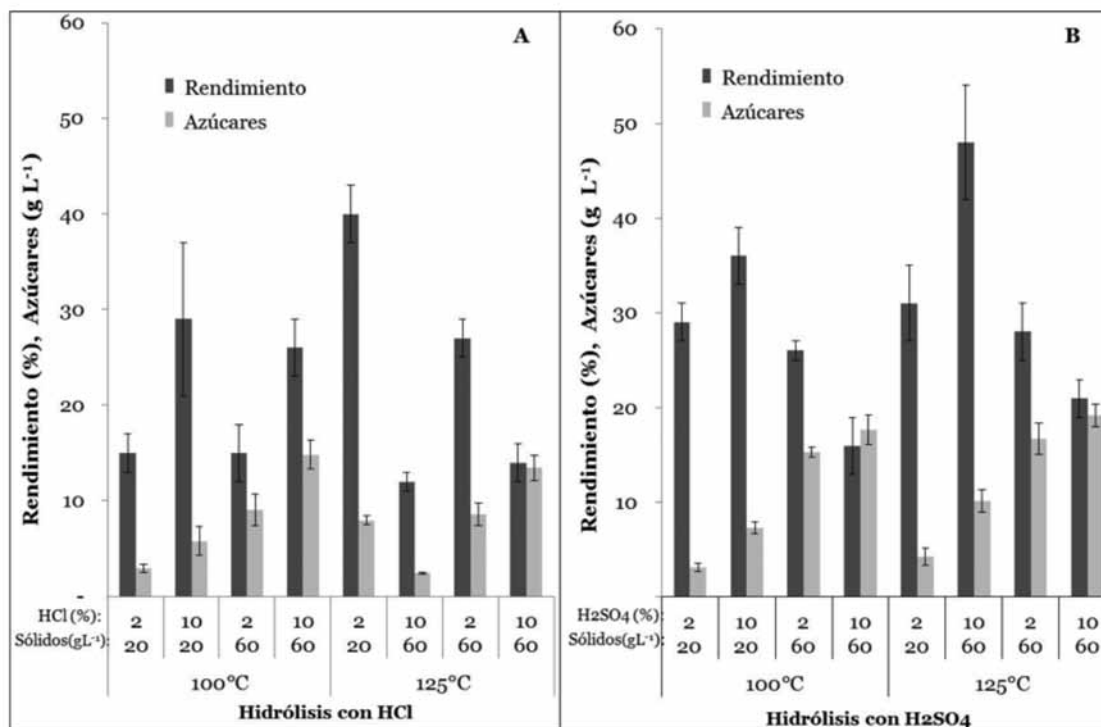


Figura 1. Producción y rendimiento de azúcares obtenidos por hidrólisis con HCl (A) y H₂SO₄ (B), en diferentes condiciones de temperatura y concentración de sólidos (cartón).

Figure 1. Production and yield of sugars obtained by hydrolysis with HCl (A) and H₂SO₄ (B) and in different temperature conditions and concentration of solids (cardboard).

Concentraciones similares de estos compuestos han sido citados por Aguilar *et al.* (2002), (246 g L⁻¹) al hidrolizar bagazo de caña de azúcar (6 %) con H₂SO₄ (2 %, 122 °C, 24 min) y solubilizar 90 % de hemicelulosa. El efecto de la temperatura identificado es congruente con lo publicado, donde se menciona que con valores mayores a 100 °C (120-130 °C) generan tanto las concentraciones como los rendimientos más importantes de azúcares (Camargo *et al.*, 2014; Reales *et al.*, 2013; Laopaiboon *et al.*, 2010; Yañez *et al.*, 2004; Aguilar *et al.*, 2002). Recientemente, también se han consignado cantidades relevantes de azúcares reductores (33 g L⁻¹) a partir de cargas elevadas de biomasa vegetal de jacinto de agua (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, 12 %) y soluciones ácidas diluidas (2.5 % H₂SO₄), con una temperatura de 121 °C y tiempo de 20 min, condiciones similares a las manejadas en la presente investigación (Reales *et al.*, 2013).

Por otro lado, se ha realizado la hidrólisis enzimática de cartón a diferentes concentraciones (5-10 %) y se alcanzaron rendimientos de azúcares que varían entre 56 y 80 % (Kádár *et al.*, 2004; Wayman *et al.*, 1992), de papel periódico (10 % sólidos) (Li *et al.*, 2007) y lodos de papel (6 % sólidos) (Kádár *et al.*, 2004), con 40 % y 59 % de conversión de celulosa, respectivamente.

Furthermore, cardboard enzymatic hydrolysis at different concentrations (5-10 %) has also been made and sugars yields ranging from 56-80 % have been reached (Kádár *et al.*, 2004; Wayman *et al.*, 1992), as well as newspaper (10 % solids) (Li *et al.*, 2007) and paper sludge (6 % solids) (Kádár *et al.*, 2004) of which 40 % and 59 % conversion of cellulose, respectively were obtained.

The production of sugars from Mlig seems to be limited by the high degree of complexity inherent in the processing of these raw materials. This is related to the nature and chemical composition of the lignocellulosic biomass. The two main constituent polymers are cellulose and hemicellulose, whose hydrolysis provides fermentable sugars, which can be converted to high value-added products (Sánchez and Cardona, 2008). Removing hemicellulose and / or lignin leads to structural changes in Mlig, facilitating the accessibility of chemicals and enzymes to the cellulose chains. Dilute acid pretreatments have been employed for this purpose as they improve yields of sugars (Saha and Bothast, 1999), as they increase the surface area, porosity and wetting Mlig, and makes polysaccharides more susceptible to chemical or enzymatic hydrolysis.

The effectiveness of the pretreatment and hydrolysis improvement has been correlated with removal of hemicellulose,

La producción de azúcares a partir de Mlig parece estar limitada por el alto grado de complejidad inherente en el procesamiento de estas materias primas, lo cual se relaciona con la naturaleza y composición química de la biomasa lignocelulósica. Los dos principales polímeros que la constituyen son la celulosa y la hemicelulosa, cuya hidrólisis provee azúcares fermentables que pueden convertirse en productos de alto valor agregado (Sánchez y Cardona, 2008). La eliminación de hemicelulosas o de lignina conduce a cambios estructurales en los Mlig, lo que facilita la accesibilidad de agentes químicos y enzimas a las cadenas de celulosa. Los pretratamientos con ácidos diluidos han sido empleados para dicho propósito, pues mejoran los rendimientos de azúcares (Saha y Bothast, 1999), ya que incrementan el área superficial, la porosidad y la humectación del Mlig, y hace a los polisacáridos más susceptibles a la hidrólisis química o enzimática.

La efectividad del pretratamiento y mejoramiento de la hidrólisis se correlaciona con la remoción de hemicelulosa, lignina y con la reducción de la cristalinidad de la celulosa (Yang y Wyman, 2008; Sun y Cheng, 2002; Mansfield *et al.*, 1999). En un pretratamiento de Mlig con ácidos diluidos, la hemicelulosa es, preferentemente atacada, seguida por la celulosa amorfa (du Toit *et al.*, 1984). Los parámetros críticos en los pretratamientos ácidos incluyen la temperatura, el tiempo y la relación ácido:sólidos (concentración de sólidos).

Las cinéticas de hidrólisis de residuos de cartón en las que se usaron H_2SO_4 o HCl en las condiciones óptimas, según el análisis estadístico del diseño experimental utilizado, muestran perfiles diferentes de liberación de azúcares (Figura 2), que inició rápidamente su producción entre los 30 y 60 min, para el caso del HCl . Sin embargo, con ambos ácidos se observó que a los 90 min se alcanza la máxima concentración de azúcares, la cual fue 30 % superior para el H_2SO_4 , posteriormente, se evidencia un proceso de degradación de los mismos.

Resultados similares de efectividad entre el HCl y el H_2SO_4 (0.5 %) han sido registrados en el pretratamiento de bagazo de caña de azúcar (6.6 % sólidos, 120 °C, 4h) deslignificado producen concentraciones de azúcares de 19 y 16 g L⁻¹, respectivamente (Laopaiboon *et al.*, 2010). A pesar de que el HCl permitió generar una cantidad ligeramente superior de carbohidratos, la desventaja fue que promovió la producción de furfural (0.7 g L⁻¹), uno de los principales compuestos tóxicos para el desarrollo microbiano (Laopaiboon *et al.*, 2010).

La hidrólisis de celulosa a glucosa mediante ácidos diluidos es un proceso relativamente simple, el cual origina rendimientos moderadamente altos en tiempos cortos. El tamaño pequeño

lignin and reducing cellulose crystallinity (Yang and Wyman, 2008; Sun and Cheng, 2002; Mansfield *et al.*, 1999). In a Mlig pretreatment with dilute acids, the hemicellulose is preferably attacked followed by amorphous cellulose (du Toit *et al.*, 1984). Critical parameters in acid pretreatment include temperature, time and the acid: solids ratio (solids concentration).

The kinetics of hydrolysis of waste cardboard using H_2SO_4 or HCl in optimum conditions according to the statistical analysis of the experimental design show different sugars release profiles (Figure 2), which quickly started production between 30 and 60 min for HCl . However, in both cases it was observed that at 90 min the maximum concentration of sugar is reached which is 30 % over for H_2SO_4 , to become evident, later, a degradation process of them.

Similar results of effectiveness between HCl and H_2SO_4 (0.5 %) have also been previously registered in the pretreatment of delignified sugarcane bagasse (6.6 % solids, 120 °C, 4 h) (Laopaiboon *et al.*, 2010), from which concentrations of sugars of 19 and 16 g L⁻¹, respectively, were produced. Although the HCl allowed the generation of a slightly higher amount of carbohydrate, the disadvantage noted was that it promoted the production of furfural (0.7 g L⁻¹), one of the major toxic compounds for microbial growth (Laopaiboon *et al.*, 2010).

Hydrolysis of cellulose to glucose by using dilute acid is a relatively simple process, which produces moderate high yields in relatively short times. The small size allows them to have proton catalysis accessibility of the glycosidic bonds without problem. However, the sugars produced can be susceptible to acid-catalyzed reactions in the same medium and temperature, to generate degradation products.

Unfortunately, while obtaining higher yields of sugars as temperature increases, also degradation products, such as furfural, hydroxymethylfurfural, acetic acid, formic acid, levulinic acid, etc., are formed (Kumar *et al.*, 2009). To evaluate the generation of products (phenolic compounds) during the hydrolysis process, the conditions previously described were replicated (which resulted in the highest concentration of sugars): 10 % H_2SO_4 , 60 g L⁻¹ of solids and 125 °C. During the process, samples were taken every 20 min for determining such compounds and sugars.

In Figure 3 it is noted that the generation of phenolic compounds, lignin derivatives present in cardboard, is related to the production of sugars. That is, as the cellulose hydrolysis is performed, lignin is affected, and the time at which the maximum carbohydrate concentration is reached is the same as for phenolic compounds (90 min). Then sugars degrade and concentration of compounds no longer increases. Gupta *et al.* (2009) reported that the release of sugars increased with increasing acid concentration until the optimum value is achieved. After this, the formation of toxic compounds inhibitors raises and, as



de los protones les permite tener accesibilidad a la catálisis de los enlaces glucosídicos sin problema. No obstante, los azúcares producidos pueden ser susceptibles a reacciones catalizadas en medio ácido y, por la misma temperatura, se generan productos de degradación.

Aumentar la temperatura, además de incrementar los rendimientos de obtención de azúcares tiene como desventaja la formación de los productos de degradación, tales como furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético, fórmico, levulínico, etcétera (Kumar *et al.*, 2009). Para evaluar la generación de subproductos (compuestos fenólicos) durante el proceso de hidrólisis, se utilizaron las condiciones descritas, previamente (de las cuales resultó la mayor concentración de azúcares): H_2SO_4 al 10 %, 60 g L^{-1} de sólidos y 125°C . Durante el proceso se tomaron muestras cada 20 min para determinar azúcares y compuestos fenólicos.

a consequence, so does the reduction of the concentration of sugars.

However, this kind of pretreatment has been applied to several Mlig, such as degreased sunflower seeds (10 %) with H_2SO_4 (6 %, 121°C , 20 min) with which 54 g L^{-1} of sugars and a recovery of hemicellulose of 75.5 % were obtained. In addition, inhibition compounds were formed (3.9 g L^{-1} phenols; 1.9 g L^{-1} acetic acid; 0.018 g L^{-1} furfural; 0.051 g L^{-1} hidroximetilfurfural), phenols in particular (2.5 times more) when the reaction time was extended up to 60 min (Camargo *et al.*, 2014). Under acid conditions, lignin depolymerizes and degrades into a wide variety of aldehydic aromatic and phenolic monomers and oligomers. Low molecular weight phenolic compounds strongly inhibit enzymes and microorganisms. Vanillin, syringaldehyde and hydroxybenzaldehyde are some of the inhibitory compounds released by the acid hydrolysis.

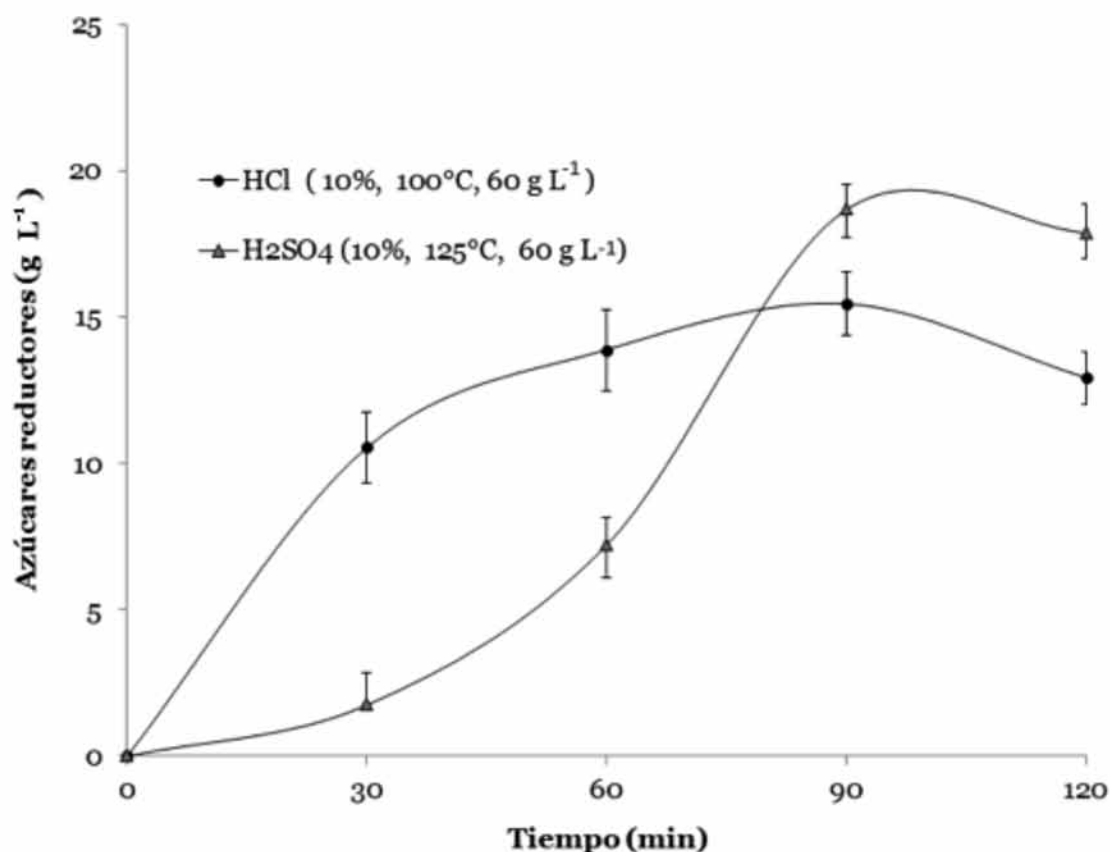


Figura 2. Cinética de hidrólisis de residuos de cartón utilizando como catalizador HCl y H_2SO_4 bajo las mejores condiciones de obtención de azúcares (concentración del ácido, temperatura, y contenido de sólidos).

Figure 2. Kinetics of hydrolysis of waste cardboard with HCl and H_2SO_4 as catalysts under the best conditions for obtaining sugars (acid concentration, temperature and solid content).

En la Figura 3 se observa que la generación de compuestos fenólicos, derivados de la lignina presente en el cartón, está relacionada con la producción de los azúcares. Es decir, a medida que se realiza la hidrólisis de la celulosa se ataca químicamente a la lignina, y el tiempo al que se alcanza la máxima concentración de carbohidratos es el mismo que para compuestos fenólicos (90 min). Posteriormente, los azúcares se degradan y la concentración de compuestos fenólicos ya no se incrementa. Gupta *et al.* (2009) señalaron que la liberación de azúcares es mayor al aumentar la concentración de ácido hasta alcanzar el valor óptimo. Después, crece la formación de compuestos inhibidores tóxicos y como consecuencia disminuye la concentración de azúcares.

Description of the hydrolyzate

The sugars from cardboard may be used as good fermentation media for the biotechnological production of an important variety of chemical compounds of industrial relevance. Among

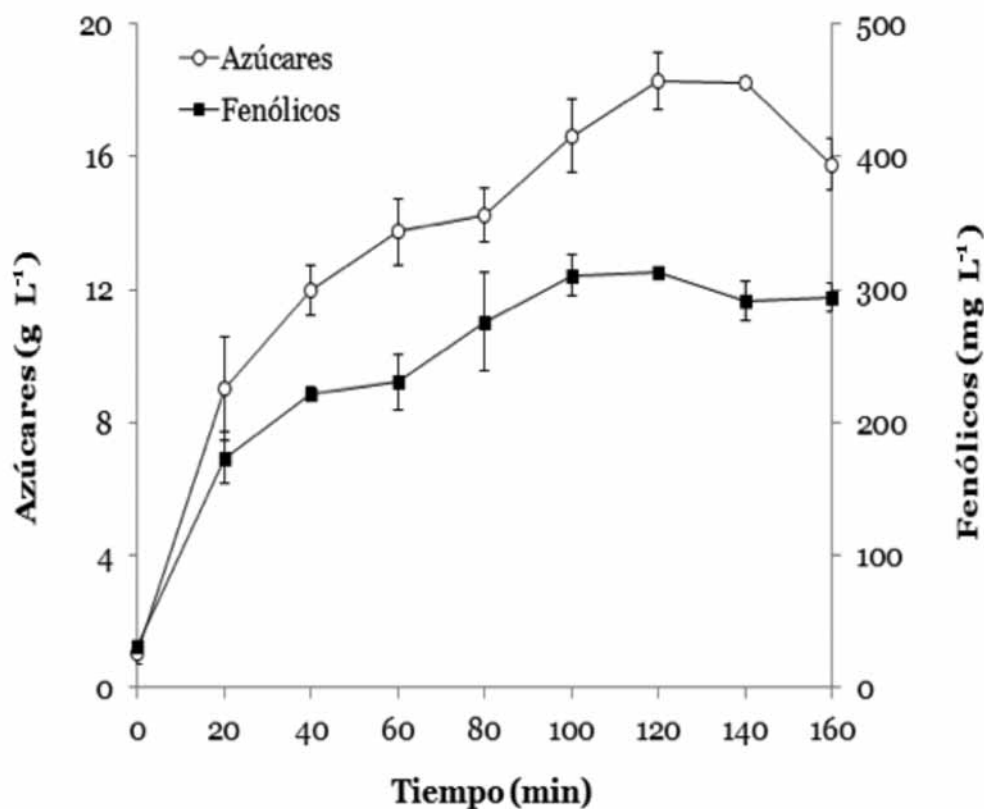


Figura 3. Cinética de hidrólisis de residuos de cartón para la obtención de azúcares fermentables y de subproductos de degradación (H_2SO_4 10 %, 60 g L⁻¹ de sólidos, 125 °C).

Figure 3. Hydrolysis kinetics of cardboard wastes to obtain fermentable sugars and degradation byproducts (H_2SO_4 10 %, 60 g L⁻¹ solids, 125 °C).



Sin embargo este tipo de pretratamiento ha sido aplicado a diversos M_Lig, como los residuos de semillas de girasol desengrasadas (10 %) con H₂SO₄ (6 %, 121 °C, 20 min) de los que se obtuvieron 54 g L⁻¹ de azúcares y una recuperación de 75.5 % de hemicelulosa. Además, se produjeron compuestos inhibidores (fenoles: 3.9 g L⁻¹; ácido acético: 1.9 g L⁻¹; furfural: 0.018 g L⁻¹; hidroximetilfurfural: 0.051 g L⁻¹), que se incrementaron de manera significativa, sobre todo de fenoles (hasta 2.5 veces), al prolongar el tiempo de reacción hasta 60 min (Camargo *et al.*, 2014). La lignina bajo condiciones ácidas se despolimeriza y degrada en una amplia variedad de monómeros y oligómeros aldehídicos, aromáticos y fenólicos. Los compuestos fenólicos de bajo peso molecular inhiben a enzimas y microorganismos. La vainillina, siringaldehído e hidroxibenzaldehído son algunos de estos compuestos liberados en hidrólisis ácida.

Caracterización del hidrolizado

Los azúcares provenientes del cartón pueden ser empleados como medios de fermentación apropiados para la producción biotecnológica de una variedad importante de compuestos químicos de relevancia industrial; algunos ejemplos son las celulasas y xilanasas (Moretti *et al.*, 2012), el metano (Yuan *et al.*, 2012), bioetanol (Wang *et al.*, 2012) y el ácido láctico (Yañez *et al.*, 2005).

them celullases and xylanases can be mentioned (Moretti *et al.*, 2012), methane (Yuan *et al.*, 2012), bioethanol (Wang *et al.*, 2012) and lactic acid (Yañez *et al.*, 2005), among others.

The composition of the hydrolyzate is of great importance because the yeasts in question have different affinity for carbohydrate intake, with greater capacity to absorb glucose than xylose. It was expected that these two carbohydrates might be present in the hydrolyzate of this investigation because the composition of cardboard is mainly cellulose but it also contains hemicellulose, which is the source of xylose. However, an analysis by liquid chromatography (HPLC) revealed that the actual carbohydrate in the highest proportion was glucose, and xylose was not detected or any other monosaccharide (Figure 4). Another relevant fact is that most of the carbohydrates in the hydrolyzate are monosaccharides (glucose) and only a small proportion are oligosaccharides. Yeasts studied herein have no enzymatic systems to degrade polysaccharides, so having a greater amount of simple sugars means that there is a better conversion of such substrate by the microorganism.

Evaluation of yeast growth in the hydrolyzate

Once characterized, the yeast culturing was followed in the detoxified or non-detoxified hydrolyzate as there are previous

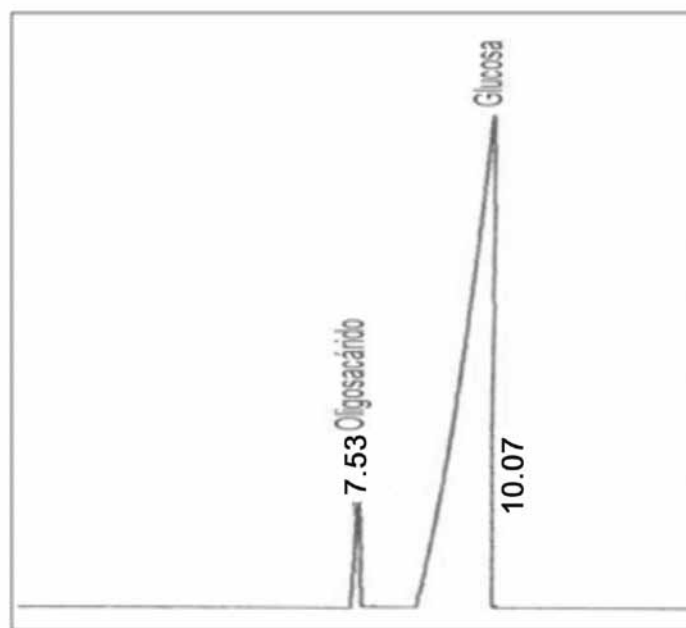


Figura 4. Determinación de la composición de carbohidratos del hidrolizado obtenido con H₂SO₄ (10 %, 60 g L⁻¹ de sólidos, 125 °C) por cromatografía de líquidos (HPLC).

Figure 4. Determination of the composition of the hydrolyzate resulting from H₂SO₄ (10 %, 60 g L⁻¹ solids, 125 °C) by liquid chromatography (HPLC).

La composición del hidrolizado es de interés porque las levaduras en cuestión tienen diferente afinidad para el consumo de carbohidratos, con mayor capacidad para asimilar glucosa que xilosa. Se esperaba que estos dos carbohidratos pudieran estar en el hidrolizado debido a que el cartón está constituido principalmente por celulosa, aunque contiene hemicelulosa que es la fuente de la xilosa. Sin embargo en el análisis del hidrolizado por cromatografía de líquidos (HPLC) se determinó la mayor proporción de glucosa, no se detectó xilosa, ni otro monosacárido (Figura 4). Cabe señalar que gran parte de los carbohidratos presentes en el hidrolizado están como monosacárido (glucosa) y solo una pequeña proporción corresponde a oligosacáridos. Lo anterior es relevante, ya que las levaduras estudiadas en este trabajo carecen de sistemas enzimáticos para degradar polisacáridos, así que el tener una mayor cantidad de azúcares en forma simple implica una mejor conversión de dicho sustrato por el microorganismo.

Evaluación del crecimiento de las levaduras en el hidrolizado

Una vez caracterizado, se procedió con el cultivo de las levaduras en el hidrolizado destoxificado o sin destoxificar, ya que existen estudios previos de cultivo de levaduras oleaginosas en hidrolizados de residuos lignocelulósicos, en los que se hace mención del efecto tóxico de los compuestos inhibidores y la necesidad de aplicar métodos de destoxificación (Huang et al., 2009). En el Cuadro 6 se resume la caracterización del hidrolizado después de someterlo a tratamiento con carbón activado para remover compuestos inhibidores. Se observa que después de destoxificar el hidrolizado la concentración de compuestos fenólicos disminuye drásticamente, aunque hay un efecto de retención de azúcares.

Para determinar si el hidrolizado requiere ser destoxificado antes de usarse como medio para el crecimiento de las levaduras, estas fueron sembradas en medio sólido preparado en base al hidrolizado sin tratar o tratado con carbón (tratamiento I, II, III). Como control se utilizó un medio mineral con glucosa, como fuente de carbono; es decir un sin hidrolizado. Se observó que las dos levaduras crecieron satisfactoriamente en el control (medio en base a glucosa); *C. curvatus* no se desarrolló en el hidrolizado de cartón (destoxificado o sin destoxificar), lo cual sugiere que es sensible a los compuestos de inhibición a las concentraciones presentes, aún después de los tratamientos con carbón activado. Para el cultivo de esta levadura se han utilizado hidrolizados de bagazo de sorgo y fibra de maíz (Liang et al., 2014). En el primer caso el crecimiento fue favorable a pesar del contenido de compuestos inhibidores, mientras que con el hidrolizado de fibra de maíz, *C. curvatus* no tuvo ninguna reacción en ese sentido, pese haberlo enriquecido con otros nutrientes.

reports of oilseed yeast hydrolysates of lignocellulosic wastes, in which it is mentioned the toxic effect of the inhibitor compounds and the need for detoxification methods (Huang et al., 2009). Table 6 shows the description of the hydrolyzed after subjecting it to a treatment with activated charcoal to remove inhibiting compounds. It is clear that after detoxifying the hydrolyzate, the concentration of phenolic compounds decreases dramatically although there is also an effect of retention of sugars.

To determine if the hydrolyzate must be detoxified before being used as a medium for yeast growth, such microorganisms were sown in solid medium prepared on the basis of the untreated hydrolyzate or charcoal treated (treatments I, II, III). A mineral medium with glucose as carbon source was used as control, that is, a medium without hydrolyzate. It was observed that both yeasts (based on glucose medium) were performing as expected in control, however *C. curvatus* was unable to grow in the hydrolyzate cardboard (detoxified or not), suggesting that it is sensitive to the inhibition compounds at the concentrations present even after the treatments with activated charcoal. For the cultivation of this yeast sorghum bagasse and corn fiber hydrolysates have been handled (Liang et al., 2014). In the first case yeast growth was favorable despite the amount of inhibiting compounds, whereas in the corn fiber hydrolyzate *C. curvatus* had no reaction to that effect, not even after having been fortified with other nutrients.

R. glutinis colonial development was advantageous both in the control medium and in the non- detoxified hydrolyzate, so it can be inferred that this strain has increased resistance to the inhibitory compounds or may possess an enzymatic mechanism or process to degrade or transform them so that they will not be toxic for its development. In relation to this result, this strain was grown in hydrolysates of wheat straw; of *Populus euramevicana* Guinier leaves; *Miscanthus* ssp. (Mast et al., 2014) and rice straw (Yen and Chang, 2014) among others. The results regarding the toxicity of the hydrolyzate for this yeast are contrasting. Researchers as Chen et al. (2009) indicate that some of the degradation products of MLig inhibit their growth, while in other studies (Yu et al., 2011; Tao et al., 2010) reported not a negative effect, since *R. glutinis* was able to grow without detoxified hydrolyzate, and growth was even higher than in detoxified hydrolyzate.

This strain was selected to continue with the growth study in liquid medium. A glucose based medium was used as well as in a cardboard hydrolyzate basis, and results are shown in Figure 5.

It can be seen that the growth profile is very similar in both media, and the maximum biomass concentration that was achieved looks very much alike, as well (7 a 8 g L⁻¹) regardless of the cultivation medium involved. This result coincides with that observed in the solid medium, which suggests that *R. glutinis* is tolerant to the inhibitory compounds produced during the cardboard hydrolysis process, and even as Yu et al. (2011)

Cuadro 6. Caracterización del hidrolizado después de llevar a cabo la destoxificación con carbón activado a diferentes concentraciones.
Table 6. Description of the hydrolyzate after detoxification with activated carbon at different concentrations.

Tratamiento	Carbón activado (g L ⁻¹)	Azúcares reductores (g L ⁻¹)	Compuestos fenólicos (mg L ⁻¹)
I	20	18.1±0.89	75.7± 12.4
II	50	17.1± 0.74	51.2± 8.4
III	100	13.8±0.91	35.1± 10.7

R. glutinis tuvo un desarrollo colonial favorable tanto en el medio control, como en el hidrolizado sin destoxificar, por lo que se deduce que cuenta con una mayor resistencia a los compuestos inhibitorios, o bien posee un mecanismo enzimático para degradarlos o transformarlos, de manera que no le resulten tóxicos para su desarrollo. Al respecto, esta cepa se ha cultivado en hidrolizados de paja de trigo; de hojas de *Populus euramevicana* Guinier; *Miscanthus ssp.* (Mast *et al.*, 2014); y paja de arroz (Yen y Chang, 2014). Los resultados de la toxicidad del hidrolizado son contrastantes. Los investigadores como Chen *et al.* (2009) indican que algunos de los productos de degradación de los MLIg inhiben su crecimiento, mientras que en otros estudios (Yu *et al.*, 2011; Tao *et al.*, 2010) se informa que no presentan un efecto negativo, ya que *R. glutinis* fue capaz de crecer en hidrolizado sin destoxificar, e incluso el crecimiento fue superior en comparación de lo observado en hidrolizado destoxificado.

stated, the biomass production was slightly higher when using the based on the hydrolyzate without detoxification medium. This same tendency was confirmed in regard to growth speed which was 0.46 h⁻¹ in the control medium, while in the based on cardboard hydrolysate medium it was 0.51 h⁻¹

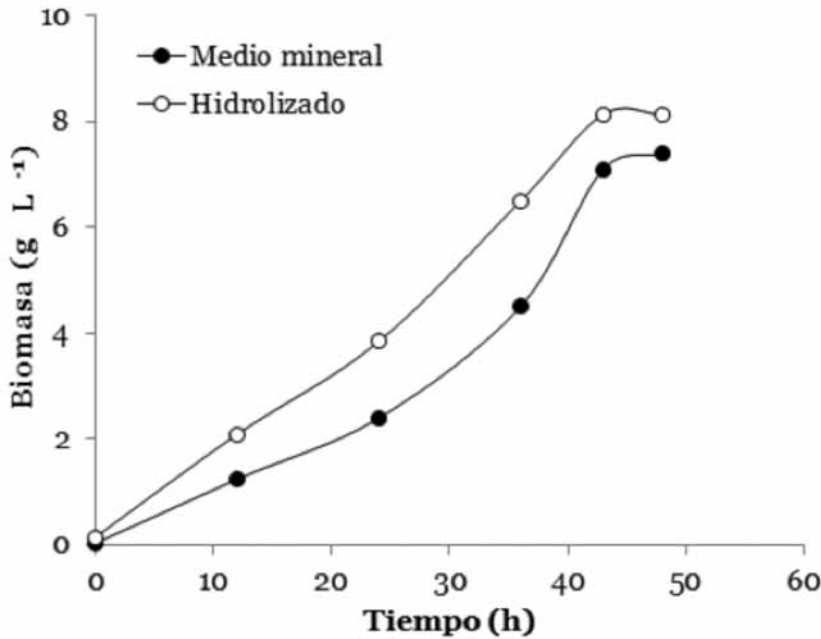


Figura 5. Cinética de crecimiento de *Rhodotorula glutinis* en medio mineral y a base de hidrolizado de cartón sin destoxificar.
Figure 5. Kinetics of *R. glutinis* growth in mineral medium and on cardboard non-detoxified hydrolyzate.

Esta cepa fue seleccionada para continuar con el estudio de crecimiento en medio líquido. Se utilizó el medio en base a glucosa y en base a hidrolizado de cartón. Los resultados se exhiben en la Figura 5.

Se aprecia que el perfil de crecimiento es muy similar en ambos medios, y que se alcanzó una concentración máxima de biomasa muy parecida (7 a 8 g L⁻¹). Resultado que coincide con lo observado en medio sólido, lo que sugiere que *R. glutinis* es tolerante a los compuestos inhibitorios generados durante el proceso de hidrólisis de cartón, e incluso, tal como observó Yu et al. (2011), la producción de biomasa fue ligeramente mayor cuando se utiliza medio en base a hidrolizado sin detoxificar. La misma tendencia se observó respecto a la velocidad de crecimiento la cual fue de 0.46 h⁻¹ en el medio control, mientras que en el medio en base a hidrolizado de cartón fue de 0.51 h⁻¹.

Conclusiones

El cartón como uno de los principales residuos de la industria papelería contiene una cantidad importante de polisacáridos (celulosa y hemicelulosa), la cual constituye una fuente potencial de azúcares fermentables para la generación biotecnológica de productos de interés. La hidrólisis ácida de este residuo, en especial con H₂SO₄, fue un método eficiente para la obtención de azúcares, sin embargo, el incremento en el tiempo de hidrólisis más allá de 120 min provocó la degradación de los carbohidratos y un incremento en la concentración de compuestos fenólicos, inhibidores del crecimiento microbiano. Al aplicar carbón activado al hidrolizar, la concentración de los inhibidores disminuye de manera importante, aunque sucede lo mismo con la concentración de azúcares. La levadura *R. glutinis* creció favorablemente en el hidrolizado de cartón aún sin detoxificar con carbón activado, lo que evidencia su tolerancia a los subproductos de degradación y su potencial para la obtención de aceite microbiano, a partir de esta fuente de carbono.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Contribución por autor

Yolanda González García: diseño del experimento, ejecución, análisis y discusión de resultados; Juan Carlos Meza Contreras: definición de las condiciones de hidrólisis, análisis y discusión de resultados de la hidrólisis química; José Anzaldo Hernández: ejecución de la caracterización de la materia prima; Rubén Sanjuán Dueñas: análisis y discusión de resultados de la caracterización de la materia prima.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado en el marco del proyecto Conacyt-Sener Estudio de fuentes alternativas de lípidos para la producción de biodiesel de tercera generación: aceite microbiano a partir de residuos celulósicos (clave: 152663).

Conclusions

Cardbord, as a major waste of the paper industry, contains a substantial amount of polysaccharides (cellulose and hemicellulose), which is a potential source of fermentable sugars for the biotechnological generation of product source of industrial interest. Acid hydrolysis of this residue, especially with H₂SO₄, was an efficient method for obtaining sugars, however, increased hydrolysis time beyond 120 minutes caused a breakdown of carbohydrates and a raising in the concentration of phenolic compounds, which are microbial growth inhibitors. Applying activated carbon by hydrolyzing the concentration of these inhibitors significantly decreases but so does the concentration of sugars. *R. glutinis* yeast hydrolyzate grew favorably even without detoxify cardboard with activated carbon, which shows its tolerance to degradation byproducts and its potential for microbial oil obtained from this carbon source.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

Contribution by author

Yolanda González García: design of the experiment, execution, analysis and discussion of results; Juan Carlos Meza Contreras: definition of hydrolysis conditions, analysis and discussion of results of the chemical hydrolysis; José Anzaldo Hernández: execution of the characterization of the raw material; Rubén Sanjuán Dueñas: analysis and discussion of results of the characterization of the raw material.

Acknowledgements

This work was performed under the Conacyt-Sener project Study of alternative lipid sources for the production of third generation biodiesel: microbial oil from cellulosic waste (code: 152663).

End of the English version



Referencias

- Aguilar, R., J. A. Ramírez, G. Garrote and M. Vázquez. 2002. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. *Journal of Food Engineering* 55: 309-318.
- Binder, J. B. and R. T. Raines. 2010. Fermentable sugars by chemical hydrolysis of biomass. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:4516-4521.
- Camargo, D., S. D. Gomes, M. G. A. Felipe and L. Sene. 2014. Response of by-products of sunflower seed processing to dilute-acid hydrolysis aiming fermentable sugar production. *Journal of Food Agriculture and Environment* 12 (2): 239-246.
- Chandel, A. K., S. S. da Silva and O. V. Singh. 2013. Detoxification of lignocellulose hydrolysates: Biochemical and metabolic engineering toward white biotechnology. *BioEnergy Research* 6(1): 388-401.
- Chen, X., Z. Li, X. Zhang, F. Hu, D. D. Y. Ryu and J. Bao. 2009. Screening of oleaginous yeast strains tolerant to lignocellulose degradation compounds. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 159: 591-604.
- du Toit, P. J., S. P. Olivier and P. L. van Biljon. 1984. Sugar cane bagasse as a possible source of fermentable carbohydrates. I. Characterization of bagasse with regard to monosaccharide, hemicellulose, and amino acid composition. *Biotechnology and Bioengineering* 26:1071-1078.
- Dubois, M., K. Gilles, J. Hamilton, P. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric method from determination of sugars and related substances. *Nature* 28(3):350-356.
- Escorza, G., J. Martínez, M. Cruz, A. Arcos, F. Caballero e I. Membrillo. 2011. Hidrólisis química y microbiana de cartón para producción de azúcares fermentables. In: Martínez-Jiménez, A., J. G. Saucedo-Castañeda, O. Loera-Corral y M. Trujillo-Roldán (eds.). *Memorias del XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*. Querétaro, Qro., México. pp. 29.
- Fan, Z. and L. R. Lynd. 2007. Conversion of paper sludge to ethanol. I: Impact of feeding frequency and mixing energy characterization. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 30: 27-34.
- Ferrer, J. R., G. Páez, L. Arenas de Moreno, C. Chandler, Z. Mármol y L. Sandoval. 2002. Cinética de la hidrólisis ácida de bagacillo de caña de azúcar. *Revista de la Facultad de Agronomía* 19: 23-33.
- Gao, Q., Z. Cui Z., J. Zhang J. and J. Bao. 2014. Lipid fermentation of corncob residues hydrolysate by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. *Bioresource Technology* 152:552-556.
- Guerfali, M., A. Saidi, A. Gargouri and H. Belghith. 2014. Enhanced enzymatic hydrolysis of waste paper for ethanol production using separate saccharification and fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 175(1):25-42.
- Gupta, R., K. K. Sharma and R. C. Kuhad. 2009. Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora* a wood substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* - NCIM 3498. *Bioresource Technology* 100:1214-1220.
- Huang, C., M. H. Zong, H. Wu and Q. P. Liu. 2009. Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. *Bioresource Technology* 100(19): 4535-4538.
- Kádár, Z., Z. Szengyel and K. Réczey. 2004. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Industrial Crops and Products* 20:103-110.
- Kuloyo, O., J. C. du Preez, M. P. García-Aparicio, S. G. Kilian, L. Steyn and J. Görgens. 2014. *Opuntia ficus-indica* cladodes as feedstock for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(12):3173-3183.
- Kumar, S., S. P. Singh, I. M. Mishr and D. K. Adhikari. 2009. Recent advances in production of bioethanol from lignocellulosic biomass. *Chemical Engineering and Technology* 32(4): 517-526.
- Laopaiboon, P., A. Thani, V. Leelavatcharamas and L. Laopaiboon. 2010. Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. *Bioresource Technology* 101:1036-1043.
- Li, A., B. Antizar-Ladislao and M. Khraisheh. 2007. Bioconversion of municipal solid waste to glucose for bio-ethanol production. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 30:189-196.
- Liang, Y., K. Jarosz, A. T. Wardlow, J. Zhang and Y. Cui. 2014. Lipid production by *Cryptococcus curvatus* on hydrolysates derived from corn fiber and sweet sorghum bagasse following dilute acid pretreatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 173(8):2086-2098.
- Linde, M., E. L. Jakobsson, M. Galbe and G. Zacchi. 2008. Steam pretreatment of dilute H₂SO₄-impregnated wheat straw and SSF with low yeast and enzyme loadings for bioethanol production. *Biomass Bioenergy* 32: 326-332.
- Manugistics. 2005. Statgraphics Plus Ver. 5.1. Manugistics, Inc. Rockville, MA, USA. n/p.
- Mansfield, S. D., C. Mooney and J. N. Saddler. 1999. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnology Progress* 15:804-816.
- Marques, S., L. Alves, J. C. Roseiro and F. M. Girio. 2008. Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF and SSF using *Pichia stipitis*. *Biomass Bioenergy* 32: 400-406.
- Mast, B., N. Zöhrens, F. Schmidl, R. Hernandez, W. T. French, N. Merkt, W. Claupein and S. Graeff-Hönninger. 2014. Lipid production for microbial biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* using hydrolysates of wheat straw and *Miscanthus* as carbon sources. *Waste Biomass Valorization* 5 (6): 955-962.
- Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31:426-428.
- Ming-Jun, Z., Z. Zhi-Sheng and L. Xu-Hui. 2011. Bioconversion of paper sludge with low cellulosic content to ethanol by separate hydrolysis and fermentation. *African Journal of Biotechnology* 10(66):15072-15083.
- Moretti, M. M. S., D. A. Bocchini-Martins, R. D. Silva, A. Rodrigues, L. D. Sette and E. Gomes. 2012. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Biotechnology* 43(3):1062-1071.
- Parajó, J. C., J. L. Alonso and V. Santos. 1995. Kinetics of catalyzed organosolv processing of pine wood. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 34:4333-4542.
- Parajó, J. C., J. L. Alonso and D. Vázquez. 1993. On the behaviour of lignin and hemicelluloses during the acetosolv processing of wood. *Bioresource Technology* 46:233-240.
- Pedersen, M., A. Viksø-Nielsen and A. S. Meyer. 2010. Monosaccharide yields and lignin removal from wheat straw in response to catalyst type and pH during mild thermal pretreatment. *Process Biochemistry* 45:1181-1186.
- Ragauskas, A. J., C. K. Williams, B. H. Davison, G. Britovsek, J. Cairney, C. A. Eckert, W. J. Frederick, J. P. Hallett, D. J. Leak and C. L. Liotta. 2006. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science* 311(5760):484-489.
- Reales-Alfaro, J. G., L. T. Trujillo-Daza, G. Arzuaga-Lindado, H. I. Castañero-Peláez and A. D. Polo-Córdoba. 2013. Acid hydrolysis of water hyacinth to obtain fermentable sugars. *Ciencia Tecnología y Futuro* 5(2): 101-111.
- Saha, B. C. and R. J. Bothast. 1999. Pretreatment and enzymatic saccharification of corn fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 75:65-77.
- Sánchez, O. J. and C. A. Cardona. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology* 99: 5270-5295.
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat). 2012. Compendio de estadísticas ambientales, México. www.semarnat.gob.mx (17 de noviembre de 2014).
- Singleton, V., R. Orthofer and R. Lamuela. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants the means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299:152-178.
- Sun Y. and J. Cheng. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83: 1-11.
- Tao, J., C. C. Dai, Q. Y. Yang, X. Y. Guan and W. L. Shao. 2010. Production of biodiesel with acid hydrolysate of *Populus euramevicana* CV Leaves by *Rhodotorula glutinis*. *International Journal of Green Energy* 7(4): 387-396.

- Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI). 2007. Official Test Methods. TAPPI Press. Atlanta, GA, USA. pp. 1-4, 14-19, 23-29.
- Tsao, G., M. Ladisch, T. Hsu, B. Dale and T. Chou. 1978. Fermentation substrate from cellulosic material: Production of fermentable sugars from cellulosic materials. Annual Reports on Fermentation Processes 2: 1-21.
- Wang, L., R. Templer and R. J. Murphy. 2012. High-solids loading enzymatic hydrolysis of waste papers for biofuel production. Applied Energy. 99: 23-31.
- Wayman, M., S. Chen and K. Doan. 1992. Bioconversion of waste paper to ethanol. Process Biochemistry 27:239-245.
- Wu, C. H., W. C. Chien, H. K. Chou, J. Yang and H. T. Lin. 2014. Sulfuric acid hydrolysis and detoxification of red alga *Pterodactylia capillacea* for bioethanol fermentation with thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. Journal of Microbiology and Biotechnology 24(9): 1245-1253.
- Wyman, C. E., B. E. Dale, R. T. Elander, M. Holtzapple, M. R. Ladisch and Y. Y. Lee. 2005. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. Bioresource Technology 96(18):1959-1966.
- Yang, B. and C. E. Wyman. 2008. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. Biofuels, Bioproducts and Biorefining 2(1):26-40.
- Yáñez, R., J. L. Alonso and J. C. Parajó. 2004. Production of hemicellulosic sugars and glucose from residual corrugated cardboard. Process Biochemistry 39:1543-1551.
- Yáñez, R., J. L. Alonso and J. C. Parajó. 2005. D-lactic acid production from waste cardboard. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 80: 76-84.
- Yen, H. W. and Chang J. T. 2014. Growth of oleaginous *Rhodotorula glutinis* in an internal-loop airlift bioreactor by using lignocellulosic biomass hydrolysate as the carbon source. Journal of Bioscience and Bioengineering. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.10.001.
- Yu, X., Y. Zheng, K. M. Dorgan and S. Chen. 2011. Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. Bioresource Technology 102: 6134-6140.
- Yuan, X., Y. Cao, J. Li, B. Wen, W. Zhu, X. Wang and Z. Cui. 2012. Effect of pretreatment by a microbial consortium on methane production of waste paper and cardboard. Bioresource Technology 118:281-288.
- Zhu, M. J., Z. S. Zhu and X. H. Li. 2011. Bioconversion of paper sludge with low cellulosic content to ethanol by separate hydrolysis and fermentation. African Journal of Biotechnology 10: 15072-15083.

