



UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA
COMISIÓN ORGANIZADORA

**RESOLUCIÓN DE COMISIÓN ORGANIZADORA
N° 659-2017-UNAM**

Moquegua, 06 de Diciembre de 2017

VISTOS, el Informe N° 0397-2017-EPIAM/UNAM/FILIAL ILO de 29 de Noviembre 2017, Oficio N° 469-2017-VIPAC-CO/UNAM de 30 de Noviembre 2017, Informe N° 002-ELFQ-JRT1-UNAM-FILIAL-ILO de 17 de Noviembre 2017, Acuerdo de Sesión Extraordinaria de Comisión Organizadora del 06 de Diciembre 2017, y;

CONSIDERANDO:

Que, el párrafo cuarto del artículo 18° de la Constitución Política del Estado, concordante con el artículo 8° de la Ley N° 30220, Ley Universitaria, reconoce la autonomía universitaria, en el marco normativo, de gobierno, académico, administrativo y económico, que guarda concordancia con los artículos 6°, 7°, 8°, 9° y 10° del Estatuto Universitario;

Que, el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional de Moquegua, aprobado con Resolución de Comisión Organizadora N° 190-2016-UNAM de 05 de Agosto de 2016, establece en el Artículo 12°, que el proyecto de tesis es un trabajo de investigación individual que presentan los estudiantes del último año académico, egresados o bachilleres al Director de la Escuela Profesional, con la finalidad de resolver un problema objeto de estudio, asimismo, precisa en el Artículo 15° que todo proyecto de tesis debe tener un asesor, quien deberá ser docente ordinario de la Escuela Profesional o en forma facultativa un docente contratado en la especialidad en el área que se investiga. El jurado dictaminador del proyecto, será designado por el Comité Asesor y el Director de la Escuela Profesional, el mismo que estará compuesto por tres miembros elegidos entre los docentes ordinarios y/o contratados, conforme se indica en los artículos 18°, 19° y 20° del precitado Reglamento.

Que, mediante Informe N° 0397-2017-EPIAM/UNAM/FILIAL- ILO de 29 de Noviembre 2017, el Director de la Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental, solicita a Vicepresidencia Académica la aprobación del proyecto de tesis denominado: "OBTENCION DE BIOETANOL A PARTIR DE LA MACROALGA *Macrocyctis pyrifera*", presentado por la Bachiller Daysi Elizabeth Butrón Ruiz, el mismo que fue declarado apto según acta de aprobación de proyecto de tesis para optar el título profesional de Ingeniero Ambiental de fecha 13 de Noviembre de 2017, solicitando se emita el acto resolutivo.

Que, con Oficio N° 469-2017-VIPAC-CO/UNAM de 30 de Noviembre 2017, la Dra. María Elena Echevarría Jaime, Vicepresidenta Académica de la Universidad Nacional de Moquegua, solicita al Dr. Washington Zeballos Gámez Presidente de la Comisión Organizadora – UNAM, la emisión de acto resolutivo de reconocimiento de aprobación de proyecto de tesis, así como la designación de asesor y miembros del jurado dictaminador, conforme se precisa en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional de Moquegua.

Que, en Sesión Extraordinaria de Comisión Organizadora del 06 de Diciembre 2017, se acordó por UNANIMIDAD, Aprobar el Proyecto de Tesis en referencia presentado por la Bachiller Daysi Elizabeth Butrón Ruiz, asimismo se acordó designar como Asesor Principal de Tesis al Lic. Mario Román Flores Roque y a los miembros del jurado dictaminador de la Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental encargados de evaluar el trabajo de investigación, conforme a la propuesta remitida.

Por las consideraciones precedentes y en uso de las atribuciones que le concede la Ley Universitaria N° 30220, el Estatuto de la Universidad Nacional de Moquegua y lo acordado en Sesión Extraordinaria de Comisión Organizadora del 06 de Diciembre 2017.

SE RESUELVE:

ARTÍCULO PRIMERO.- APROBAR, el Proyecto de Tesis denominado: "OBTENCION DE BIOETANOL A PARTIR DE LA MACROALGA *Macrocyctis pyrifera*", presentado por la Bachiller DAYSI ELIZABETH BUTRON RUIZ, conforme a lo expuesto a la parte considerativa de la presente resolución.

ARTÍCULO SEGUNDO.- DESIGNAR, al Asesor Principal de Tesis al Lic. Mario Román Flores Roque aprobado en el artículo primero de la presente resolución.





UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA
COMISIÓN ORGANIZADORA

**RESOLUCIÓN DE COMISIÓN ORGANIZADORA
N° 659-2017-UNAM**

ARTÍCULO TERCERO.- DESIGNAR, al Jurado Revisor y Dictaminador del Proyecto de Tesis: "OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE LA MACROALGA *Macrocystis pyrifera*", presentado por la Bachiller, DAYSI ELIZABETH BUTRON RUIZ, conforme al siguiente detalle:

- | | | |
|-------------------------------------|---|-----------------|
| ➤ Dr. EDUARDO LUIS FLORES QUISPE | : | PRESIDENTE |
| ➤ M.Sc. EDGAR CHAPARRO AGUILAR | : | PRIMER MIEMBRO |
| ➤ Ing. RENNE MAURICIO CONDORI APAZA | : | SEGUNDO MIEMBRO |

ARTÍCULO CUARTO.- ENCARGAR, a los profesionales designados el cumplimiento de lo establecido en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional de Moquegua, asimismo, Vicepresidencia Académica deberá adoptar las acciones académicas necesarias, para el cumplimiento de la presente resolución.

Regístrese, Comuníquese, Publíquese y Archívese




DR. WASHINGTON ZEBALLOS GÁMEZ
PRESIDENTE

Presidencia
VIPAC
VIP
EPM
Interesado
Arch. (2)




ABOG. GUILLERMO S. KUONG CORNEJO
SECRETARIO GENERAL

INFORME N° 397- 2017-EPIAM/UNAM/FILIAL ILO



A : DRA. MARÍA ELENA ECHEVARRIA JAIME
VICEPRESIDENTA ACADÉMICA DE LA UNAM

DE : LIC. MARIO ROMÁN FLORES ROQUE
DIRECTOR DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE ING. AMBIENTAL

ASUNTO : SOLICITO APROBACIÓN DE PROYECTO DE TESIS MEDIANTE
ACTO RESOLUTIVO

REFERENCIA : INFORME N°002-ELFQ-JRT1-UNAM-FILIAL ILO-2017

FECHA : Ilo, 29 de Noviembre del 2017

Mediante el presente me dirijo a usted, para saludarla cordialmente y a la vez en atención al documento en referencia, presentado por el Jurado Revisor de Tesis de la candidata al Título Profesional la Srta. **DAYS ELIZABETH BUTRON RUIZ** (Bachiller de la E.P. de Ingeniería Ambiental), donde aprueba por **UNANIMIDAD** el Proyecto de Tesis titulado "**OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE LA MACROALGA *Macrocystis pyrifera***", proyecto que deberá ser ejecutado en un plazo máximo de dos años conforme indica el Reglamento de Grados y Títulos de la UNAM.

Los miembros del **JURADO REVISOR DE TESIS**, están integrados de acuerdo al siguiente detalle:

- | | |
|-------------------------------------|------------------------------|
| ✓ Dr. Eduardo Luis Flores Quispe | PRESIDENTE |
| ✓ M.Sc. Edgar Chaparro Aguilar | PRIMER MIEMBRO DICTAMINADOR |
| ✓ Ing. Renee Mauricio Condori Apaza | SEGUNDO MIEMBRO DICTAMINADOR |
| ✓ Lic. Mario Román Flores Roque | ASESOR |

Por lo cual, se solicita a través de su despacho realice las gestiones necesarias para la **EMISIÓN DE LA RESOLUCIÓN DE APROBACIÓN** del Proyecto de Tesis antes mencionado. Para cuya consecución adjunto los actuados de aprobación del Proyecto de Tesis en Original.

Es todo cuanto remito e informo a usted, para los trámites correspondientes.

Atentamente,



Mario Román Flores Roque
Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental
Director





Universidad Nacional de Moquegua
Vicepresidencia Académica



"Año del Buen Servicio al Ciudadano"

Moquegua, 30 de Noviembre del 2017



OFICIO N° 469 -2017-VIPAC-CO/UNAM

SEÑOR:
Dr. WASHINGTON ZEBALLOS GAMEZ
PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ORGANIZADORA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA
Presente.-

ASUNTO : APROBACION DE PROYECTO DE TESIS, ASESOR, JURADO REVISOR DE TESIS
REFERENCIA : INFORME N° 397-2017-EPIAM/UNAM/FILIAL ILO

Mediante el presente es grato dirigirme a usted, para saludarlo cordialmente y a la vez manifestarle que visto el documento de la referencia, presentado por el Lic. Mario Román Flores Roque Director de la Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental, solicita la emisión de la respectiva resolución según el siguiente detalle:

1.- Aprobar el Proyecto de Tesis "OBTENCION DE BIOETANOL A PARTIR DE LA MACROALGA *Macrocystis pyrifera*", de la Bachiller Daysi Elizabeth Butron Ruiz, se adjunta el Acta de Aprobación del Proyecto de Tesis.

2.- Asesor del Proyecto de Tesis:

- Asesor : Lic. Mario Román Flores Roque

3.- Jurado Revisor de Tesis:

- Presidente : Dr. Eduardo Luis Flores Quispe
- Primer Miembro Dictaminador : M.Sc. Edgar Chaparro Aguilar
- Segundo Miembro Dictaminador : Ing. Renee Mauricio Condori Apaza

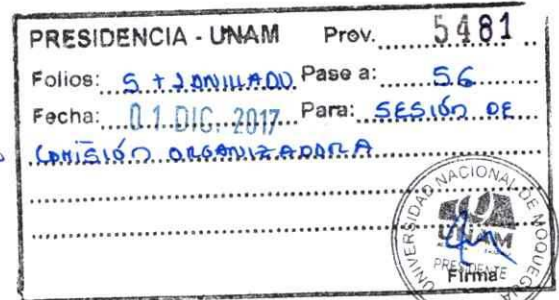
Por lo expuesto, solicito a través de vuestro despacho la aprobación mediante acto resolutivo del Proyecto de Tesis, Asesor y jurado revisor de tesis.

Agradeciendo la atención al presente, hago propicia la ocasión para reiterarle los sentimientos de mi especial consideración y estima personal.

Atentamente,

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

M. Echevarría
Dra. MARÍA ELENA ECHEVARRÍA
VICEPRESIDENTA ACADÉMICA



Adjunto (04) folios + 01 Anillado

MEE/IVIPAC
masm./sec
Cc.: Archivo.

Moquegua, Prolongación Calle Ancash S/N Telefax 053 - 461227

053 - 463514 Anexo (202) 053-461446

www.unam.edu.pe

Vice_presidencia@unam.edu.pe

RECIBIDO :
FECHA :
SE A : Sesión de C.O.



INFORME N°002-ELFQ-JRT1-UNAM-FILIAL ILO-2017

DE: Dr.Sc. Eduardo Luis Flores Quispe

Presidente del jurado revisor de tesis

A: Lic. Mario Román Flores Roque

Director de la Escuela profesional de Ingeniería Ambiental

ASUNTO : Dictamen proyecto de tesis

Fecha : 17 de noviembre del 2017.

Mediante el presente, lo saludo cordialmente y a la vez informo a su despacho, que en reunión de dictamen del proyecto de tesis titulado "Obtención de Bioetanol a partir de la Macroalga *Macrosystis Pyrifera*" presentado por la Bachiller Daysi Elizabeth Butrón Ruiz para optar el título profesional de Ingeniero Ambiental. El jurado revisor conformado por el Presidente Dr. Eduardo Luis Flores Quispe, Primer Miembro Mg.Sc. Edgar Chaparro Aguilar y Segundo Miembro Ing. Renee Mauricio Condori Apaza, por unanimidad declara el proyecto de tesis como APTO para su inscripción y posteriores trámites. Por lo cual adjunto el acta de dictamen respectivo y el proyecto.

Es todo cuanto informo para los fines correspondientes.

Atentamente,



Dr. Sc. Eduardo Luis Flores Quispe

DNI. 41427350



Adjunto: Copia de acta de dictamen y proyecto.

ACTA DE APROBACION DE PROYECTO DE TESIS

En el Auditorium de la Universidad Nacional de Moquegua filial Ilo, siendo las 14:30 horas el día lunes 13 de noviembre del 2017, se reunieron los jurados del proyecto de tesis titulado "Obtención de Bioetanol a partir de la Macroalga *Macrosystis Pyrifera*" presentado por la Bachiller Daysi Elizabeth Butrón Ruiz para optar el título profesional de Ingeniero Ambiental. El jurado revisor conformado por el Presidente Dr. Eduardo Luis Flores Quispe, Primer Miembro Mg.Sc. Edgar Chaparro Aguilar y Segundo Miembro Ing. Renee Mauricio Condori Apaza, procedió a realizar la verificación del levantamiento de observaciones al proyecto de tesis por parte de la ejecutora. Luego el jurado revisor por unanimidad declara el proyecto de tesis como APTO para su inscripción y posteriores trámites. Siendo las 15:00 horas del mismo día se dio finalización a la reunión y de lo cual dan fe los firmantes de la presente acta.



Dr. Sc. Eduardo Luis Flores Quispe

Presidente

Mg.Sc. Edgar Chaparro Aguilar
Primer miembro

Ing. Renee Mauricio Condori Apaza

Segundo Miembro

ACTA DE APROBACION DE PROYECTO DE TESIS

En el Auditorium de la Universidad Nacional de Moquegua filial Ilo, siendo las 14:30 horas el día lunes 13 de noviembre del 2017, se reunieron los jurados del proyecto de tesis titulado "Obtención de Bioetanol a partir de la Macroalga *Macrosystis Pyrifera*" presentado por la Bachiller Daysi Elizabeth Butrón Ruiz para optar el título profesional de Ingeniero Ambiental. El jurado revisor conformado por el Presidente Dr. Eduardo Luis Flores Quispe, Primer Miembro Mg.Sc. Edgar Chaparro Aguilar y Segundo Miembro Ing. Renee Mauricio Condori Apaza, procedió a realizar la verificación del levantamiento de observaciones al proyecto de tesis por parte de la ejecutora. Luego el jurado revisor por unanimidad declara el proyecto de tesis como APTO para su inscripción y posteriores trámites. Siendo las 15:00 horas del mismo día se dio finalización a la reunión y de lo cual dan fe los firmantes de la presente acta.



Dr. Sc. Eduardo Luis Flores Quispe

Presidente

Mg.Sc. Edgar Chaparro Aguilar

Primer miembro

Ing. Renee Mauricio Condori Apaza

Segundo Miembro

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AMBIENTAL



PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE LA
MACROALGA *Macrocystis pyrifera*

PRESENTADO POR:

DAYSI ELIZABETH BUTRON RUIZ

Para optar el título profesional de:

INGENIERO AMBIENTAL

ILO - PERÚ

2017

INDICE

	Pag.
I. DATOS GENERALES	1
1.1. TITULO	1
1.2. AUTOR	1
1.3. ASESOR	1
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
2.1. <i>Descripción de la Realidad Problemática</i>	1
2.2. Formulación del problema	2
2.2.1. Formulación del problema General	3
2.2.2. Formulación del problema Especifico	3
III. JUSTIFICACION	3
IV. OBJETIVOS	4
4.1. OBJETIVO GENERAL	4
4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	4
V. MARCO TEORICO O ESTADO DEL ARTE	5
5.1. Antecedentes	5
5.2. Bioetanol como combustible	8
5.3. Bioetanol a partir de algas	9
5.4. Cultivo de macroalgas como fuente de biocombustibles	11
5.5. Macroalgas en el Sur del Perú	12
5.5.1. <i>Macrocystis pyrifera</i>	12
5.6. Experiencias de cultivo de <i>Macrocystis pyrifera</i> en el Perú	14
5.7. Tratamiento de macroalgas	16
5.8. Pretratamiento con ácido diluido	16
5.9. Sacarificación o hidrolisis enzimática	17
5.10. Fermentación	18
5.11. Estrategias de Sacarificación	19
5.11.1. Sacarificación y Fermentación Separadas (SHF)	19
5.11.2. Sacarificación y Fermentación Simultaneas (SSF)	20
5.12. Bioetanol a partir de Macroalgas y su Aspecto Ambiental	21
5.12.1. El Bioetanol y sus beneficios sobre el medio ambiente	21
5.12.2. El Bioetanol y el efecto invernadero	22
5.12.3. El Bioetanol y la salud Humana	22
5.13. Marco Conceptual	23
VI. HIPOTESIS	24

6.1.	Hipótesis General	24
6.2.	Hipótesis Especificas	24
VII.	VARIABLES DE ESTUDIO	24
7.1.	Variables Independiente	24
7.2.	Variables Dependientes	24
VIII.	MATRIZ DE CONSISTENCIA	25
IX.	METODOLOGIA Y MATERIALES DE INVESTIGACION	26
9.1.	Tipo de Investigación	26
9.2.	Desarrollo Metodológico	26
9.2.1.	Metodología general	26
9.2.2.	Procedimiento	26
9.2.3.	Obtención de macroalgas	27
9.2.4.	Secado y obtención de la humedad de la macroalga	27
9.2.5.	Análisis de muestras	28
9.2.6.	Técnica de recolección de datos	28
9.2.6.1.	Pretratamiento mediante hidrolisis acida	28
9.2.6.2.	Hidrolisis enzimática o sacarificación	29
9.2.6.3.	Fermentación separada (SHF)	29
9.2.6.4.	Fermentación simultanea (SSF)	30
9.2.7.	Número de Pruebas	30
9.2.8.	Análisis de Datos	31
9.3.	Equipos Materiales y Reactivos	33
9.3.1.	Equipos	33
9.3.2.	Materiales	33
9.3.2.1.	Materia prima	33
9.3.2.2.	Enzimas	34
9.3.2.3.	Microorganismo fermentador	34
9.3.2.4.	Productos químicos diversos	34
9.3.2.5.	Programa	34
X.	AMBITO DE ESTUDIO	34
XI.	CRONGRAMA DE ACTIVIDADES	34
XII.	PRESUPUESTO	36
XIII.	BIBLIOGRAFIA CITADA	37
XIV.	ANEXOS	40

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: MATRIZ DE CONSISTENCIA.....	26
Cuadro 2: Determinación de pretratamiento hidrólisis ácida	32
Cuadro 3: Determinación de la hidrólisis enzimática y fermentación.....	32
Cuadro 4: Cronograma de actividades del proyecto de investigación.....	35
Cuadro 5: Presupuesto del proyecto de investigación	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: La producción de biomasa en las algas laminarias y los potenciales usos de sus compuestos orgánicos para la obtención de biocarburantes y otros productos de valor comercial	09
Figura 2: Macroalgas comerciales en el Perú	13
Figura 3: Beneficios de la macroalga <i>Macrocystis pyrifera</i>	14
Figura 4: Esquema de Estrategia (SHF)	20
Figura 5: Esquema de Estrategia (SSF)	21

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Protocolo de WARGACKY.....	40
Anexo 2: Diagrama de Flujo de las etapas de producción de etanol a partir de algas	45

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Alginato: Sustancia química elaborada a partir de algas pardas que por sus características de gel tiene diversas aplicaciones industriales

Biocarburentes: mezcla de sustancias orgánicas que se utiliza como combustible en los motores de combustión interna.

Ficocoloides: Sustancia coloidal obtenida de las paredes celulares de las algas.

Lenga: Árbol de hoja caduca y alcanza un promedio de 30 metros de altura.

Oleaginosas: Son vegetales que poseen aceites y grasas que pueden ser extraídas a través de procesos adecuados

Pretratamiento: separación de partículas de gran tamaño.

Transesterificación: proceso de intercambiar el grupo alcoxi de un alcohol.

LISTA DE ABREVIATURAS

SHF SACARIFICACION Y FERMENTACION SEPARADA

SSF SACARIFICACION Y FERMENTACION SIMULTANEA

LI LIQUIDOS IONICOS

HPB HONGOS DE PUDRICCION BLANCA

HPLC CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS

I. DATOS GENERALES:

1.1 TITULO

OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE LA MACROALGA *Macrocystis pyrifera*.

1.2 AUTOR

Bachiller en Ingeniería Ambiental Daysi Elizabeth Butrón Ruiz

1.3 ASESOR

Asesor : Lic. Mario Román Flores Roque.

Co asesor : Blga. Isabel del Carme Espinoza Reynoso.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

2.1 Descripción de la Realidad Problemática:

En los últimos años el uso y consumo de combustibles de origen fósil con lleva una serie de impactos estratégicos como la fuerte dependencia en los países no productores, económicos una crisis relacionadas con el petróleo, y ambientales las emisiones de dióxido de carbono que han motivado la búsqueda de otras fuentes alternativas para los carburantes derivados del petróleo. Haciendo uso de las energías renovables o la generación de los biocombustibles constituyen una alternativa renovable frente a la gasolina y diésel. Los biocarbures líquidos (bioetanol y biodiésel) y el biogás son los biocarbures más extendidos para el transporte, y su

uso tiene importantes beneficios ambientales, estratégicos y económicos. Desde un punto de vista ambiental, el uso de biocombustibles tiene como ventaja frente a los carburantes de origen fósil que el balance entre la cantidad de dióxido de carbono (CO₂) producido durante su combustión y el consumido por los procesos fotosintéticos de los vegetales es neutro, lo que ayuda a mitigar la producción de gases de efecto invernadero, responsables del cambio climático.

Es por ello que con el presente proyecto de investigación, pretende estudiar las condiciones para la obtención de la bioetanol a partir de la macroalga marina *Macrocystis pyrifera* para uso como biocombustible, es importante señalar que en la Región de Moquegua existen experiencias de cultivo de *Macrocystis pyrifera*, que se ha desarrollado con gran éxito a cargo del Gobierno Regional de Moquegua y que Actualmente el laboratorio costero de Ilo del IMARPE, está desarrollando cultivos entre otras de la *Macrocystis pyrifera*.

2.2 Formulación del Problema:

Considerando el crecimiento poblacional, el incremento de la demanda energética, la dependencia a los combustibles fósiles, particularmente del petróleo, y principalmente las políticas de estado que buscan diversificar la matriz energética, aprovechando recursos de las distintas regiones del país, en la costa del sur del país crece y existen experiencias de cultivo de macroalgas, específicamente en la provincia de Ilo se desarrolló el cultivo de *Macrocystis pyrifera* a cargo del Gobierno Regional de Moquegua. Es por ello que resulta atractivo el desarrollo de Energía Renovable.

Las macroalgas como fuente de biocombustibles presentan importantes ventajas respecto a otras materias primas: tienen un mayor crecimiento que las plantas agrícolas empleadas hasta ahora, además de que su empleo no compromete la producción de alimentos básicos u otros productos derivados de las cosechas, y su

cultivo a gran escala es factible, rentable y no ocupa tierras ni requiere aporte de agua dulce.

Es por ello que no posee el problema de la discusión de combustibles de primera o segunda generación, ya que no compite por comida o combustible, y el hecho de cultivar macroalgas, no aumenta el precio de los alimentos.

2.2.1 Formulación del Problema General:

¿Se obtendrá Bioetanol a través del proceso de fermentación de la macroalga *Macrocystis pyrifera*?

2.2.2 Formulación de Problema Específicos:

El presente trabajo de investigación se plantea las siguientes interrogantes específicas:

- ¿Con aplicación de la hidrólisis acida a la macroalga *Macrocystis pyrifera* dará mejor resultado para el pretratamiento?
- ¿Qué estrategia de Sacarificación y fermentación es la más recomendable para este proyecto de investigación?
- ¿Qué es lo que determina que se logre el producto?

III. JUSTIFICACIÓN:

El trabajo de investigación a realizarse con las macroalgas como fuente de biocombustibles contribuiría a disminuir las emisiones de CO₂ en la atmosfera la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero y las necesidades de petróleo en comparación con la gasolina, ya que presentan importantes ventajas respecto a otras materias primas: tienen un mayor crecimiento que las plantas agrícolas empleadas hasta ahora, además de que su empleo no compromete la producción de alimentos básicos u otros productos derivados de las cosechas, y su cultivo a gran escala es factible, rentable y no ocupa tierras ni requiere aporte de agua dulce.

Los resultados del presente proyecto de investigación aportaran conocimientos científicos a cerca de las condiciones necesarias para la obtención de bioetanol a partir de *Macrocystis pyrifera*, para uso como biocombustible como fuente alternativa a la caña de azúcar, maíz.

Las algas tienen un potencial energético que puede llegar a ser 30 veces mayor que el de los cultivos energéticos en tierra, ya que absorben más energía solar y se reproducen más rápido, en comparación con los cultivos de plantas de cualquier tipo. A partir de algas se puede producir etanol y diesel, ya sea por la fermentación de los azúcares de macroalgas, o bien por la transesterificación de los ésteres de microalgas, respectivamente.

IV. OBJETIVOS:

4.1 Objetivo General:

- Obtener bioetanol a partir de la transformación de la macroalga *Macrocystis pyrifera*.

4.2 Objetivos Específicos:

- Aplicar la hidrolisis acida adecuada, como pretratamiento para la macroalga *Macrocystis pyrifera*.
- Realizar la fermentación con la hidrolisis obtenida, mediante el proceso de sacarificación de la Macroalga *Macrocystis pyrifera*
- Demostrar el rendimiento del producto bioetanol.

V. MARCO TEÓRICO O ESTADO DEL ARTE:

5.1 Antecedentes:

(Montiel, 2010) En el presente estudio se discuten las ventajas que tienen las algas con respecto a otros insumos para la producción de estos biocombustibles. Los bioenergéticos impactan: En lo económico.- Reduciendo costos y mejorando la calidad en productos, dando independencia energética y mejorando la competitividad. En lo ambiental.- Reduciendo las emisiones de gases y creando productos reciclables y biodegradables. La producción de bioenergéticos a escala comercial puede ser factible en México y en Sinaloa, cuando se realicen aspectos técnicos, económicos y medioambientales y de concertación con los sectores agrario y agroindustrial Para la producción de biodiesel se recomiendan: *Jatropha*, algas, salicornia, moringa, palma de aceite, higuerrilla y aceite usado. Para la producción de bioetanol: algas, sorgo dulce, residuos agrícolas y municipales, pasto gigante y maguey y para producir hidrógeno: algas nativas del Estado de Sinaloa.

El presente trabajo según (Awad, 2011) consistió en estudiar la estrategia de sacarificación y fermentación simultánea (SSF) para residuos forestales (eucalipto y lenga) que fueron pretratados mediante estrategias alternativas: líquidos iónicos (LI) reciclados y hongos de pudrición blanca (HPB). Sin embargo a largo plazo se logra mejores niveles de II productividad para la estrategia de sacarificación y fermentación simultánea si se aplica un pretratamiento con hongos de pudrición blanca a 30 días. En conclusión, el uso de pretratamientos alternativos como líquidos iónicos reciclados y hongos de pudrición blanca, son factibles para la producción de bioetanol de segunda generación, por lo tanto se debería continuar con la investigación.

(Mujeriego & Ponce, 2011). El uso de las algas es óptimo, ya que se componen de organismos acuáticos que capturan luz solar y el dióxido de carbono para hacer la foto-síntesis y así producir su energía, y además producir aceites vegetales que se pueden transformar en biodiesel. El rendimiento en producción de biodiesel con algas es unas 300 veces superior al que se alcanza con soja y unas 25 veces al que se consigue con palma. A ello hay que añadir el tiempo record de crecimiento de las algas que es solo de unos pocos días lo que contrasta con los tiempos de crecimiento mucho más largos de las plantas oleoginosas.

(Meers Diaz; Herrera Escobar., 2013). En este trabajo fueron diseñadas las etapas de hidrólisis y fermentación para producir bioetanol a partir de almidón de yuca amarga, basándose en la respuesta dinámica del sistema, con el fin de obtener un proceso continuo estable y con alto rendimiento de producto. En el estudio, se implementaron modelos cinéticos complejos de estructura matemática no lineal que permitieron verificar fenómenos de inestabilidad que propiciaron bajo rendimiento de producto. Se obtuvo un diseño integral al incluir un análisis coherente de la respuesta dinámica del sistema para cada una de las etapas. Este diseño aporta a la solución de problemas que se presentan actualmente en las plantas industriales de producción de alcohol carburante, relacionados a caídas de rendimiento inesperadas que se atribuyen a la inestabilidad del sistema.

Según (Cho, Kim, & Kim, 2013) la hidrólisis ácida térmica para la fermentación con hidrolizado pretratado se llevó a cabo en matraz Erlenmeyer de 250 ml con un volumen de trabajo de 100 ml. La suspensión de algas marinas pretratado por hidrólisis ácida térmica en condiciones óptimas se neutralizó a pH 7 por NaOH. La hidrólisis de ácido térmico se evaluó sobre la base de los efectos de tres factores: concentración de ácido, tiempo de tratamiento y contenido de sólidos como variables para la degradación de carbohidratos en *U. pinnatifida*.

(Harun, 2014) En el presente trabajo se han realizado esfuerzos significativos de investigación en la utilización de algas biomasa como materia prima para la producción de bioetanol. Si bien el proceso general puede variar, la conversión de biomasa a bioetanol contiene usualmente las siguientes etapas: (I) pretratamiento; (II) sacarificación; (III) fermentación; y (IV) producto recuperación. Las algas ofrecen una opción interesante y a diferencia de otras biomásas como la hierba de trigo y el bagazo, no contienen lignina, por lo tanto la eliminación de la lignina es innecesaria. La eliminación de la lignina es en realidad un paso limitante de las materias primas, por lo tanto su ausencia reduce los costos, tiempo, y la dificultad del proceso de conversión. El fermentativo rendimiento de la producción de bioetanol depende de las condiciones de pretratamiento y sacarificación de la biomasa de algas. Bajo condiciones optimizadas de pretratamiento y sacarificación, carbohidratos unidos a la pared celular accesible para la hidrólisis y posteriormente se convierten en azúcares fermentables solubles simples por sacarificación.

(Li, Liu, & Liu, 2014) La producción de bioetanol a partir de algas requiere cuatro operaciones de unidad principal incluyendo pretratamiento, hidrólisis, fermentación y destilación. Con el fin de producir azúcares de la biomasa de algas, pretratamiento está diseñado para ayudar a separar la celulosa, hemicelulosa y lignina para que el complejo carbohidrato moléculas en la célula de las algas puede ser hidrólisis catalizada por enzimas (adición de agua) en su azúcar simple constituyente. Entonces los azúcares fermentables pueden ser fermentados en etanol por productores de etanol microorganismos y finalmente recuperar y purificar el etanol para cumplir con las especificaciones de combustible.

Este proyecto según (Nain, 2015) consistió, principalmente, en dos etapas: en la primera se realizaron fermentaciones aeróbicas con reactivos puros en distintas razones de alginato-manitol, de modo de simular la composición de carbohidratos presentes en las macroalgas pardas. Con estos cultivos se calculó y evaluó la velocidad

de crecimiento y los rendimientos de biomasa y de producto, con la finalidad de determinar condiciones óptimas para fermentar. En una segunda etapa, realizaron fermentaciones micro-aeróbicas mediante un diseño experimental estadístico, para evaluar, principalmente, la producción de etanol. No se obtuvieron resultados favorables en esta condición, por lo que procedió a fermentar *Macrocystis pyrifera* en condiciones aeróbicas, con el objeto de verificar si los resultados con reactivos puros era reproducible al fermentar algas. El etanol se produce por la fermentación de los azúcares contenidos en la materia orgánica de las plantas. De este proceso se obtiene el alcohol húmedo, con un contenido aproximado del 5% de agua, que tras ser secado se puede utilizar como combustible.

Según (Camus & Ballerino., 2016) el pretratamiento y fermentación de *Macrocystis pyrifera* a escala piloto Lixiviación de ácidos Antes de la fermentación, se realizaron tres pretratamientos: lixiviación ácida para eliminar grandes cantidades de cloruro de potasio; despolimerización para digerir enzimáticamente el alginato; y sacarificación para degradar oligoalginato. Se mezclaron 100 kg de algas molidas y 200 l de HCl al 0,3% en un reactor agitado a 25 ° C, 200 rpm durante 1 h. Una vez completado, el líquido se drenó. Se determinó la concentración de manitol en solución por HPLC (información de soporte). La solución definitiva se almacenó hasta la etapa de fermentación.

5.2 Bioetanol como combustible:

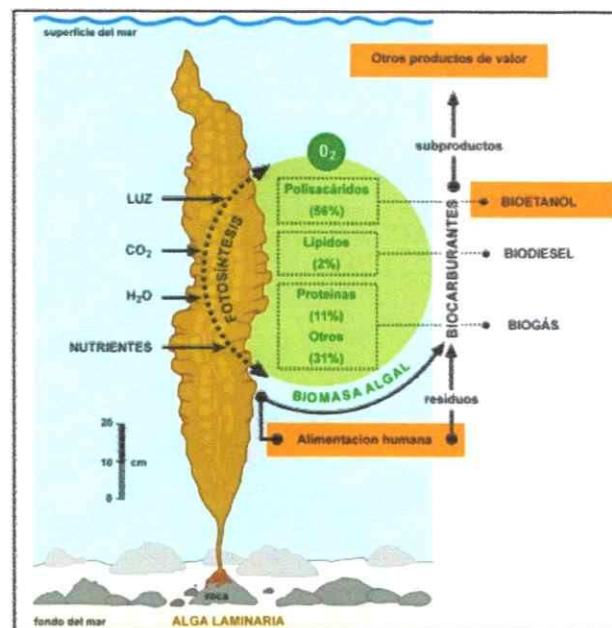
(Briones Parra G. , 2012, pág. 11) Afirma. “El Bioetanol, es el producto que identifica al etanol o alcohol etílico. Este compuesto, como biocombustible, puede ser usado solo o bien como una mezcla con gasolina en diferentes proporciones. El empleo del bioetanol puro debe realizarse en motores específicamente diseñados para ello. Sin embargo, el uso de mezclas en proporciones bajas no requeriría de cambios en los vehículos, siempre y cuando el bioetanol debe ser deshidratado (anhidro) a fin

de eliminar los efectos indeseables sobre la mezcla, producidos por el agua (separación de fases gasolina– etanol/agua)”.

5.3 Bioetanol a partir de algas:

(Peteiro, 2013), La biomasa de las macroalgas marinas contiene polisacáridos (compuestos ricos en azúcares), lípidos y proteínas, entre otros componentes orgánicos, que se pueden utilizar para producir diferentes biocarburantes: El bioetanol, a partir de la fermentación alcohólica (en ausencia de oxígeno o en anaerobiosis) de los polisacáridos; El biodiésel derivado de los lípidos mediante un proceso químico conocido como transesterificación, y El biogás producido por una digestión o descomposición de los compuestos orgánicos de la biomasa.

Figura 1: La producción de biomasa en las algas laminarias y los potenciales usos de sus compuestos orgánicos para la obtención de biocarburantes y otros productos de valor comercial.



Fuente: César Peteiro, El cultivo de macroalgas marinas como una fuente renovable. 2013.

(García, 2013), La producción de bioetanol es la que tiene actualmente un mayor interés por el alto contenido de polisacáridos en las macroalgas marinas y particularmente en las laminarias, algas pardas que se caracterizan por presentar un mayor tamaño, con un talo o fronde de varios metros de longitud. Además, la biomasa residual de la generación de bioetanol puede ser aprovechada para producir biogás u otros productos de valor comercial como fertilizantes, forraje para alimentación animal y compuestos de aplicación industrial, entre otros. En los últimos años son numerosas las investigaciones que se han realizado para el desarrollo de la producción de bioetanol mediante la fermentación de los polisacáridos de las macroalgas, especialmente a partir de las algas laminarias. En estas grandes algas pardas los polisacáridos suponen aproximadamente el 60% de su peso seco, aunque se requiere previamente su transformación en azúcares sencillos para su fermentación en bioetanol. Este proceso es conocido como sacarificación y consiste en la hidrólisis o rotura de los polisacáridos mediante tratamientos químicos. En la hidrólisis de los polisacáridos se aplican sobre todo tratamientos enzimáticos.

(Wargacki, 2012). La fermentación de los azúcares resultantes se utiliza diferentes microorganismos como levaduras y bacterias. Recientemente se han llevado a cabo investigaciones con el objeto de disponer de microorganismos más eficientes para la conversión directa de los polisacáridos macroalgales en bioetanol. Así, científicos del Bio Architecture Lab en Estados Unidos han conseguido modificar genéticamente la bacteria *Escherichia coli* para la hidrólisis y fermentación simultánea de polisacáridos de laminarias. De esta manera se ha logrado un rendimiento de 0,3 gramos de etanol por cada gramo (peso seco) del alga, que representa aproximadamente el 80% de los polisacáridos de las laminarias. En la actualidad, estos avances tecnológicos para producir bioetanol y otros productos a partir de las algas laminarias se está ensayando a escala comercial.

5.4 Cultivo de macroalgas como fuente de Biocombustibles

(Tasende & Peteiro, 2015) Para el éxito de la producción de bioetanol a partir de algas laminarias es necesario un suministro sostenible de biomasa que permita su aplicación industrial como fuente de biocarburantes. Aunque los recursos naturales de las laminarias son limitados, particularmente en la costa atlántica española, su cultivo a gran escala es viable mediante técnicas sencillas y de bajo coste. La acuicultura marina o maricultura de macroalgas, definida como una agronomía marina, tiene una gran relevancia en Japón, China y Corea del Sur donde, por ejemplo, especies de laminarias conocidas con el nombre comercial de “kombu” se cultivan comercialmente. Actualmente, la agronomía marina de laminarias en Asia produce unas 8 millones de toneladas al año, mientras que en Europa y América se está empezado a cultivar de manera experimental o en pequeña escala.

(Tasende & Peteiro, 2015) El cultivo de laminarias tendría importantes beneficios ambientales ya que las macroalgas para su crecimiento utilizan dióxido de carbono, nitrógeno y fósforo mediante la fotosíntesis, de modo que contribuyen a reducir el carbono atmosférico y los residuos inorgánicos del medio marino. Particularmente, el uso de los cultivos de macroalgas es de gran interés para el desarrollo de una acuicultura sostenible al absorber parte de residuos orgánicos e inorgánicos que produce el cultivo de peces y moluscos. Esta asociación de organismos con diferentes niveles tróficos o nutricionales constituye un sistema de policultivo integrado, conocido como acuicultura multitrófica integrada. Una propuesta de esta acuicultura ambientalmente sostenible sería el cultivo de laminarias en las rías gallegas conjuntamente con las bateas de mejillón y jaulas de peces que existen en la actualidad. Las laminarias que habitan en nuestras costas atlánticas son actualmente utilizadas principalmente para alimentación humana y en otras aplicaciones como fertilizante y forraje para la acuicultura de herbívoros como el erizo de mar y la oreja de mar. Sus múltiples usos y potenciales aplicaciones se espera que se integren en bio-refinerías desarrolladas principalmente a partir de su cultivo en el mar. El concepto de bio-refinería de laminarias es análogo a la de una refinería de petróleo que

produce combustibles y múltiples productos a partir del petróleo. Así, por ejemplo, los residuos que se producen durante el procesado de la laminarias para consumo humano (hasta un 40% de su biomasa) se emplearían para producir biocarburantes o como fertilizante, forraje u otros usos.

5.5 Macroalgas comerciales en el sur del Perú:

(Beatriz, Raúl, José, Ruslan, Vicente, & Jesús., 2011-2015) Las algas marinas que principalmente se extraen y comercializan en el sur del Perú pertenecen a los géneros *Lessonia* y *Macrocystis*, ambas representantes del grupo de algas pardas, y productoras de ficocoloides conocidos como alginatos. En la zona sur del litoral peruano se encuentran tres especies de algas pardas: *Macrocystis pyrifera*, "sargazos" *Lessonia trabeculata* ("aracanto", "palo") y *Lessonia nigrescens* ("aracanto", "negra"), que forman bosques y cinturones densos de regular extensión en el inter y submareal.

5.5.1 *Macrocystis pyrifera*

Nombre científico: *Macrocystis pyrifera*

Nombre común: Huiro, sargazo, boyador.

Clase: *Phaeophyceae*

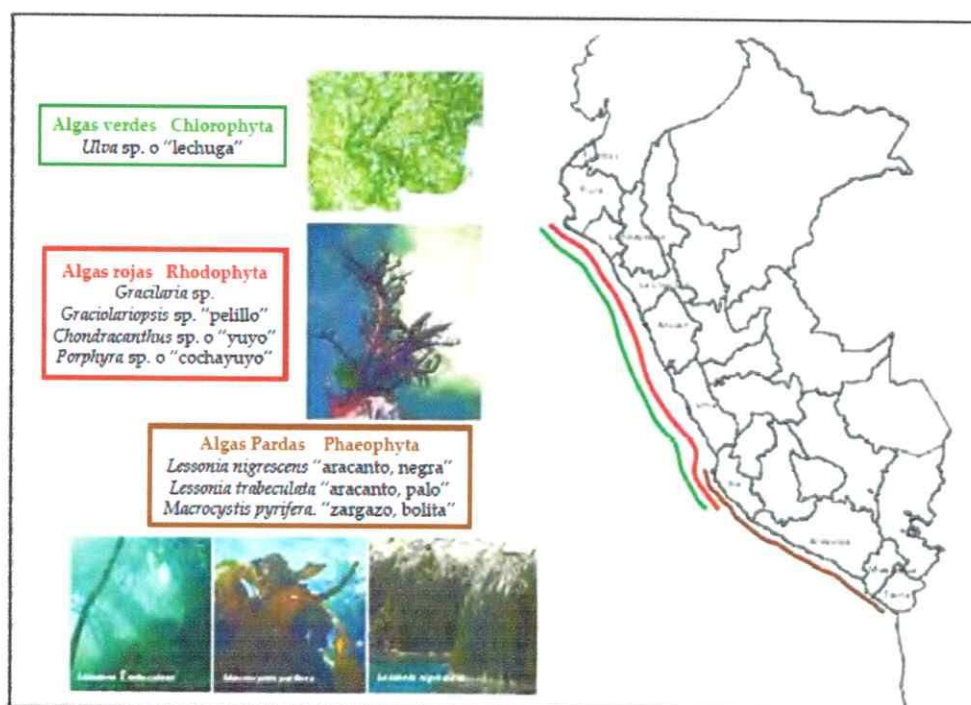
Orden: Laminariales

Familia: Laminariaceae

Género: *Macrocystis*

Especie: *M. pyrifera*

Figura 2: Macroalgas Comerciales en el Perú.




Fuente: IMARPE, 2012.

Son plantas erectas de gran tamaño de color pardo amarillento, crecen sobre sustratos duros, rocas y forman bosques submarinos, su tamaño puede alcanzar hasta 45 m. Se adhieren firmemente al sustrato por un disco basal de fijación macizo, de sus márgenes emergen numerosos hapterios ramificados, los cuales son parecidos a raíces. Del disco basal nacen los estipes, erectos y cilíndricos y se ramifican unilateralmente, a intervalos regulares, presentan flotadores en la base de las frondas. Las frondas son equivalentes a hojas, son largas y angostas de superficie rugosa y márgenes levemente dentados. Distribución geográfica: Se encuentra en el Hemisferio Sur, en las costas de todo Chile desde el Norte de Perú hasta la Patagonia, también se encuentra en Sudáfrica, sur de Australia y la Costa Atlántica, en el Hemisferio Norte, se distribuye desde Baja California hasta Alaska. La pesquería de *Macrocystis pyrifera* forma parte de la llamada pesquería de algas pardas que también incluye a los recursos *Lessonia nigrescens* (huero negro) y *Lessonia trabeculata* (huero palo). La extracción y recolección de estas algas en la zona sur del país, es efectuada exclusivamente por pescadores artesanales y recolectores (as)

de orilla. Importancia comercial: Especie utilizada para la extracción de alginatos y como alimento para abalones en cultivo. (Ortiz, 2011).

Figura 3: Beneficios de la macroalga *Macrocystis pyrifera*

ABUNDANTE		ESCALABLE
<ul style="list-style-type: none"> • Biomasa conocida y estudiada. • Biomasa perenne. • Una de las plantas de más rápido crecimiento en la tierra. • Disponibilidad en todo el mundo. 		<ul style="list-style-type: none"> • Significativa costa para cultivos potenciales. • Existencia de granjas comerciales a gran escala en Asia. • Cadena de abastecimiento probada.
MEDIO AMBIENTE		BAJO COSTO
<ul style="list-style-type: none"> • No compete por el uso de tierras para alimentos. • No requiere agua fresca. • Beneficiosa para los océanos • Baja huella de carbono 		<ul style="list-style-type: none"> • Alto contenido de azúcar. • No posee lignina que degradar. • Costo competitivo con las otras fuentes de azúcar. • Oportunidades en diversos productos.

Fuente: Ortiz. Composición Nutricional y Funcional de Algas Pardas. 2011.

5.6 Experiencia de cultivos de macroalga *Macrocystis pyrifera* en el Perú.

(Imarpe, 2011-2015), En el 2012; se desarrolló el proyecto "Fortalecimiento de la Pesquería del Recurso Macroalgas en la provincia de Ilo, Región Moquegua" gestionado por el Gobierno Regional de Moquegua y ejecutado en otras en el Laboratorio Costero de Ilo del Instituto del Mar del Perú; realizando actividades tales como:

- Reconocimiento de la zona de cultivo, tramites de solicitud de área acuícola, adquisición y transporte de primarios.

- Capacitación de pescadores artesanales y profesionales
- Equipamiento mínimo necesario, siembra de primarios, mantenimiento de sistemas y cosecha.
- Transferencia tecnológica a través de un consultor y pasantías dirigidas a pescadores y profesionales.

Producto de esta experiencia; se obtuvo como resultado la producción de 100 metros de cuerda inoculada con esporofitos jóvenes de *Macrocystis pyrifera* de hasta 1 cm de longitud con un promedio de 5 individuos por cm de cuerda para su aclimatación en nursery.

(InnovatePeru, 2016), En el año 2016, el proyecto "PRODUCCIÓN DE SEMILLAS Y CULTIVO EN SISTEMA SUSPENDIDO DE MACROALGAS DE INTERÉS COMERCIAL EN LITORAL MARINO DE ILO - MOQUEGUA", desarrollado por profesionales del Laboratorio Costero de Ilo de IMARPE, fue aprobado en el Concurso de Investigación Aplicada y Desarrollo Tecnológico en Problemas de Interés Público. Este concurso es convocado por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad del Ministerio de la Producción (INNOVATE). La convocatoria se desarrolló a nivel nacional y está orientado a los problemas específicos en los sectores acuícola y forestal cuyas soluciones demandan proyectos de investigación aplicada y/o desarrollo tecnológico, orientados a corto plazo en su aplicación. El propósito del proyecto es producir semillas (plántulas) de macroalgas de interés comercial en 1ra fase de hatchery (laboratorio) y desarrollar su cultivo en medio natural (zona marina) para replicar las técnicas por pescadores y productores acuícolas. En la zona sur del litoral peruano se encuentran tres especies de macroalgas pardas: *Macrocystis pyrifera*, "sargazos" *Lessonia trabeculata* ("aracanto", "palo") y *Lessonia nigrescens* ("aracanto", "negra") usadas como alimento, cosméticos y fertilizantes, además para extraer espesantes o utilizarse como aditivo para piensos.

5.7 Tratamiento de macroalgas:

(Briones Parra G. , 2012) La celulosa de las algas es un producto para ser aprovechado como materia prima en la fabricación de bioetanol. El paso crítico en su conversión a etanol implica la degradación de los polisacáridos a azúcares fermentables en un proceso denominado sacarificación. Los estudios se han enfocado en desarrollar pretratamientos de la biomasa con el fin de que esta sacarificación sea más fácil y de esta forma lograr un mayor rendimiento en el proceso.

(Awad, 2011) El objetivo principal del pretratamiento es disminuir el grado de cristalinidad de la malla de polisacáridos que conforma la pared celular y de esta forma hacerlos más susceptibles para la sacarificación. Existen muchos tipos de pretratamiento para biomasa lignocelulósica tales como los físicos (molienda), físico-químicos (explosión de vapor, agua líquida caliente y explosión de fibra de amoníaco), químicos (hidrólisis Ácida, alcalinidad, agentes oxidantes, oxidación húmeda, ozonólisis, Líquido Iónico) y biológicos (uso de Hongos). Algunos de estos han sido aplicados en macroalgas.

5.8 Pretratamiento con ácido diluido:

(Taherzadeh & Karimi, 2007) El pretratamiento más usado es el de hidrólisis ácida, que consiste en tratar la biomasa con ácido sulfúrico diluido a una concentración y una temperatura determinada. Este método permite desorganizar la estructura cristalina que posee las macro y microfibras de una pared celular y de esta forma liberar los polímeros de celulosa y/o modificar los poros del material de tal forma que permita a las enzimas penetrar dentro de las fibras y hacerlas susceptibles a la hidrólisis enzimática. Este tipo de pretratamientos se aplica a todo tipo de biomasa que posee una capa de lignina que se encarga de recubrir la estructura cristalina de celulosa y hemicelulosa. En general, los pretratamientos clásicos implican el uso de soluciones de ácido sulfúrico diluido, usualmente al 5 % con rendimientos del 100 % a 160 °C, o concentrado, al 77 % a más baja temperatura.

(Harun, 2014) Durante el uso de este tipo de pretratamientos, además de la hidrólisis ocurren algunas reacciones de condensación y eliminación, en donde las azúcares de la hemicelulosa generan furfurales y derivados de furfural en presencia de ácido en caliente, que son sustancias tóxicas para las levaduras.

(Briones Parra G. A., 2012) El pretratamiento incluso pueden provocar la inhibición de las enzimas que llevan a cabo la sacarificación, por lo que es importante verificar las condiciones óptimas de pretratamiento para que se pueda asegurar un rendimiento aceptable en la generación de etanol a partir de cada tipo de algas, ya que cada especie varía morfológica y estructuralmente según el ambiente en que se encuentre.

5.9 Sacarificación o Hidrolisis enzimática:

(Tahezadeh & Karimi, 2007) Este proceso consiste en la liberación de los azúcares constituyentes de los polímeros que componen la biomasa. Se lleva a cabo mediante la acción de enzimas, las cuales son un complejo de enzimas altamente específico formado por endoglucanasas y exoglucanasas y b-glucosidasas, las cuales operan bajo condiciones suaves (pH 4,0 – 4,5 y temperatura 40-50°C). Por lo tanto se espera bajos problemas de corrosión y baja toxicidad en los hidrolizados como ventajas de este proceso.

(Briones Parra G. , 2012) Las endoglucanasas atacan regiones de baja cristalinidad de la celulosa, creando cadenas de extremos libres. Las exoglucanasas degradan las cadenas de azúcar removiendo unidades de celobiosa (dímeros de glucosa), las cuales son escindidas a glucosa por las b-glucosidasas.

(Tahezadeh & Karimi, 2007) Los principales factores que afectan la hidrólisis enzimática son la concentración y calidad de sustrato, los pretratamientos aplicados, actividad de la celulasa (que también depende de su origen), condiciones de hidrólisis, tales como la temperatura, pH y agitación, etc. La temperatura y pH óptimos de las

diferentes celulasas están generalmente en el rango de 40 - 50°C y pH entre 4 y 5 respectivamente.

(Briones, 2012) Dependiendo de las características de las algas, estas pueden ser preparadas para la fermentación de distintas formas, ya sea solo pretratándolas, solo hidrolizándolas con enzimas, o una mezcla de ambas.

5.10 Fermentación:

(Diego & Gustavo, 2013) La fermentación es un proceso catabólico de oxidación incompleta realizada principalmente por algunos microorganismos con el fin de producir energía a partir de un compuesto carbonado, es decir, corresponde a la conversión de un carbohidrato, por ejemplo azúcar, en un ácido (cuando se realiza a través de una bacteria) o un alcohol (cuando se realiza a través de una levadura). En particular, la fermentación alcohólica corresponde al proceso realizado principalmente en levaduras, las cuales convierten o transforman la glucosa en etanol y CO₂, tal como se muestra en la siguiente ecuación:



Para poder obtener un buen rendimiento en la fermentación es necesario analizar algunos parámetros de la levadura, tales como tasa de fermentación, tolerancia al etanol, tolerancia a la temperatura, temperatura óptima de operación, pH óptimo de operación, tolerancia al dióxido de sulfuro, posible inhibición por producto, etc., para que de esta forma se prepare un proceso con condiciones que puedan favorecer la producción de etanol.

(Niklitschek Contente, 2010) Una cepa ampliamente utilizada es la cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae* RED STAR®, la cual resiste concentraciones superiores a 12 [g/l] de etanol y su temperatura óptima de operación es 37-40°C.

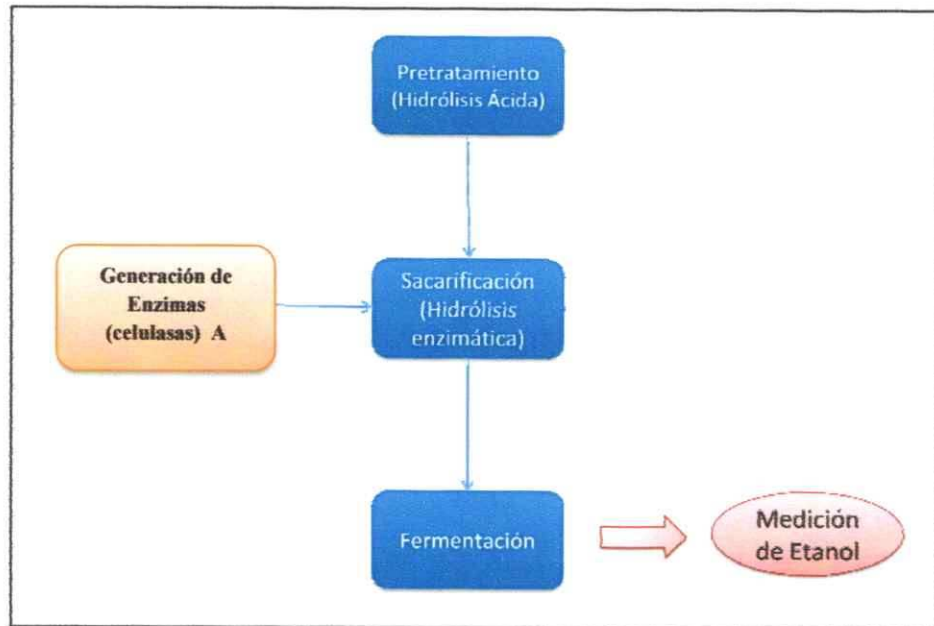
5.11 Estrategias de Sacarificación:

5.11.1 Sacarificación y Fermentación Separada (SHF):

(Tahezadeh & Karimi, 2007) En esta estrategia, denominada SHF (Separate Enzymatic Hydrolysis and Fermentation), la sacarificación de la biomasa y la fermentación ocurren en unidades separadas, es decir, primero se realiza la sacarificación y posteriormente el producto de dicha sacarificación es fermentado en otra operación. La principal ventaja de este método es que se puede realizar tanto la hidrólisis enzimática como la fermentación en sus condiciones óptimas de operación. La inhibición de la actividad celulasa por los azúcares liberados, principalmente celobiosa y glucosa, es el principal inconveniente de este método. A bajas concentraciones de celobiosa, como por ejemplo 6 g/l, la actividad de la celulasa se reduce hasta en un 60%. En presencia de glucosa la actividad también decrece, sin embargo esta no se ve tan afectado como en presencia de celobiosa. Por otro lado, la glucosa es un fuerte inhibidor de la b-glucosidasa, a niveles de 3g/l de glucosa, la actividad de b-glucosidasa se reduce en un 75%.

(Tahezadeh & Karimi, 2007) Otro posible problema de esta técnica es la contaminación con microorganismos que estén en el ambiente, razón por la cual se debe trabajar con las máximas precauciones de esterilidad. La sacarificación es un proceso de larga duración (3 a 4 días).

Figura 4: Esquema de la estrategia (SHF)



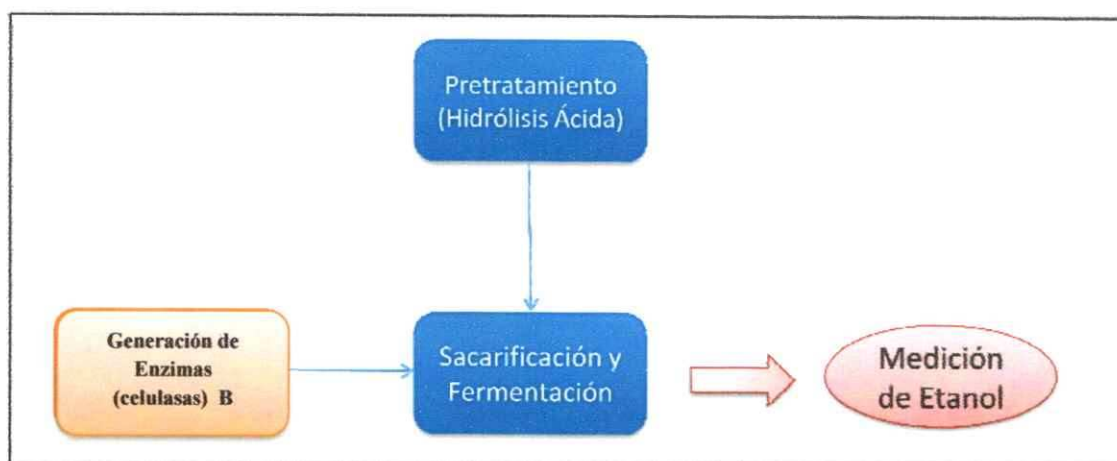
Fuente: César Peteiro, El cultivo de macroalgas marinas como una fuente renovable. 2013.

5.11.2 Sacarificación y Fermentación Simultanea (SSF):

(Ye Sun, 2002) Esta estrategia, denominada SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation), la sacarificación de la biomasa y la fermentación ocurren en un solo paso. En este método la glucosa producida por las enzimas es consumida inmediatamente por el microorganismo fermentador presente. Esta es la principal ventaja comparada con la estrategia SFH, ya que se minimizan los efectos de la inhibición por glucosa y celobiosa al estar presente en bajas concentraciones en el medio. En general, esta estrategia genera mayor concentración de etanol y requiere menor cantidad de enzima.

(Taherzadeh & Karimi, 2007) La temperatura óptima de sacarificación se encuentra cercana a los 50 °C, mientras que *S. cerevisiae* tiene una temperatura óptima cercana a los 37 °C, razón por la cual el compromiso entre ambas condiciones de hidrólisis enzimática y fermentación es cercano a los 40 °C.

Figura 5: Esquema de la estrategia (SSF)



Fuente: César Peteiro, El cultivo de macroalgas marinas como una fuente renovable. 2013.

5.12 Bioetanol a partir de Macroalgas y su Aspecto Ambiental:

5.12.1 El Bioetanol y sus beneficios sobre el medio ambiente:

El Bioetanol es considerado en la actualidad como un biocombustible amigable con el medio ambiente, un recurso renovable biodegradable, y fuente de energía que reduce los niveles de CO₂ y tóxicos mejorando la calidad del aire.

Es por ello que en los últimos años se viene buscando la generación de recursos renovables o fuente de combustible limpia, porque los problemas que se provocan al medio ambiente por la utilización de

combustibles fósiles es perjudicial y nada amigable con el medio ambiente.

5.12.2 El Bioetanol y el efecto invernadero

El principal uso de los combustibles de origen fósiles producido por la actividad humana que día a día realizamos y la destrucción de las áreas verdes, hace que se incremente los gases de efecto invernadero a la atmosfera.

Las emisiones de los gases de efecto invernadero aceleran el calentamiento de la atmosfera y trae consigo daños perjudiciales. Por ello es que realiza la siguiente estrategia de utilizar energías renovables las cuales se centran en controlar las emisiones de los gases de efecto invernadero.

Una de la ventaja de utilizar Bioetanol en la reducción de emisiones de óxido de azufres y de sulfatos, así como la reducción neta de dióxido de carbono debido a que este gas es transformado por las plantas en oxígeno por medio del proceso de fotosíntesis y la producción de bioetanol no involucrara materia prima de primera generación.

5.12.3 El Bioetanol y la salud humana

El Bioetanol es más amigable para las personas porque mejora la calidad del aire. Ya que con la producción de este recurso renovable las emisiones de los gases de efecto invernadero disminuirían, y se podría controlar la contaminación ambiental que actualmente existe en el mundo, en algunos países tales como Brasil, Estados Unidos y entre otros ya se vienen trabajando con energías renovables.

5.13 Marco Conceptual:

Etanol Anhidro: Tipo de alcohol etílico que se caracteriza por tener como máximo 0,5% de humedad y por ser compatible con las gasolinas con las cuales se puede mezclar para producir un combustible oxigenado para uso del motor.

Alcohol Carburante: Es el Etanol Anhidro Desnaturalizado, obtenido de la mezcla del Etanol Anhidro con la Sustancia Desnaturalizante en una proporción volumétrica no inferior a 2% (dos por ciento) ni superior a 3% (tres por ciento) en el caso de ser gasolina motor sin contenido de plomo.

Etanol: Es el alcohol etílico cuya fórmula química es $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ y se caracteriza por ser un compuesto líquido, incoloro, volátil, inflamable y soluble en agua.

Biocombustibles: Productos químicos que se obtienen a partir de materias primas de origen agropecuario, agroindustrial o de otra forma de biomasa y que cumplen con las normas de calidad establecidas por las autoridades competentes para su uso como combustible. Éstos pueden ser sólidos (biomasa), gaseosos (biogás, gas de gasificador u otros tipos de gas manufacturados a partir de residuos, carbón, etc.) o líquidos.

Gasohol: Es la mezcla que contiene gasolina (de 97, 95, 90, 84 octanos y otras según sea el caso) y Alcohol Carburante.

VI. HIPÓTESIS:

6.1 Hipótesis General :

Se obtendrá bioetanol a partir de la macroalga *Macrocystis pyrifera* bajo el proceso de fermentación.

6.2 Hipótesis Específicas:

- Es posible que la aplicación de la hidrólisis ácida a la macroalga *Macrocystis pyrifera* sea óptimo para el tratamiento de la macroalga.
- Con la fermentación de la Macroalgas *Macrocystis pyrifera*, pretratada se obtendrá el bioetanol.
- Se obtendrá el bioetanol como producto final.

VII. VARIABLES EN ESTUDIO:

En este trabajo se analizó el efecto de parámetros de operación sobre el comportamiento dinámico del proceso, en las etapas de pretratamiento y fermentación para la obtención de bioetanol a partir de la Macroalga *Macrocystis pyrifera*.

7.1 Variables Independientes:

- ✓ Macroalga *Macrocystis pyrifera*.

7.2 Variables Dependientes:

- ✓ Bioetanol.

VIII. MATRIZ DE CONSISTENCIA

Cuadro 1: Matriz de Consistencia

MATRIZ DE CONSISTENCIA					
OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE LA MACROALGA <i>Macrocyctis pyrifera</i>					
PROBLEMA	OBJETIVOS	VARIABLE	HIPOTESIS	MUESTRA	DISEÑO
Problema General	Objetivo General	Variables Independientes	Hipótesis General		
¿Se obtendrá Bioetanol a través del proceso de fermentación?	Obtener bioetanol a partir de la transformación de la macroalga <i>Macrocyctis pyrifera</i> .	<ul style="list-style-type: none"> Macroalga <i>Macrocyctis pyrifera</i>. 	Se obtendrá bioetanol a partir de la macroalga <i>Macrocyctis pyrifera</i> bajo el proceso de fermentación.		
Problemas Específicos	Objetivos Específicos	Variables Dependientes	Hipótesis Específica		
¿Con aplicación de la hidrólisis ácida a la macroalga <i>Macrocyctis pyrifera</i> dará mejor resultado para el pretratamiento?	Aplicar la hidrólisis ácida adecuada, como pretratamiento para la macroalga <i>Macrocyctis pyrifera</i>		<ul style="list-style-type: none"> Es posible que la aplicación de la hidrólisis ácida a la macroalga <i>Macrocyctis pyrifera</i> sea óptimo para el tratamiento de la macroalga. 		
¿Qué estrategia de Sacarificación y fermentación es la más recomendable para este proyecto de investigación?	Realizar la fermentación con la hidrólisis obtenida, mediante el proceso de sacarificación de la Macroalga <i>Macrocyctis pyrifera</i> .	Bioetanol	<ul style="list-style-type: none"> Con la fermentación de la Macroalga <i>Macrocyctis pyrifera</i>, pretratada se obtendrán el bioetanol. 		
¿Qué es lo que determina que se logre el producto?	Demostrar el rendimiento del producto bioetanol.		<ul style="list-style-type: none"> Se obtendrá el bioetanol como producto final. 		INVESTIGACION EXPERIMENTAL

Fuente: Elaboración propia 2017

IX. METODOLOGÍA Y MATERIALES DE INVESTIGACIÓN:

9.1 Tipo de Investigación:

El presente trabajo de investigación se enmarca dentro la siguiente clasificación científica:

- a) **Investigación Experimental:** El objetivo principal consiste en demostrar que se puede obtener bioetanol a partir de la transformación de la macroalga *Macrocystis pyrifera*.
- b) **Temporal:** porque se delimita dentro de un tiempo determinado durante el cual se realizara pruebas para la investigación.

9.2 Desarrollo Metodológico:

El desarrollo metodológico incluirá las siguientes etapas, las cuales se desarrollan de manera secuencial en cada una de las evaluaciones a desarrollarse.

9.2.1 Metodología general:

Según los protocolos de Wargacki aplicados en estudios similares, las fermentaciones se realizaron en medio mínimo. (Ver Anexo A1) por lo que la segunda etapa exploratoria consistió en observar el crecimiento en el mismo, suplementado con glucosa y con la razón de alginato-manitol.

9.2.2 Procedimiento:

El procedimiento que llevara a cabo en este trabajo se basó en la búsqueda de información, interpretación, modelamiento y simulación de las etapas de pretratamiento de la biomasa, y procesos para lograr un mayor rendimiento y

fermentación en el proceso de Obtención de bioetanol a partir de macroalgas. El procedimiento general de esta metodología es descrito a continuación para cada una de las etapas.

La producción de bioetanol mediante la fermentación de los polisacáridos de las macroalgas, especialmente a partir de las algas laminarias y Pardas. En estas grandes algas pardas los polisacáridos suponen aproximadamente el 60% de su peso seco, aunque se requiere previamente su transformación en azúcares sencillos para su fermentación en bioetanol. Este proceso es conocido como sacarificación y consiste en la hidrólisis o rotura de los polisacáridos mediante tratamientos químicos. En la hidrólisis de los polisacáridos se aplican sobre todo tratamientos enzimáticos, mientras que en la fermentación de los azúcares resultantes se utilizan diferentes microorganismos como levaduras y bacterias.

Para comprender de mejor forma la metodología del proceso se muestra un diagrama de flujo de las etapas que comprende el estudio de producción de etanol a partir de algas (Ver anexo 2).

9.2.3 Obtención de macroalga:

La macroalga a utilizar *Macrocystis pyrifera*, se encuentra en el sur del Perú.

9.2.4 Secado y obtención de la humedad de la macroalga:

Se toma una masa determinada de alga y se lleva a una estufa a 60°C durante 24 horas. La pérdida de masa que sufra la muestra durante las 24 horas de secado en la estufa servirá para medir el porcentaje de humedad que posee la muestra. Lo anterior se materializa con la fórmula que se muestra a continuación.

9.2.5 Análisis de Muestras:

Las muestras serán enviadas a laboratorios de análisis o serán analizadas en los laboratorios de la Universidad Nacional de Moquegua conservando la cadena de custodia respectiva que asegure su integridad.

9.2.6 Técnicas para recolección de datos:

9.2.6.1 Pretratamiento mediante hidrólisis ácida:

En matraz de Erlenmeyer de 100 ml se agregara, a una razón 1:10 (en p/v, 1 g y 10 ml), el material a pretratar y el ácido sulfúrico a una concentración de 0% y 2% v/v. El proceso de pretratamiento con ácido diluido se prueba a dos temperaturas diferentes: 30°C y 120°C. La primera condición de temperatura se efectúa en un baño termostatzado, mientras que para alcanzar los 120°C los matraz de Erlenmeyer se disponen en un autoclave con un volumen de 1,5 l de agua destilada; los matraz de Erlenmeyer se cierran y el conjunto es llevado a una campana extractora de gases; se cierra el autoclave y se somete al contacto directo de una llama mediante un mechero. En el momento en que el agua ha empezado a hervir, se deja reaccionar por 30 minutos. Para terminar la reacción, se enfría la autoclave mediante un baño de hielo y se extraen las muestras que finalmente también son depositadas en hielo.

Cuando las muestras alcanzan la temperatura ambiente se vierten en un vaso precipitado de 250 ml y se procede a neutralizarlas mediante hidróxido de sodio 2 ml hasta alcanzar un pH entre 8 y 11. Se toma una muestra de 30 µl para la posterior medición de glucosa, que se almacena a 4°C. La mezcla se centrifuga a 10000 rpm durante 10 minutos y se separa la fracción sólida de la líquida. La fracción sólida será posteriormente sacarificada y se guarda la fracción líquida.

9.2.6.2 Hidrólisis enzimática o sacarificación:

A partir de la fracción sólida post pretratamiento, se prepara la sacarificación del material utilizando una carga de sustrato del 5% razón p/v (0,2 g de material, 4 ml de reacción) en un matraz de Erlenmeyer 100 ml. El medio en el cual se realiza la reacción está constituido por una mezcla tampón-enzimas. Las enzimas corresponden a una mezcla de celulasa/celobiosa a una razón 7,5:1 (volumen). La cantidad de celulasas se calcula según la carga enzimática definida (20 unidades de papel filtro -FPU- por gramo de material) y por la actividad establecida (FPU/ml en la solución comercial). Definido los volúmenes de enzimas se completan los 4 ml del volumen de trabajo con tampón acetato de sodio (50 mM; pH 4,8) y se deja incubando por 72 horas a 50°C. Se toman muestras de 30 µl a las 0, 3, 6, 24, 48 horas, para la posterior determinación de glucosa.

Terminada la reacción la suspensión es centrifugada y separada, donde la fracción sólida se descarta y la fracción líquida se almacena a 4°C. Todos los experimentos fueron realizados en duplicado y se reportan los valores promedios.

9.2.6.3 Fermentación Separada (SHF)

La fermentación se realizara a cabo en condiciones anaeróbicas y no estériles. Las fracciones líquidas de la etapa anterior no serán autoclavadas ya que las altas temperaturas de dicho proceso pueden provocar una cristalización de los azúcares de la fracción líquida.

Solo los materiales a utilizar serán autoclavados. De la fracción líquida proveniente de la sacarificación, 18 ml se agregan al matraz de 50 ml, se agrega 2 ml de buffer acetato de sodio 10x (el cual posee los siguientes nutrientes para proporcionar un medio base: 5 g/l de extracto de levadura, 0,025 g/l de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 0,5 g/l de

(NH_4) $_2$ HPO $_4$). A la mezcla anterior se agregan 0,2 g de levadura seca para obtener una concentración inicial de 10 g/l de células.

Las fermentaciones se llevan a cabo en condiciones anaeróbicas y 40°C durante 72 horas. Con una jeringa estéril se toman muestras de 300 μ l a las 0, 3, 6, 24, 48 horas. El volumen de muestra se centrifuga en los matraz de Erlenmeyer de 100 ml a 10000 rpm durante 20 minutos a 20°C. 200 μ l del sobrenadante se almacenan a 4°C para posterior medición de etanol. Todos los experimentos fueron realizados en duplicado y se reportan los valores promedios.

9.2.6.4 Fermentación Simultánea (SSF):

Esta estrategia de fermentación se realizara utilizando las mismas condiciones establecidas que en la sacarificación SHF. La fracción sólida post pretratamiento se coloca en matraces Erlenmeyer-modificados de 50 ml y se agrega el buffer acetato de sodio 1x (el cual posee los siguientes nutrientes para proporcionar un medio base: 5 g/l de extracto de levadura, 0,025 g/l de MgSO $_4$ ·7H $_2$ O y 0,5 g/l de (NH_4) $_2$ HPO $_4$). El volumen de este buffer se estima considerando el volumen de enzima a agregar (celulasa/celobiasa) hasta completar un volumen de reacción de 20 ml. Además se coloca la cantidad de enzima correspondiente, la cual se estima de forma análoga al caso de Hidrólisis Enzimática. Finalmente se agrega 0,2 g de células de levadura seca para obtener una concentración inicial de 10 g/l de células. Las condiciones de incubación y toma de muestras son idénticas a las del caso de fermentación SHF.

9.2.7 Número de Pruebas:

Las pruebas que se realizaran será el pretratamiento por hidrolisis acida en función a concentración de ácido y temperatura; posteriormente se realizara 5 repeticiones por estrategia Sacarificación y Fermentación Separadas (SHF) y Simultáneas (SSF), según tiempo.

9.2.8 Análisis de Datos:

El primer paso será determinar el pretratamiento aplicando las condiciones de temperatura y a concentraciones variables de ácido sulfúrico. Para obtener datos.

Seguidamente se continuara con el procedimiento para obtener el objetivo general del proyecto de investigación, donde se realizara las estrategias seleccionadas para la fermentación de la macroalga *Macrocytis pyrifera*.

Finalmente para la comparación estadística de los resultados dados en el pretratamiento y en la aplicación de las estrategias sacarificación y fermentación separadas (SHF) y sacarificación y fermentación simultánea (SSF). Con distintas cargas enzimáticas.

Para el procedimiento de los datos se utilizara el programa estadístico "SPSS Statistic 22".

En el presente trabajo de Investigación se usara el Diseño Completamente al Azar para comparar los tratamientos, puesto que sólo considera dos fuentes de variabilidad: los tratamientos y el error aleatorio.

Para este caso, la variable de respuesta es la concentración de la Glucosa y el Bioetanol; el factor en el pretratamiento de la Macroalga son los niveles de Ácido y Temperatura; y el factor en la Hidrolisis y Fermentación son las Estrategias de Fermentación, es decir SFH y SSF.

En este caso se trata de un diseño balanceado porque se realizara el mismo número de repeticiones (5) para cada uno de los tratamientos.

Este tipo de diseño se llama completamente al azar porque todas las repeticiones experimentales se realizan en orden aleatorio completo.

El número de repeticiones a realizar en cada tratamiento depende de la variabilidad que se espera observar en los datos, a la diferencia mínima que el

experimentador considera que es importante detectar y al nivel de confianza que se desea tener en las conclusiones, en este caso será de 5 repeticiones.

Se realizara el análisis de la varianza (ANOVA) para comprobar si existen diferencias en las medias. Fundamentalmente este análisis consiste en separar la contribución de cada fuente de variación en la variación total observada. Sin embargo, éste ANOVA está supeditado a los siguientes supuestos que deben verificarse:

- Normalidad
- Varianza constante
- Independencia

Para el análisis de los datos se usara el programa estadístico **IBM SPSS Statistics 22**.

Cuadro 2: Determinación del pretratamiento hidrolisis acida

N° tratamientos	1	2	3	4	5
Concentración-temperatura					
0% - 30°C					
2% - 120°C					

Fuente: Elaboración propia -2017

Cuadro 3: Determinación de la hidrolisis enzimática y fermentación

Concentración de Glucosa y Bioetanol	N° de muestra	1	2	3	4	5
	Horas	0	3	6	24	48
SFH						
SSF						

Fuente: Elaboración propia -2017

9.3 Equipos, Materiales y Reactivos:

9.3.1 Equipos:

- Centrifuga
- Autoclave
- Incubadora

9.3.2 Materiales:

9.3.2.1 Materia prima:

La macroalga utilizada es la *Macrocystis pyrifera*, que se usara en el presente trabajo, es secado y sometido a un proceso de molienda muy fino.

9.3.2.2 Enzimas:

- Celulasa (Celluclast).
- Celobiosa (Novozyme).

9.3.2.3 Microorganismo fermentador:

Para el estudio de las distintas fermentaciones se utilizara la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

9.3.2.4 Productos químicos diversos:

- Ácido sulfúrico.
- Acetato de sodio.

9.3.2.5 programa:

- SPSS Statistic 22.

X. AMBITO DE ESTUDIO:

El presente trabajo de investigación se realizara en los laboratorios de la UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA SEDE ILO, que está ubicada en:

DISTRITO : PACOCHA
PROVINCIA : ILO
DEPARTAMENTO : MOQUEGUA

XI. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES:

El proyecto de investigación propuesto se realizara de acuerdo al siguiente cronograma especificado por semanas o cuando culminen todas las actividades propuestas.

Cuadro 4: cronograma de actividades del proyecto de investigación

Actividades	Meses		Julio			Agosto			Setiembre			Octubre			noviembre			diciembre					
	Numero de semana	Duración (semana)	1 semana	2 semana	3 semana	4 semana	1 semana	2 semana	3 semana	4 semana	1 semana	2 semana	3 semana	4 semana	1 semana	2 semana	3 semana	4 semana	1 semana	2 semana	3 semana		
Revisión bibliográfica																							
Presentación del proyecto de tesis																							
Levantamiento de observaciones																							
Aprobación del proyecto																							
Resolución de aprobación del proyecto																							
Ejecución del proyecto																							
Pruebas en el laboratorio																							
Análisis de información																							
Elaboración del informe final																							
Presentación de informe final																							
Sustentación de Tesis																							

Fuente: Elaboración Propia 2017

XII. PRESUPUESTO:

El proyecto de investigación será autofinanciado y el presupuesto es como se detalla a continuación.

Tabla 3: Presupuesto del proyecto de investigación.

PRESUPUESTO					
RUBROS	UNIDAD DE MEDIDA	CANTIDAD	COSTO UNITARIO	TOTAL	
1. PERSONAL					
Investigador	Meses	-	-	-	
Asesor	Meses	-	-	-	
Coasesor	Meses	-	-	-	
2. MATERIALES Y EQUIPOS.					
Muestra de macro alga	Kg	10	50	50	
Enzimas	Global	2	600	1200	
Levadura	Global	1	30	30	
Material de vidrio	Global	1	800	800	
Productos químicos	Global	1	1200	1200	
Agitador rotatorio	Unidad	1	3800	3800	
3. SERVICIOS					
Servicio de determinación de concentración de etanol y glucosa en muestra.	Global	1	2000	2000	
Servicio de Impresión y empastado	Global	1	900	900	
Servicio de Alimentación	Unidad	1000	30	3000	
TOTAL S/.				12980.00	

Fuente: Elaboración Propia 2017

XIII. BIBLIOGRAFIA CITADA:

Bibliografía

- Awad, S. A. (2011). *SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA PARA LA PRODUCCIÓN*. Santiago de Chile: Universidad de Chile.
- Beatriz, A. P., Raúl, C. R., José, Z. H., Ruslan, P. C., Vicente, C. M., & Jesús., R. M. (2011-2015). Plan de capacitación sobre las algas pardas en el sur del Perú 2011-2015. *IMARPE*.
- Briones Parra, G. (2012). *Producción de Etanol a Partir de la Macroalga Ulva rigida*. Santiago de Chile: universidad de Chile.
- Camus, C., & Ballerino, P. (2016). *Ampliación de la producción de bioetanol*. Puerto Montt Chile: Consorcio BalBiofuels.
- Che, Y., Kim, H., & Kim, S.-K. (2013). *La producción de bioetanol a partir de algas pardas, Undaria pinnatifida utilizando levadura aclimada con NaCl*. Berlin: Springer-Verlag.
- Diego, P., & Gustavo, G.-N. (2013). *Extracción de polifenoles y composición de vinos tintos: Tannat elaborados por técnicas de maceración prefermentativa*. Montevideo: versión On-line ISSN.
- García, M. (2013). El cultivo de macroalgas marinas como una fuente renovable. *El cultivo de macroalgas marinas como una fuente renovable*, 6.
- Harun, R. (2014). *Conversión de biomasa de algas en bioetanol - una evaluación paso a paso*. Malasia.
- Imarpe. (2011-2015). *Estudios sobre macroalgas pardas*. Callao, Peru: kinkos impresores.

InnovatePeru. (2016). Producción de semillas y cultivos en sistema suspendido de macroalgas de interés comercial en el litoral marino de Ilo. *INNOVATE*, 1.

Li, K., Liu, S., & Liu, X. (2014). *Una visión general de la producción de bioetanol de algas*. China: Wiley Online.

Meers Diaz, R. C., & Herrera Escobar, A. d. (2013). *Diseño de las etapas de hidrólisis de almidón y fermentación para producir bioetanol basado en la respuesta dinámica del sistema*. Universidad de cartagena.

Meers Diaz; Herrera Escobar. (2013). *Diseño de las etapas de hidrólisis de almidón y fermentación para producir bioetanol basado en la respuesta dinámica del sistema*. Universidad de cartagena.

Montiel, J. (2010). Potencial y riesgo ambiental de los bioenergéticos en México. En J. Montiel, *Potencial y riesgo ambiental de los bioenergéticos en México*. (págs. 1-7). Sinaloa Mexico: Ra Ximbat.

Mujeriego, R., & Ponce, R. (2011). Las algas: el combustible del futuro. *Gestión de la calidad del agua*, 109 - 114.

Nain, C. C. (2015). *Condiciones óptimas de fermentación de carbohidratos de algas pardas, mediante el uso de organismos genéticamente modificados*. Santiago de Chile: universidad de Chile.

Niklitschek Contente, T. A. (2010). *Selección de Condiciones de Fermentación de Residuos de Lengua para la Producción de Bioetanol*. Chile.

Ortiz. (2011). *Composición Nutricional y Funcional de Algas Pardas*. *Laboratorio de Química y Análisis de Alimentos, Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química*, 18.

- PARRA, G. A. (2012). *Producción de Etanol a Partir de la macro alga Ulva rigida*. Santiago de Chile: Universidad de Chile.
- Peteiro, C. (2013). El cultivo de macroalgas marinas como una fuente renovable. *El cultivo de macroalgas marinas como una fuente renovable*, 3.
- Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2007). *PROCESO DE HIDROLISIS BASADO EN ACIDO PARA LA PRODUCCION DE ETANOL*. Boras Sweden.
- Tasende, M. G., & Peteiro, C. (2015). *Explotación de las macroalgas marinas*. Galicia.
- Wargacki, A. J. (2012). *una plataforma microbiana de ingeniería producción directa de biocombustibles macroalgas marrones*. New York: weekly.
- Ye Sun, J. C. (2002). Hidrólisis de materiales lignocelulósicos para la producción de etanol. En J. C. Ye Sun, *Hidrólisis de materiales lignocelulósicos para la producción de etanol* (págs. 1-11). china.

XIV. ANEXOS:

Anexo 1: PROTOCOLO DE WARGACKI - 2012

PRETRATAMIENTO DE ALGAS CON ÁCIDO SULFÚRICO

Materiales:

- Viales
- Ácido sulfúrico 2% p/v
- Baño de silicona
- Agua destilada
- 5 [g] de *Macrocystis pyrifera*
- Tubo Falcon de 50 [ml]
- Centrífuga
- Placa Petri
- Papel Alusa Foil

PROCEDIMIENTO:

Se coloca 1[g] de alga en un vial y se adicionan 3 [ml] de ácido sulfúrico al 2%. Luego el vial se lleva a un baño de silicona a 120 [°C] durante 1 [h]. Se remueve el vial y se le agregan 40 [ml] de agua destilada.

La solución se deposita en un tubo Falcon de 50 [ml] y se centrifuga 5 [min] a 7000 [rpm]. Se elimina el sobrenadante. Repetir el procedimiento hasta que el sobrenadante tenga pH 5 (alrededor de 7 lavados).

Colectar el pellet de alga y depositarlo en una placa Petri. Taparla con papel alusa foil y hacerle orificios verticales. Dejar la placa en un estufa a 30 [°C] por 2 días. Luego tomar el alga seca y guardarla.

OBS. Se utilizaron 18 viales con 18 [g] de alga final y luego del pretratamiento se obtuvo 6 [g] de alga para poder realizar SSF.

CONCENTRADOS DE ALGINATO Y MANITOL

Materiales:

- Matraz de Erlenmeyer de 500 [ml]
- Balanza digital
- Agitador magnético
- Bala magnética
- Botella de vidrio de 100[ml]
- Alginato de sodio
- D-manitol
- 500[ml] de agua destilada
- Parafilm (cubrir las soluciones)

PROCEDIMIENTO:

Masar 10 [g] de manitol y depositarla en el matraz. Verter 100 [ml] de agua destilada y agitar hasta que la solución se homogenice. Luego trasvasar a una botella limpia y esterilizar en el autoclave.

Alginato forma aglomerados al contacto con el agua, además mientras más concentrado esté la solución, más viscoso se torna el líquido. Se recomienda que la concentración no supere 6,5% p/v.

Verter 50 [ml] en el matraz y depositar la bala magnética en el fondo. Masar 6 [g] de alginato de sodio y depositarlo en el matraz cuidando que no se adhiera a la bala, ni a los bordes del matraz. Agitar unos segundos y luego verter 50 [ml] más. Cubrir el matraz con *parafilm* y dejar agitando por varias horas, hasta que la solución esté homogénea. Puede aplicar calor para acelerar la disolución. Luego esterilice en el autoclave.

PROTOCOLO DE FERMENTACIÓN

Materiales:

- Matraz de Erlenmeyer de 500 [ml]
- Medio M9 2X
- Agua destilada estéril
- Concentrados de Alginato y Manitol
- Concentrados de Mg SO₄ Y CaCl₂
- Mechero
- Micropipeta p200, p1000 y p5000 [μl]
- Cubetas plásticas para espectrofotometría.
- Espectrofotómetro
- Tubos de ensayo
- Stock congelado de *E. coli* BAL 1611
- Tubos Eppendorf de 1,5 [ml]
- Tubos Falcon de 10 [ml]
- Congelador a -20 [°C]
- Centrífuga

PROCEDIMIENTO:

Día 1: Prepare un inóculo de 5 [ml] en un tubo de ensayo. Bajo mechero agregue 2,5 [ml] de M9. Además, agregue el volumen necesario para suplementar con alginato y manitol

(a partir del stock) de acuerdo a la razón que estime conveniente para un volumen final de 5 [ml]. Añadir sulfato de magnesio y cloruro de calcio, tal que su concentración final sea de 2 [mM] y 1 [mM], respectivamente. Finalmente, verter agua destilada hasta completar los 5 [ml]. Dejar crecer durante toda la noche a 37[°C] y 250 [rpm] de agitación.

Día 2: Suponiendo que se realizará un cultivo de 100 [ml], añada, bajo mechero, 50 [ml] de medio M9 2X, el volumen necesario para suplementar con alginato y manitol (a partir del stock) de acuerdo a la razón que estime conveniente para un volumen final de 5 [ml]. Se recomienda usar la micropipeta p5000 para agregar éstos volúmenes. Luego, agregar Añadir sulfato de magnesio y cloruro de calcio, tal que su concentración final sea de 2 [mM] y 1 [mM], respectivamente. Finalmente, verter agua destilada hasta completar los 100 [ml] y agitar suavemente con la mano hasta que la solución se homogenice.

Tome un 1 [ml] de medio con una micropipeta p1000 y deposítelo en una cubeta de plástico. Coloque parafilm para cubrir la muestra. Éste será el blanco para poder medir la absorbancia. Es recomendable guardar medio sin células para hacer diluciones cuando se necesite. Para ello, tome 10 [ml] de medio y deposítelo en un tubo Falcon de 10 [ml] y guárdelo a 4[°C].

Tome un 1 [ml] de inóculo con una micropipeta p1000 y viértalo en el matraz. Agitar suavemente con la mano. Tomar un 1 [ml] para medir absorbancia y 1,5 [ml] para medir consumo y producción. Vierta el contenido de ésta última en un tubo Eppendorf y centrifugue a 3000[G-Force]. Recupere el sobrenadante y deposítelo en otro tubo Eppendorf rotulado con la hora, qué es, y el nombre del experimentador. Luego refrigérela a -20 [°C] y descarte el pellet. La otra muestra deposítela en una cubeta de plástico. Asegúrese de que la solución esté homogénea.

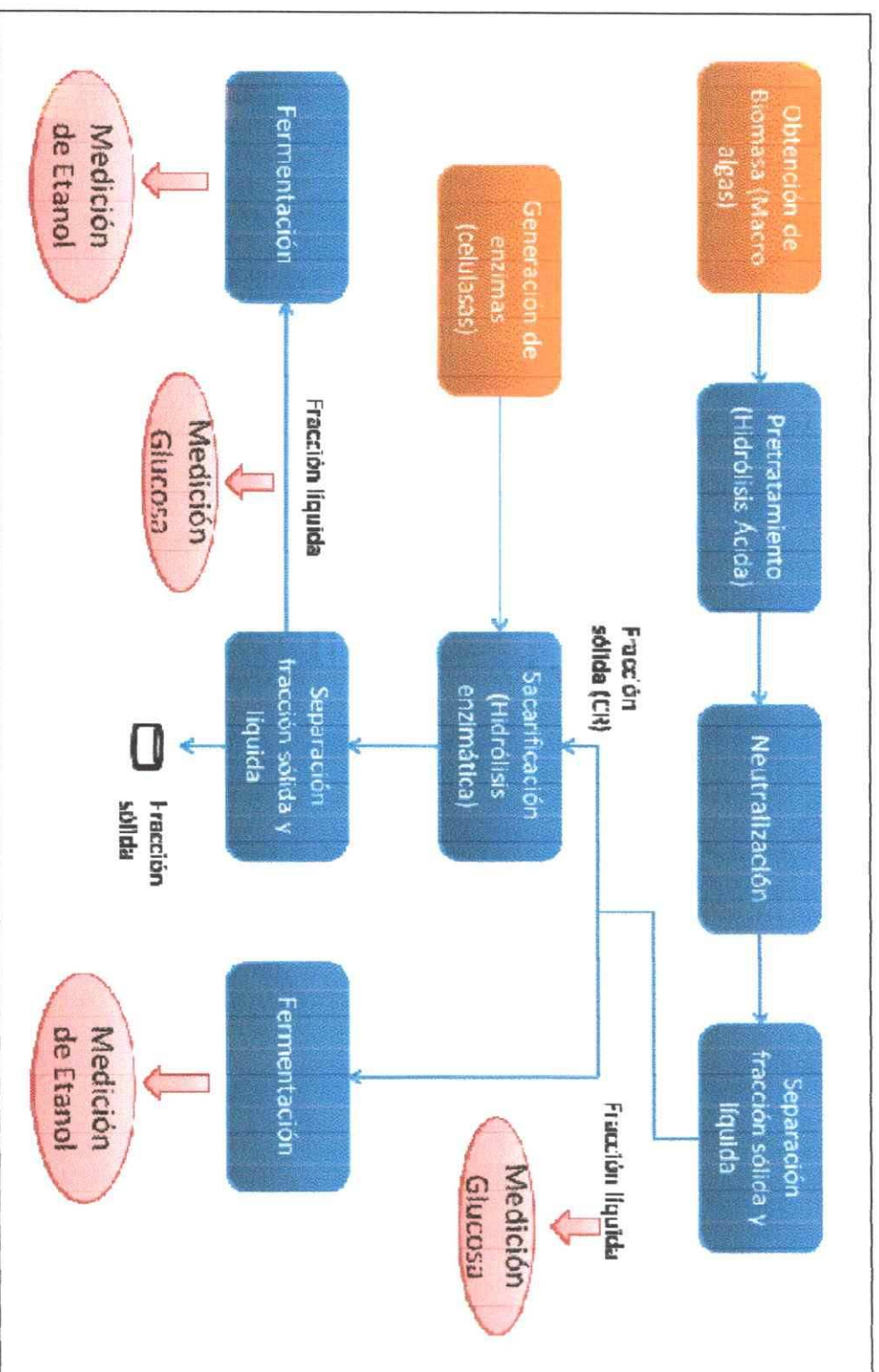
Calibre el espectrofotómetro y ajuste la longitud de onda a 600 [nm]. Mida el blanco, e indíquele al equipo que se trata del blanco. Luego mida la muestra y registre su valor. Cuando el valor medio por el equipo supere 1, diluya la muestra con el medio guardado, o bien con agua destilada. Recuerde ponderar el valor de la medición por el factor de dilución.

Realice mediciones de absorbancia y guarde muestras para la medición de consumo y producción cada una hora, registrando la hora y los valores obtenidos, hasta completar 24

[h] de cultivo. Se recomienda efectuar dos cultivos, uno en el que se midan las 12 primeras horas, y otro en el que se mida las 12 [h] siguientes.

Día 3: Colecte 5[ml] de sobrenadante y guárdelo a -20 [°C]. Esterilice el cultivo antes de descartar el medio.

Anexo 2: Diagrama de Flujo de las etapas que comprende la producción de etanol a partir de algas. Los bloques naranjos representan etapas que no son realizadas en el presente trabajo. Los bloques azules corresponden a las etapas efectivamente ejecutadas en el estudio. Los globos rosados corresponden a etapas de medición y control.



Fuente: César Peleiro, El cultivo de macroalgas marinas como una fuente renovable. 2013.

460000