



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

**PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE ALGAS UTILIZANDO LA
LEVADURA *SCHEFFERSOMYCES STIPITIS***

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

JAVIER ALEJANDRO MOLINA KORN

PROFESORA GUÍA:
MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
ORIANA SALAZAR AGUIRRE
ZIOMARA P. GERDTZEN

SANTIAGO DE CHILE
MARZO 2013

RESUMEN

La gran dependencia energética de la sociedad actual, el agotamiento de las reservas de petróleo y el alto nivel de contaminación que generan los combustibles fósiles, han llevado a los gobiernos del mundo a potenciar el desarrollo de nuevas fuentes de energía que sean renovables y de bajo impacto ambiental. Las energías renovables, como biocombustibles, se presentan como una gran alternativa y están tomando fuerza. A partir de biomasa se pueden producir combustibles como biodiesel, biohidrógeno y bioetanol, siendo este último en el que se centra esta investigación. Una de las alternativas que ha acaparado mucho interés en las últimas décadas es utilizar biomasa de alga para la producción del bioetanol. Las algas tienen bajas cantidades de lignina y altas concentraciones de carbohidratos, entre ellos hexosas y pentosas, siendo las pentosas uno de los azúcares menos aprovechados en la fermentación alcohólica. Por esto, se planteó realizar un estudio exploratorio de producción de bioetanol a partir de algas utilizando la levadura fermentadora de pentosas *Scheffersomyces stipitis*.

En primera instancia, se determinó la cantidad de azúcares reductores totales, glucosa y xilosa de dos algas que crecen en las costas chilenas, *Macrocystis pyrifera* y *Ulva rigida*, eligiéndose esta última para continuar con el estudio, debido a que no requiere pretratamiento y contiene más xilosa. Luego se realizaron las estrategias de fermentación *Sacarificación y Fermentación Simultáneo* (SSF) e *Hidrólisis y Fermentación Separadas* (SHF) utilizando *U. rigida* y *S. stipitis*, con el fin de comparar cuál estrategia entregaba mayores rendimientos. Finalmente, se planteó fermentar los azúcares de la biomasa utilizando *S. cerevisiae* y *S. stipitis* en dos estrategias: una co-fermentación simultánea con ambas levaduras, y otra estrategia secuencial fermentando inicialmente con *S. cerevisiae* y luego con *S. stipitis*. La finalidad de estos ensayos era encontrar si existía un aumento de los rendimientos de etanol al utilizar *S. stipitis*, en comparación con los obtenidos en trabajos previos en los que se utilizó *U. rigida* y *S. cerevisiae*.

Los resultados permitieron determinar que el alga *M. pyrifera* está constituida en un 43,8% de azúcares reductores, y de estos, un 7% y 5% corresponden a glucosa y xilosa, respectivamente. El alga *U. rigida* está constituida en un 36,3% de azúcares reductores, y de estos, un 28% y 8% corresponden a glucosa y xilosa, respectivamente. Al comparar los resultados de las estrategias SSF y SHF con *S. stipitis*, se encontró que SSF entrega rendimientos de 0,044 [g EtOH/g alga], mientras que en SHF no se produjo etanol. Finalmente, la estrategia secuencial presentó mayores rendimientos que la simultánea, 0,099 [g EtOH/g alga] versus 0,064 [g EtOH/g alga], pero en ambos casos fueron mayores que SSF y SHF utilizando sólo *S. stipitis*.

Como conclusiones se tiene que el mayor potencial de azúcares en *U. rigida* se encuentra en los azúcares reductores no medidos, y no en la glucosa y xilosa, por lo que se recomienda realizar un estudio acabado de la composición del alga. También, los rendimientos de sacarificación de *U. rigida* utilizando Celluclast® y Novozyme® podrían mejorarse probando con otras enzimas, como hemicelulasas. La presencia de inhibidores y sales pudo ser la causa de la no producción de etanol en SHF y la baja cantidad de levadura inicial la causa del bajo rendimiento de SSF. Finalmente, la estrategia secuencial no representó un avance pues el máximo de etanol se generó durante la fermentación con *S. cerevisiae*, y no producto de la fermentación de pentosas por *S. stipitis*. Aún quedan muchas variables por mejorar, por lo que no se descarta continuar con las investigaciones de producción de etanol con *U. rigida* y *S. stipitis*.

AGRADECIMIENTOS

Han pasado siete años desde que entré como adolescente y mechón a la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile, y hoy estoy finalizando mi proceso de formación como InJeniero y comenzando mi vida adulta. Con este trabajo culmina y finaliza una bonita etapa de mi vida en la que adquirí muchas habilidades y conocimientos, formé importantes amistades y crecí como ser humano. Nunca podría haber recorrido este camino en solitario, por lo que no puedo dejar de agradecer a todos los que me acompañaron y apoyaron de alguna u otra forma.

En primer lugar, a mi familia por entregarme los medios para estudiar en la mejor Universidad del país, el cariño para soportar los malos momentos y disfrutar los buenos, y los valores fundamentales para llegar a ser una persona íntegra. A mis amigas del colegio, Cami, Gaby, Karla y Jocy, por la confianza, el cariño y todos los buenos momentos que hemos pasado juntos. A Gonzalo y Lisset por todas las *paleteadas* y los buenos ratos que pasamos haciendo trabajos juntos, y a todos los compañeros(as) y amigos(as) con los que compartí mi paso por la Universidad.

Feña, no te puedo dejar de agradecer por estar a mi lado, por soportar mi mal carácter y la pesadez en esos malos ratos que pasé durante el fin de mi carrera. Me diste ánimo, soporte, consejo y cariño, en esos momentos en que ya no me quedaban ganas de hacer nada. Muchas gracias por las alegrías que hemos tenido juntos.

Agradezco enormemente a las profesoras María Elena Lienqueo y Oriana Salazar por su incansable apoyo y orientación en todos los aspectos de mi Trabajo de Título, además de estar siempre dispuestas a responder hasta las dudas más pequeñas. A Nancy Carrasco por estar siempre disponible a ayudar, y a todos los estudiantes de pregrado, magister y doctorado del laboratorio que me apoyaron con respuestas y simpatía.

Para terminar, no puedo dejar de agradecer al Centro de Excelencia Académica en Ingeniería Bioquímica y Biotecnología (CIByB) por otorgarme las instalaciones para desarrollar mi trabajo. También a Mario Edding del Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Algas (CIDTA) de la Universidad Católica del Norte por donar el alga *U. rigida* utilizada en esta investigación. Finalmente, al Departamento de Investigación VID de la Universidad de Chile por el apoyo vía el proyecto U-Apoya Enlace (ENL-1/12).

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO I	INTRODUCCIÓN, MARCO TEÓRICO Y OBJETIVOS	1
1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Escenario energético global	1
1.2	Biocombustibles	2
1.3	Bioetanol a partir de macroalgas	3
1.4	Motivación	4
2.	MARCO TEÓRICO	5
2.1	Bioetanol	5
2.1.1	Producción de bioetanol	5
2.1.2	Biorefinería	6
2.2	Macroalgas	6
2.2.1	Estructuras presentes en las algas	8
2.3	Hidrólisis enzimática	10
2.4	Fermentación	11
2.4.1	Fermentación de hexosas	11
2.4.2	Fermentación de pentosas	11
2.4.3	Estrategias de fermentación	12
2.4.4	Scheffersomyces stipitis	13
2.4.5	Saccharomyces cerevisiae	13
3.	Antecedentes de trabajos previos	14
4.	OBJETIVOS	16
4.1	Objetivo General	16
4.2	Objetivos Específicos	16
CAPÍTULO II	MATERIALES Y METODOLOGÍA	17
5.	DIAGRAMAS	17
6.	MATERIALES	18
6.1	Algas	18
6.2	Enzimas	19
6.3	Microorganismos Fermentadores	19
6.4	Medio Básico 10X	19
7.	MÉTODOS	19
7.1	Hidrólisis ácida fuerte	19
7.2	Secado de la biomasa	20
7.3	Hidrólisis enzimática o sacarificación	20
7.4	Fermentaciones	21

7.4.1	Fermentación SHF usando <i>S. stipitis</i>	21
7.4.2	Fermentación y Sacarificación SSF usando <i>S. stipitis</i>	21
7.4.3	Fermentación y Sacarificación SSF secuencial usando <i>S. cerevisiae</i>	21
7.4.4	Fermentación SHF secuencial usando <i>S. stipitis</i>	22
7.4.5	Co-fermentación y Sacarificación simultánea con <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. stipitis</i> 22	
7.5	Medición Glucosa	22
7.6	Medición de xilosa.....	22
7.7	Medición de azúcares reductores.....	22
7.8	Medición de etanol	23
7.9	Cálculo de rendimientos.....	23
CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		24
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
8.1	Concentración de azúcares de las algas <i>M. pyrifera</i> y <i>U. rigida</i>	24
8.2	Sacarificación de estrategia SHF.....	27
8.2.1	Ensayos de sacarificación utilizando enzima β -1,3-glucanasa	29
8.3	Fermentación SHF y SSF utilizando <i>S. stipitis</i>	30
8.4	Fermentación simultánea y secuencial utilizando <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. stipitis</i> ...	33
CAPÍTULO IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		36
9.	CONCLUSIONES	36
10.	RECOMENDACIONES	38
BIBLIOGRAFÍA.....		40
ANEXOS		47
Anexo A. Proyecciones de uso de fuentes de energía para el año 2030		47
Anexo B. Macroalgas pardas, rojas y verdes		47
Anexo C. Estructura de la pared de las algas pardas		48
Anexo D. Estructuras moleculares de algunos monosacáridos		49
Anexo E. Fermentación		49
Anexo F. Descripción de diagramas de bloques		51
Anexo G. Medio de cultivo para <i>S. stipitis</i> y mantención de la cepa		52
Anexo H. Matrices modificados		52
Anexo I. Crecimiento <i>S. stipitis</i> y cálculo de concentración de biomasa		53
Anexo J. Curva de calibración para el método del DNS.....		54
Anexo K. Curva de calibración de etanol.....		55
Anexo L. Datos de las concentraciones de azúcares		56
Anexo M. Datos de sacarificaciones.....		56

Anexo N. Ensayos de Sacarificación con β -1,3-gluconasa BGLII	57
Anexo O. Datos de estrategias SHF y SSF	58
Anexo P. Datos de estrategias simultánea y secuencial.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Porcentajes de fuentes de energía utilizadas en el mundo el año 2011 [5].	1
Figura 2. Diagrama de bloques de la producción de etanol a partir de algas	5
Figura 3. Esquema genérico de la estructura de la pared celular de las macroalgas [52].	8
Figura 4. Estructura molecular de la celulosa.	9
Figura 5. Estructura molecular de un glucoronoxilano.	9
Figura 6. Estructuras moleculares de amilopectina y laminarina.	10
Figura 7. Estrategias de fermentación	12
Figura 8. Diagrama de bloques de las etapas realizadas para la determinación de la concentración de azúcares en las algas <i>Ulva rigida</i> y <i>Macrocystis pyrifera</i>	17
Figura 9. Diagrama de bloques de los pasos realizados para las estrategias SSF y SHF utilizando <i>S. stipitis</i> .	17
Figura 10. Diagrama de bloques de los pasos realizados para las fermentaciones secuencial y simultánea utilizando <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. stipitis</i> .	18
Figura 11. Concentración de azúcares reductores totales y material insoluble de las algas <i>M. pyrifera</i> y <i>U. rigida</i> como % del peso seco del alga.	24
Figura 12. Porcentajes de glucosa, xilosa y otros azúcares dentro los azúcares totales.	25
Figura 13. Cinética de liberación azúcares reductores durante la sacarificación de <i>U. rigida</i> en 4 y 70 [ml].	27
Figura 14. Cinética de liberación azúcares reductores, glucosa y xilosa a lo largo de la sacarificación.	28
Figura 15. a) Estrategia de fermentación SSF. b) Estrategia de fermentación SHF. Se utilizó <i>S. stipitis</i> . Se muestran las concentraciones de azúcares reductores, glucosa, xilosa y etanol.	30
Figura 16. Cinética de fermentación de xilosa por <i>S. stipitis</i> a 30°C, 250 [rpm].	32
Figura 17. a) Fermentación simultánea (co-fermentación) con <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. stipitis</i> . b) Fermentación secuencial primero con <i>S. cerevisiae</i> y luego <i>S. stipitis</i> .	33
Figura 18. Proyecciones en el uso de los distintos tipos de fuentes energéticas para el año 2030.	47
Figura 19. Alga parda <i>Macrocystis pyrifera</i> .	47
Figura 20. Alga roja <i>Palmaria palmata</i> .	48
Figura 21. Alga verde <i>Ulva rigida</i> .	48
Figura 22. Esquema de la estructura y composición de la pared celular de las algas pardas [52].	48
Figura 23. Estructuras moleculares de algunas hexosas.	49
Figura 24. Estructuras moleculares de algunas pentosas.	49
Figura 25. Vías metabólicas involucradas en la fermentación etílica. En azul se muestra la vía de las hexosas y en rojo la vía de las pentosas (adaptado de [60]).	50
Figura 26. Matraces Erlenmeyer modificados de 20 [ml].	52
Figura 27. Relación entre la concentración de levadura seca y la absorbancia medida a 600 [nm].	53
Figura 28. Curva de calibración para el método del DNS. Se usó glucosa como estándar.	54
Figura 29. Curva de calibración de etanol para el cromatógrafo de gases.	55
Figura 30. Azúcares reductores liberados durante los ensayos de sacarificación con β -1,3-glucanasa, Celluclast® y Novozyme®	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de los polisacáridos y monosacáridos mencionados que pueden ser encontrados en cada grupo de macroalgas.....	8
Tabla 2. Rendimientos de etanol (en [g] de etanol por [g] de alga seca) obtenidos en diversos estudios que han utilizado macroalgas como sustrato.....	14
Tabla 3. Condiciones utilizadas en los trabajos de C. Wilken [27] y G. Briones [24] que dieron mayores rendimientos de etanol.	14
Tabla 4. Composición referencial de la materia seca del alga <i>M. pyrifera</i> [37].	25
Tabla 5. Rendimientos de liberación de cada azúcar durante la sacarificación en función de los valores totales determinados previamente.....	28
Tabla 6. Rendimientos de etanol obtenidos con las estrategias SHF y SSF en base a la cantidad de alga utilizada, en base a los azúcares totales del alga y en base al máximo teórico.....	30
Tabla 7. Niveles máximos de etanol y rendimientos de las estrategias simultánea y secuencial.	33
Tabla 8. Algunos microorganismos fermentadores de pentosas y las condiciones óptimas de cultivo	49
Tabla 9. Concentraciones de azúcares de las algas en [g/g de alga seca].	56
Tabla 10. Concentraciones de azúcares reductores registrados durante las sacarificaciones en 4 [ml] y 70 [ml].....	56
Tabla 11. Concentraciones de azúcares reductores, glucosa y xilosa durante la sacarificación SHF.....	56
Tabla 12. Concentraciones de azúcares y etanol obtenidos de la fermentación SHF utilizando <i>S. stipitis</i>	58
Tabla 13. Concentraciones de azúcares y etanol obtenidos de la fermentación SSF utilizando <i>S. stipitis</i>	58
Tabla 14. Concentraciones de xilosa y etanol obtenidos de la fermentación de <i>S. stipitis</i> en un medio con xilosa como única fuente de carbono.....	58
Tabla 15. Concentraciones de azúcares y etanol obtenidos de la estrategia simultánea utilizando co-fermentación de <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. stipitis</i>	59
Tabla 16. Concentraciones de azúcares y etanol obtenidos de la estrategia secuencial realizando una fermentación SSF con <i>S. cerevisiae</i> , seguida de una fermentación con <i>S. stipitis</i>	59

NOMENCLATURA Y ABREVIATURAS

Abs.	Absorbancia
Az.	Azúcar(es)
Az. Red.	Azúcares reductores
CBP	Bioproceso consolidado
CBU	Micromoles de celobiosa convertida por minuto
D.E.	Desviación estándar
DNS	Ácido dinitrosalicílico
EtOH	Etanol
FPU	Micromoles de glucosa liberada por minuto
Glu	Glucosa
M.O.	Microorganismo
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
SHF	Sacarificación y Fermentación Separadas
SSF	Sacarificación y Fermentación Simultáneas
Xil	Xilosa

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN, MARCO TEÓRICO Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Escenario energético global

Desde el comienzo de su historia, el ser humano se ha vuelto cada vez más energético-dependiente, pasando por diversas fuentes de energía como la madera, el carbón, el gas natural, la energía nuclear y el petróleo. Esta dependencia de la energía nunca ha sido tan grande como lo es hoy en día, donde la electricidad es la base del desarrollo tecnológico y los combustibles fósiles son la base de la industria y el transporte.

Actualmente, el núcleo de la matriz energética es el petróleo. Éste existe en el planeta en una cantidad limitada y sus reservas son cada vez menores, estimándose su duración en no más de 100 años [1]. La disminución de las reservas de petróleo, sumado al rápido crecimiento de la población y su necesidad de energía, están generando un problema a nivel mundial.

Además de las crisis energéticas que podrán venir en el futuro, las principales fuentes de energía actuales son combustibles fósiles (petróleo, carbón y gas natural), los cuales liberan grandes cantidades de CO₂ a la atmósfera, siendo este gas uno de los principales contribuyentes del efecto invernadero y el calentamiento global. Los niveles de gases de invernadero han llegado a un nivel peligrosamente alto, de 450 [ppm] de CO₂ [2], razón por la que el uso de combustibles fósiles está siendo mundialmente aceptado como insostenible. Esto ha llevado a los gobiernos del mundo a tomar medidas para disminuir la dependencia de las reservas fósiles de combustible y potenciar nuevas fuentes de energía, permitiendo mantener la estabilidad económica y ambiental [3], lo que ha generado un creciente interés por encontrar y desarrollar fuentes que sean limpias, renovables y de bajo impacto en el medio ambiente.

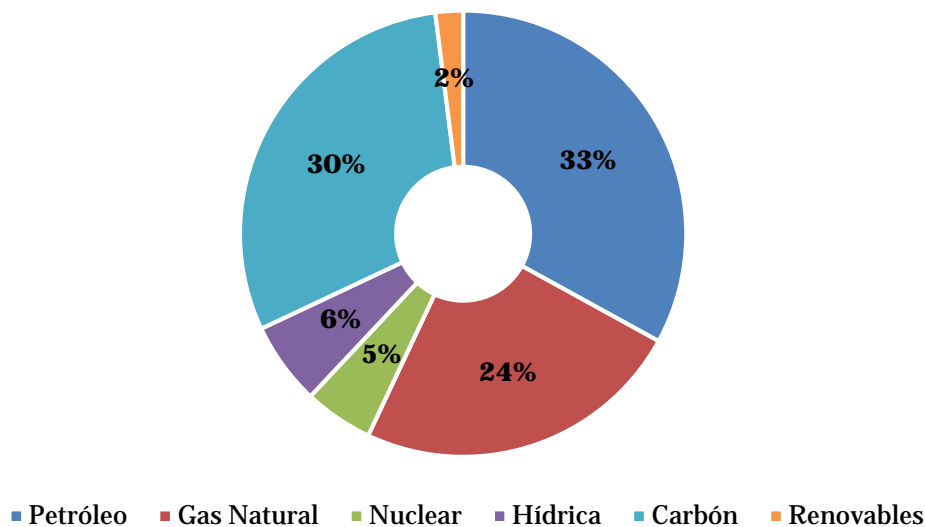


Figura 1. Porcentajes de fuentes de energía utilizadas en el mundo el año 2011 [5].

Las energías renovables, como su nombre lo indica, provienen de fuentes y recursos renovables en el corto plazo, cualidad fundamental que las diferencia de las fuentes no-renovables [4]. Dentro de éstas se tienen la energía hidráulica, solar, eólica, geotérmica, mareomotriz y de biomasa (o bioenergía), las cuales han ganado notoria importancia en las últimas décadas. En el año 2011, alrededor del 92% de la energía mundial provino de fuentes no-renovables (combustibles fósiles y nuclear), otro 6% de fuentes hídricas y el 2% restante de fuentes renovables, como biocombustibles, solar, entre otras (ver Figura 1) [5]. Entre los años 2011 a 2030 se espera que la participación de las fuentes renovables aumente dentro de la matriz energética mundial, pasando desde un 2% a un 5% (ver Anexo A) [6], generándose un gran espacio para la investigación, así como el desarrollo de la industria y nuevas tecnologías.

1.2 Biocombustibles

Dentro de las fuentes renovables de energía se encuentran los provenientes de biomasa o bioenergías. La bioenergía se define como cualquier forma de energía acumulada en materiales de origen biológico reciente [4]. Este material biológico o biomasa puede tener diversos orígenes, desde madera, desechos vegetales y cultivos convencionales hasta algas y estiércol de animales. Estos “biocombustibles” pueden ser clasificados ampliamente en dos categorías, primarios y secundarios. Los primarios son formas no procesadas de biocombustibles e incluyen leña, desechos animales, residuos agrícolas, pellets y chips de madera, los cuales son quemados principalmente para calefaccionar, cocinar y generar electricidad. Los secundarios son producidos al procesar la biomasa y abarca una amplia gama de productos como el biometanol, biohidrógeno, bioetanol, biodiesel y biogás [7]. Es relevante mencionar que los tres últimos son una alternativa atractiva a los combustibles provenientes del petróleo y gas ya que, por ejemplo, pueden ser utilizados para el transporte incurriendo en leves cambios de tecnología [3].

Los biocombustibles secundarios se han dividido en tres generaciones dependiendo del origen de la biomasa y la tecnología utilizada.

Los biocombustibles de primera generación provienen de cultivos alimenticios como caña de azúcar, soja y maíz. Estos poseen azúcares, almidón o aceites que son fáciles de obtener y transformar a combustibles; por medio de la fermentación de los azúcares se obtiene bioetanol y a través de la transesterificación de los aceites se puede obtener biodiesel, entre otros compuestos [4,7]. El problema que presenta la utilización de esta fuente de biomasa es que compite directamente con el mercado y el terreno agrícola destinado a la producción de alimentos, lo que ha provocado un aumento en el costo de ciertos cultivos [4,7,8].

Los biocombustibles de segunda generación son aquellos que provienen de desechos vegetales de la industria agrícola y forestal, así como cultivos dedicados (pastos forrajeros). A diferencia de los de primera generación, la materia prima para estos biocombustibles no compite con el mercado alimenticio. Este tipo de biomasa posee un alto contenido de celulosa la cual debe ser hidrolizada para obtener los azúcares fermentables, lo que dificulta su procesamiento y eleva los costos [9]. Sumado a esto, el mayor problema es la presencia de lignina, lo cual requiere de un exhaustivo pretratamiento del material [4,7].

Los biocombustibles de tercera generación son aquellos donde la materia prima para su producción proviene de micro o macroalgas. Su principal ventaja radica en la baja o nula cantidad de lignina en su estructura, permitiendo una obtención más fácil de los diversos compuestos de las algas. Además, su utilización para la producción de biocombustible no compite en gran medida con el mercado alimentario y no se necesita terreno para su cultivo pues crecen en el mar [10,11]. Otro hecho relevante, es la capacidad de las algas para remover enormes cantidades de CO₂ de la atmósfera, convirtiéndolo en biomasa y generando más oxígeno vía fotosíntesis que los bosques terrestres [12].

1.3 Bioetanol a partir de macroalgas

Se pueden distinguir dos grandes grupos de algas basados en su morfología y tamaño, microalgas y macroalgas. Las primeras corresponden a organismos fotosintéticos microscópicos, muchos de los cuales son unicelulares. Por otro lado, las macroalgas son organismos pluricelulares que forman estructuras parecidas a las raíces, troncos y hojas de las plantas superiores [9]. Las macroalgas tienen una eficiencia fotosintética del 6-8%, mientras que las plantas terrestres del 1,8-2,2% [13]. Además, las algas tienen la capacidad de crecer a gran velocidad y tener grandes rendimientos de biomasa. Este gran rendimiento se debe a que las macroalgas requieren de menos energía para producir su tejido estructural que las plantas terrestres, a su capacidad de absorber nutrientes sobre toda su superficie [9,14] y al hecho de que no tienen limitaciones de agua ni de nutrientes [13].

Las algas pueden producir carbohidratos, lípidos y proteínas en un corto periodo de tiempo, los cuales pueden ser utilizados para generar biocombustibles [13]. Aproximadamente entre el 20-30% de la biomasa de alga marina está constituida por celulosa o almidón, además de contener otros monosacáridos como glucosa, xilosa, galactosa, manitol, entre otros [11]. Otro factor importante es que contienen poco o nada de lignina, lo que facilita la obtención de los azúcares [15]. Algunas algas pueden llegar a un contenido de polisacáridos de un 70%, entre polisacáridos de la pared celular (celulosa, hemicelulosa, xilano y manitol), polisacáridos intracelulares (agar, carragenina y algín), y polisacáridos de almacenamiento (amino pectina, laminarina y almidón) [10].

La idea de producir bioetanol a partir de los carbohidratos presentes en las algas no es nueva. El concepto de usar algas como materia prima para la producción de energía data de finales de los años 50 [16], pero sólo en la última década ha adquirido real importancia. Actualmente existen numerosos estudios que han centrado sus esfuerzos en mejorar el proceso de producción de bioetanol a partir de algas, abarcando todas las etapas del proceso, desde el cultivo y cosecha del alga, los pretratamientos, la hidrólisis enzimática, la fermentación hasta la purificación del etanol [8-23].

A grandes rasgos, la producción de bioetanol a partir de algas consta de 3 etapas fundamentales: el pretratamiento, la sacarificación o hidrólisis enzimática y la fermentación etílica. Estos procesos son similares a los utilizados en la producción de bioetanol de 2^{da} generación. El pretratamiento tiene como fin debilitar y romper la malla formada por cadenas de celulosa, hemicelulosa u otros polímeros estructurales presentes en la biomasa, dejando estos polisacáridos expuestos para la sacarificación posterior. Dependiendo del alga y su composición, este pretratamiento puede no ser requerido [24].

Durante la sacarificación se utilizan enzimas, usualmente celulasas y celobiasas, para romper las uniones entre los monómeros de los polisacáridos estructurales, y así liberar los azúcares para que sean fermentados por algún microorganismo. La sacarificación puede realizarse de manera previa a la fermentación, estrategia llamada *Separate Enzymatic Hydrolysis and Fermentation (SHF)*, o de forma simultánea con la fermentación, *Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)*, cada cual con sus ventajas y desventajas. Finalmente la fermentación es la etapa en donde un microorganismo, usualmente levaduras o bacterias, convierte los azúcares liberados en los procesos anteriores en etanol.

Debido a la gran variedad de compuestos que conforman las algas, los microorganismos que serán utilizados durante la fermentación deben ser elegidos cuidadosamente para aprovechar al máximo los carbohidratos disponibles. Existen numerosos microorganismos capaces de fermentar azúcares (en su mayoría hexosa) y convertirlos a etanol, pero sólo algunos son capaces de utilizar pentosas para este fin. Por ejemplo, uno de los microorganismos más utilizados para producir etanol, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, es incapaz de utilizar xilosa y arabinosa (pentosas), fermentando sólo glucosa y manosa (hexosas) [25].

Dentro de los microorganismos que pueden utilizar pentosas durante la fermentación se encuentra la levadura *Scheffersomyces stipitis* (antiguamente *Pichia stipitis*), siendo uno de los más usados para este fin. También existen ciertos hongos filamentosos y bacterias (termófilas y mesófilas) que son capaces de utilizar pentosas [25]. Los hongos filamentosos tienen una baja velocidad de reproducción, largos tiempos de fermentación, baja tolerancia a los sustratos y secretan ácidos orgánicos, lo que los hace poco atractivos para la producción de etanol. En tanto, las bacterias tienen en general baja tolerancia al etanol y son poco sustrato-específicas [25]. Las levaduras se presentan como la mejor alternativa para la producción de etanol a gran escala por su alta tolerancia a éste (hasta un 17% v/v en cepas wild-type) [26], además de tener una velocidad de reproducción razonable y pueden ser cultivadas en solución.

1.4 Motivación

Para lograr un proceso de producción de bioetanol económicamente viable y sustentables se requiere inicialmente generar conocimiento básico sobre las algas a utilizar y las etapas que conforman el proceso productivo. La gran variedad de compuestos que conforman las algas hacen que la producción de bioetanol sea difícil de reproducir entre un alga y otra [22], por lo que es necesario investigar el proceso para cada alga y microorganismo utilizado.

En el Centro de Excelencia Académica en Ingeniería Bioquímica y Biotecnológica (CIByB) se han realizado anteriormente investigaciones sobre la producción de bioetanol utilizando las macroalgas *Ulva rigida* [24] y *Macrocystis pyrifera* [27] como sustratos. El microorganismo fermentador utilizado en ambos casos, *Saccharomyces cerevisiae*, no es capaz de transformar pentosas a etanol, por lo que se propone la utilización de *Scheffersomyces stipitis* con el fin de aprovechar las pentosas presentes en las algas y aumentar los rendimientos de bioetanol.

Existen trabajos que han utilizado exitosamente *S. stipitis* para la producción de etanol en material lignocelulósico [28-30] y en algas [19,21,22], pero en ninguno de estos casos se

ha utilizado las algas *U. rigida* o *M. pyrifera*. También existen estudios que han utilizado *S. cerevisiae* y *S. stipitis*, tanto en co-cultivo como de manera secuencial [30-33], por lo que además se pretende investigar la utilización de ambas cepas en la producción de bioetanol.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Bioetanol

El etanol o alcohol etílico es una molécula formada por una cadena de 2 átomos de carbono unidos por enlace simple donde uno de estos tiene enlazado un grupo hidroxilo, siendo su fórmula química $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$. Este compuesto se genera biológicamente a partir de la fermentación anaeróbica de azúcares como la glucosa utilizando microorganismos como *S. cerevisiae* y *Z. mobilis*, así como de la fermentación microaeróbica de xilosa por medio de *S. stipitis* [25].

Al ser producido para combustible, el etanol puede ser utilizado como oxigenante de gasolina en distintas proporciones, elevando el contenido de O_2 y permitiendo una mayor combustión de la misma. De esta forma se disminuyen las emisiones contaminantes de hidrocarburos que no son completamente oxidados [34]. Cuando esta proporción no supera el 10% p/p no se requiere realizar cambios en los motores convencionales, lo que permite disminuir el uso de combustibles fósiles. En caso de utilizar etanol en mayores proporciones o etanol puro como combustible, es necesario utilizar motores especialmente acondicionados para tal fin [35].

2.1.1 Producción de bioetanol

La producción de bioetanol utilizando macroalgas como materia prima es similar al proceso utilizado para la producción de bioetanol de segunda generación. En general, todos los procesos propuestos conservan la secuencia de etapas que se muestra en la Figura 2 [18,36-38].

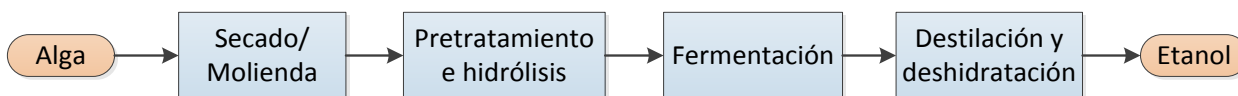


Figura 2. Diagrama de bloques de la producción de etanol a partir de algas (adaptado de [37]).

Inicialmente el material es secado para facilitar la molienda y así disminuir el tamaño de las partículas. Luego, en caso de requerirlo, la biomasa es pretratada utilizando alguno de los muchos pretratamientos existentes, los cuales pueden ser físicos, físico-químicos, químicos o biológicos. Dentro de los físicos se encuentran el pulverizado, la pirólisis y la homogenización de alta presión. Entre los físico-químicos se encuentran la explosión a vapor, la explosión con fibra de amoníaco y la explosión con CO_2 . Los pretratamientos químicos pueden ser la ozonólisis, la hidrólisis con ácido concentrado y diluido, la hidrólisis alcalina, la deslignificación oxidativa y la utilización de líquidos iónicos. Finalmente, entre los biológicos está la utilización de hongos y algunas bacterias [34,39,40]. El principal objetivo de esta etapa es romper las uniones entre los polisacáridos y desestabilizar la estructura cristalina de las fibras de celulosa, lignina, hemicelulosa o algún otro heteropolisacárido que componga la pared de las algas. De esta

forma, se tendrá una mayor disponibilidad de sustratos para las enzimas durante la hidrólisis enzimática y se aumenta la liberación de monosacáridos fermentables. Uno de los problemas de esta etapa es que muchos de estos pretratamientos generan inhibidores que afectan la sacarificación y la fermentación por lo que el material debe ser detoxificado [34].

Si el pretratamiento no es capaz de liberar cantidades óptimas de monosacáridos fermentables, se requiere de una hidrólisis enzimática. En esta etapa, el material es tratado con enzimas que son capaces de romper los enlaces que unen internamente a los polisacáridos del alga. Usualmente estas enzimas son celulasas y celobiasas, pero dependiendo de la composición del alga se pueden requerir xilanasas, pectinasas o β -glucanasas especializadas, entre otras [25]. Esta etapa puede ser realizada separadamente o en conjunto con la fermentación.

La fermentación es la etapa en donde se utiliza un microorganismo que sea capaz de metabolizar los azúcares liberados y convertirlos a etanol. Existe un gran número de levaduras y bacterias que son capaces de realizar esta transformación, siendo la más común la levadura *S. cerevisiae*. Luego de una separación, la fracción líquida del caldo de fermentación debe ser destilada para separar el etanol. Finalmente, éste es deshidratado para alcanzar el 99,9% de pureza que se requiere para ser usado como combustible [37].

2.1.2 Biorefinería

Una biorefinería es una instalación que integra los procesos y equipos para la conversión de biomasa a combustibles, energía y compuestos de valor agregado, con el fin de aprovechar al máximo la materia prima renovable y disminuir al mínimo los desechos [41]. Actualmente, la mayoría de las propuestas para la producción del etanol a nivel industrial se enmarcan en este concepto pues permiten la sustentabilidad económica del proceso mediante la integración energética y la venta de los compuestos de valor agregado.

Las algas poseen diversos compuestos valiosos que pueden ser extraídos antes, durante o después del proceso de producción de etanol. Entre estos se encuentran compuestos orgánicos como algunas proteínas y compuestos fenólicos con actividad farmacológica, alginatos, laminarina, manitol y fucoidanos, entre muchos otros, además de compuestos inorgánicos como potasio y yodo [37,38,42]. Los desechos sólidos generados durante la producción de etanol pueden ser utilizados para generar energía calórica que se reintegra al proceso.

2.2 Macroalgas

Las macroalgas son organismos eucariontes pluricelulares similares a las plantas superiores terrestres, pues muchas poseen una pared celular rígida basada en celulosa y acumulan almidón intracelular como principal carbohidrato de almacenamiento [10]. Se pueden distinguir 3 grandes grupos de macroalgas clasificados en base a su color, aunque las diferencias son aún más sustanciales que la pigmentación [43]. Los grupos de macroalgas son las pardas (Phaeophyceae), rojas (Rhodophyta) y verdes (Chlorophyta). Estos grupos difieren en estructura y composición bioquímica, como el tipo de pigmento fotosintético, los compuestos de almacenaje, la composición de la pared celular, las conexiones intercelulares y la estructura del cloroplasto, entre otros.

Las *macroalgas pardas* se caracterizan por ser casi exclusivamente marinas, pues sólo se conocen pocas especies de agua dulce. Existen alrededor de 1.800 especies de algas pardas que se distribuyen mayoritariamente en zonas polares, boreales y templadas, aunque también crecen en aguas tropicales. La combinación de pigmentos fotosintéticos (clorofila, fucoxantina y diatoxantina) les permite realizar la fotosíntesis a diferentes niveles de profundidad en el océano, incluso donde sólo llegan las longitudes más cortas de la luz solar. El carbohidrato de reserva principal de las algas pardas es la laminarina, un polisacárido de glucosa. Además de celulosa, la pared celular contiene ácido algínico (algín) y sales sulfatadas, los cuales dan resistencia y flexibilidad al alga, ayudándole a resistir las tensiones provocadas por las olas y corrientes marinas. Los alginatos pueden llegar a constituir entre el 20-40% del peso seco del alga, siendo extraídos para utilizarlos como aglutinantes y espesantes en diversos productos alimenticios [43,44]. En resumen, los azúcares más abundantes de las algas pardas son el alginato, manitol y glucanos (polímeros de glucosa en forma de laminarina o celulosa) [20]. Éstas también contienen heteropolisacáridos sulfatados que consisten en glucosa, galactosa, manosa, xilosa, arabinosa, fucosa, ramnosa, entre otros [22]. Algunos ejemplos de algas pardas son *Saccharina japónica*, *Ascophyllum nodosum* y *Macrocystis pyrifera* (ver Anexo B).

Las *macroalgas rojas* son mayoritariamente marinas, existiendo alrededor de 6.500 especies que se distribuyen en zonas costeras tropicales y templadas. La coloración de estas algas se debe a la gran cantidad de pigmentos presentes en sus plastidios, en su mayoría ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina. Estos pigmentos les permiten vivir a grandes profundidades pues son capaces de captar las longitudes de onda más bajas (azules y verdes). Las algas rojas, además de ocupar el carbono en la fotosíntesis, tienen un mecanismo adicional para absorber el carbono mediante el proceso de calcificación. El calcio es depositado en la pared de la célula en forma de carbonato de calcio, jugando un papel importante en la formación de los arrecifes. La pared celular de estas algas está compuesta de pequeñas cantidades de celulosa y cantidades mayoritarias de polímeros de galactosa sulfatados y mucílagos. Estos compuestos son extraídos para obtener agentes gelificantes de alto valor económico, principalmente agar, agarosa y carragenanos. También es posible encontrar mananos sulfatados y xilanos en lugar de los galactanos como principal componente estructural. Las reservas de alimento de las algas rojas se almacenan en la forma de almidón florideano [43,45-47]. Algunas ejemplos de algas rojas son *Chondrus crispus*, *Mastocarpus stellatus* y *Palmaria palmata* (ver Anexo B).

Las *macroalgas verdes*, debido a su diversidad morfológica, son capaces de vivir en ambientes marinos como en agua dulce, así como en ambientes terrestres e incluso en los suelos desérticos. Se tienen registros de aproximadamente 4.500 especies de estas algas y sus pigmentos fotosintéticos corresponden a clorofila (en las mismas proporciones que las plantas superiores), β -caroteno y varios xantófilos. El polisacárido de almacenamiento utilizado por estas algas es almidón verdadero y su pared celular está compuesta mayoritariamente por celulosa. La pared puede presentar otros heteropolisacáridos complejos sulfatados constituidos principalmente por ácido glucurónico, ramnosa, arabinosa, galactosa, manosa y xilosa. Uno de estos polisacáridos es el *Ulvan*, el cual es muy común en este tipo de algas [42,48,49]. Algunas ejemplos de macroalgas verdes son *Caulerpa taxifolia*, *Chaetomorpha moniliger* y *Ulva rigida* (ver Anexo B).

La macroalga parda *Macrocystis pyrifera* y la verde *Ulva rigida* crecen en las costas chilenas [50,51], por lo que ambas se consideran como posibles sustratos para esta

investigación. Se muestra en la Tabla 1 un resumen de los polisacáridos y monosacáridos mencionados anteriormente, y que pueden ser encontrados en cada grupo de macroalgas.

Tabla 1. Resumen de los polisacáridos y monosacáridos mencionados que pueden ser encontrados en cada grupo de macroalgas.

Algas Pardas		Algas Rojas		Algas Verdes	
Polímeros	Monómeros	Polímeros	Monómeros	Polímeros	Monómeros
Celulosa	Glucosa	Celulosa	Glucosa	Celulosa	Glucosa
Laminarina	Galactosa	Almidón florideano	Galactosa	Almidón	Galactosa
Hemicelulosa	Xilosa	Agarosa	Xilosa	Xilanos	Xilosa
Alginatos	Manosa	Carragenanos	Manosa	Mananos	Manosa
	Manitol	Hemicelulosa	Ramnosa	Pectina	Arabinosa
	Arabinosa	Mananos		Ulvan	Ramnosa
	Fucosa	Xilanos			
	Ramnosa				

2.2.1 Estructuras presentes en las algas

Las algas tienen una estructura de pared celular similar a las plantas terrestres, pero su composición varía notoriamente entre los distintos grupos de algas. En general, todas poseen celulosa y otros heteropolisacáridos como hemicelulosas, pectina, entre otros. Un esquema aproximado de la pared celular de las macroalgas se muestra en la Figura 3 y un esquema particular para las algas pardas se muestra en el Anexo C. A continuación, se detallarán las características de algunos de estos polisacáridos estructurales y de almacenamiento.

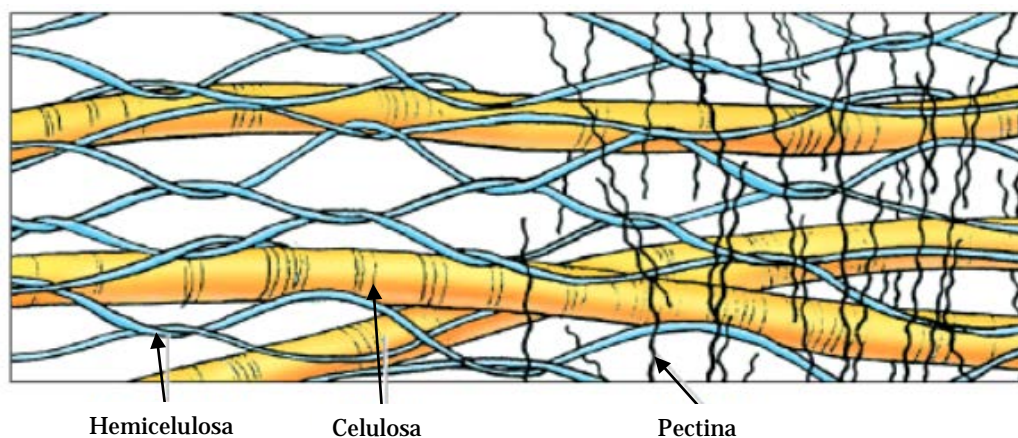


Figura 3. Esquema genérico de la estructura de la pared celular de las macroalgas [52].

La celulosa es uno de los componentes más importantes de la pared celular. Es un polisacárido estructural cristalino conformado por unidades de D-glucosa (hexosa) unidas por un enlace β -1,4-glucosídico como se muestra en la Figura 4. Cada molécula de glucosa está accesible a glicosilaciones en los carbonos 2, 3 y 6. Además, las cadenas lineales de celulosa poseen extremos reductores y no-reductores, zonas donde comienza el ataque de las enzimas celulolíticas (celulasas). Las hebras de celulosa interactúan entre sí a través

de puentes de hidrógeno, dándole la característica de insolubilidad y permitiéndole formar estructuras cristalinas de microfibras [53,54]. Esta característica dificulta la acción de las celulasas y entorpece su procesamiento para la producción de etanol.

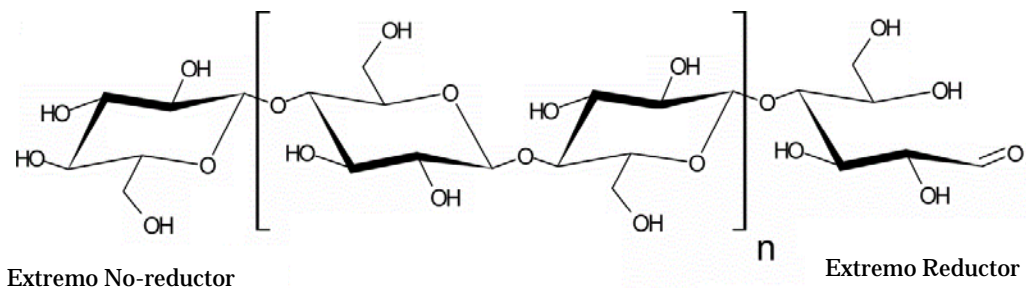


Figura 4. Estructura molecular de la celulosa.

Las hemicelulosas son un grupo de heteropolisacáridos estructurales similares a la glucosa con uniones mayoritariamente β -1,4 enlazando sus monómeros y que pueden presentar ramificaciones. Dentro de este grupo de polisacáridos se encuentran los xiloglucanos, arabinoxilanos, glucuronoxilanos, xilanos, mananos, glucomanos y galactoglucomanos. Los principales monómeros de estas cadenas son xilosa, manosa, galactosa, ramnosa y arabinosa, siendo la xilosa el que se encuentra en mayor cantidad. Estas estructuras son insolubles en agua y forman fuertes asociaciones no-covalentes con las microfibras de celulosa, siendo su rol principal dar mayor resistencia a la pared [55]. Los xiloglucanos son las hemicelulosas más abundantes en la pared celular y están compuestos mayoritariamente por xilosa. En la Figura 5 se muestra la estructura de un glucuronoxilano.

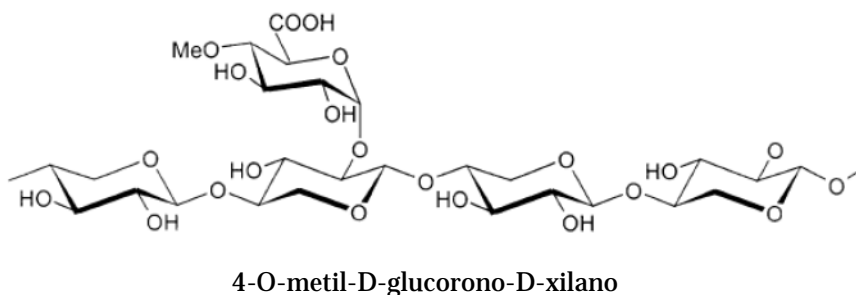


Figura 5. Estructura molecular de un glucuronoxilano.

Entre los polímeros de almacenamiento más importantes se encuentran el almidón y la laminarina. El almidón está compuesto por moléculas de amilosa y amilopectina. La primera se conforma de monómeros de glucosa unidos por un enlace α -1,4, mientras que la amilopectina se compone de secciones lineales de glucosa enlazadas α -1,4 y ramificaciones con enlaces α -1,6. La laminarina es un polímero lineal de glucosas unidas por enlaces β -1,3 alternados con enlaces β -1,6, con poca presencia de ramificaciones. Tiene un peso molecular bajo y forma estructuras complejas entre cadenas de laminarina por medio de puentes de hidrógeno [42]. En la Figura 6 se aprecia la estructura molecular de la amilopectina y laminarina.

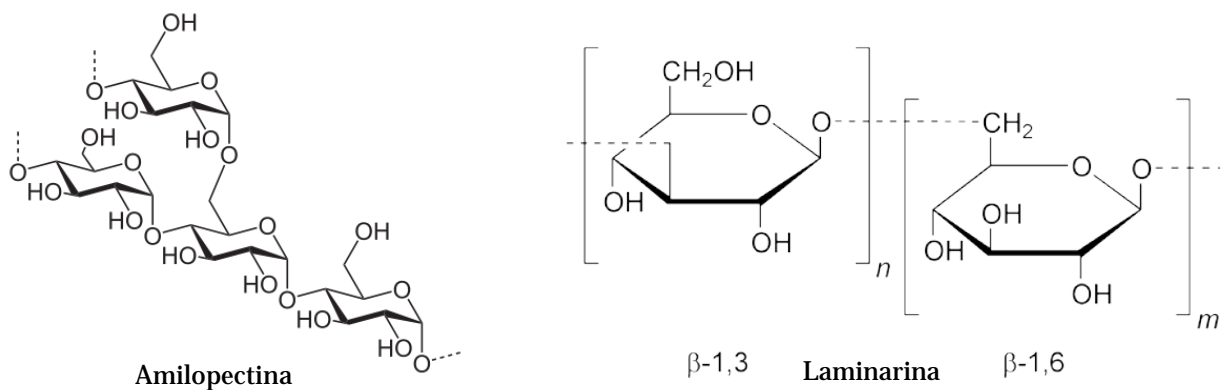


Figura 6. Estructuras moleculares de amilopectina y laminarina.

Las estructuras moleculares de los monosacáridos que conforman gran parte de estos polímeros estructurales y de almacenamientos se muestran en el Anexo D.

2.3 Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática o sacarificación es un proceso mediante el cual se liberan los azúcares fermentables contenidos en los polisacáridos de la biomasa. Este proceso está mediado por enzimas que catalizan la reacción de degradación de estos polímeros a sus monómeros. Dependiendo de las características de la biomasa, la liberación de los azúcares fermentables puede llevarse a cabo sólo con el pretratamiento, sólo con hidrólisis enzimática o utilizando secuencialmente ambas técnicas. En comparación con técnicas como la hidrólisis ácida, las ventajas de utilizar enzimas para hidrolizar los polisacáridos son principalmente las suaves condiciones de reacción y la baja o nula formación de productos inhibidores, mientras que las desventajas son el largo tiempo de reacción, el alto costo y la inhibición por productos de las enzimas [56]. Además, existen ventajas ambientales pues no se generan residuos industriales líquidos con pH muy ácido, como es el caso de la hidrólisis ácida.

Los complejos enzimáticos normalmente utilizados para degradar celulosa se componen de endoglucanasas, exoglucanasas (celulasas) y β -1,4-glucosidasas (celobiasas). Las endoglucanasas actúan sobre las regiones amorfas y de baja cristalinidad de la celulosa, atacando el enlace β -1,4-glucosídico presente entre las unidades de glucosa. Esto permite acortar la cadena de glucosa y aumentar la cantidad de extremos no-reductores disponibles. Las exoglucanasas atacan las cadenas de celulosa por el extremo no-reductor, liberando dímeros de glucosa (celobiosa) y monómeros de glucosa. Finalmente, las β -1,4-glucosidasas son las encargadas de romper el enlace β -1,4 de la celobiosa, liberando glucosa [57,58].

Debido a que las algas presentan numerosos tipos de polisacáridos además de celulosa, muchas veces se requiere de enzimas específicas para romper estos polímeros. Uno de estos grupos de enzimas son las hemicelulasas, que incluyen xilanasas y arabinofuranosidasas, entre otras [59]. La acción coordinada de estas enzimas es necesaria para obtener rendimientos satisfactorios de pentosas desde el material hemicelulósico [25]. Los procesos de hidrólisis enzimática se llevan a cabo normalmente a pH cercano a 5, a temperaturas entre los 45 a 50°C, 150 a 250 [rpm] y con tiempos de

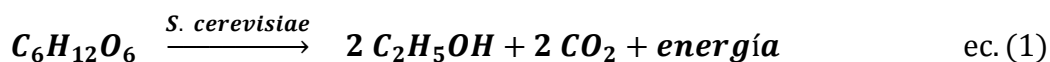
reacción de 70 a 100 horas [53]. En general, estas condiciones dependerán de las condiciones óptimas de las enzimas utilizadas.

2.4 Fermentación

La fermentación es un proceso catabólico de oxidación incompleta realizado por microorganismos para obtener energía a partir de una fuente de carbono. En la fermentación etílica, en particular, se utilizan carbohidratos (azúcares) para ser convertidos en etanol y obtener energía. Este proceso bioquímico es realizado por algunas bacterias y levaduras a distintas condiciones y temperaturas. La mayoría de estos microorganismos fermentadores son capaces de fermentar hexosas como la glucosa, pero sólo algunos tienen las vías metabólicas para fermentar pentosas como la xilosa u otros azúcares (ver esquema generalizado de vías metabólicas utilizadas para fermentar algunos azúcares en Anexo E [60]).

2.4.1 Fermentación de hexosas

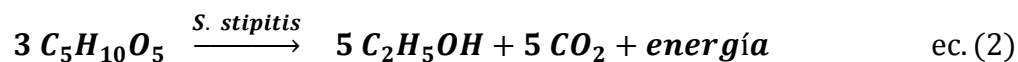
La fermentación alcohólica de hexosas es realizada por levaduras (como *S. cerevisiae*) y bacterias (como *Z. mobilis*) en ausencia de oxígeno. Durante ésta, los azúcares son transformados a etanol y CO₂, liberando energía (1 mol de glucosa libera 26,3 [kcal]) que es utilizada por los microorganismos. La reacción llevada a cabo se muestra en la siguiente ecuación [37].



A partir de esta ecuación, se obtiene el rendimiento máximo teórico de etanol a partir de hexosas: 0,51 [g] de etanol por 1[g] de hexosa asimilada.

2.4.2 Fermentación de pentosas

Dentro de los azúcares que se liberan durante la hidrólisis de los polisacáridos que componen las estructuras de las algas están las pentosas. Estas constituyen un alto porcentaje de los azúcares disponibles para la producción de etanol, pero los microorganismos convencionales (*S. cerevisiae*) no son capaces de fermentarlos. Por esto, para aumentar los rendimientos de etanol, las investigaciones se han centrado en utilizar o desarrollar microorganismos que sean capaces de utilizar la mayor cantidad de monosacáridos durante la fermentación. Existen varios organismos como levaduras, hongos filamentosos y bacterias que tienen las vías metabólicas para transformar las pentosas a etanol (ver listado en Anexo E [25]). Estas levaduras, en particular, requieren de pequeñas cantidades de oxígeno para fermentar pentosas [25]. Dentro de éstas se encuentra la levadura *Scheffersomyces stipitis* (o *Pichia stipitis*). La reacción llevada a cabo durante la fermentación de pentosas se muestra en la siguiente ecuación [37].



A partir de esta ecuación, se obtiene el rendimiento máximo teórico de etanol a partir de pentosas: 0,51 [g] de etanol por 1[g] de pentosa asimilada. A pesar de que el rendimiento de pentosa a etanol es igual que a partir de hexosas, la eficiencia y la velocidad de conversión a etanol son menores pues involucran mayores pasos en las vías metabólicas y la pérdida de carbonos hacia masa celular [61].

2.4.3 Estrategias de fermentación

Existen distintas estrategias que permiten producir bioetanol a través de la fermentación etílica, cada una con ventajas y desventajas, por lo que su elección se basa en la que permita obtener los mayores rendimientos de etanol. Las estrategias son numerosas y variadas, pero se pueden resumir en cuatro fundamentales, las cuales se muestran en el diagrama de la Figura 7 [60].

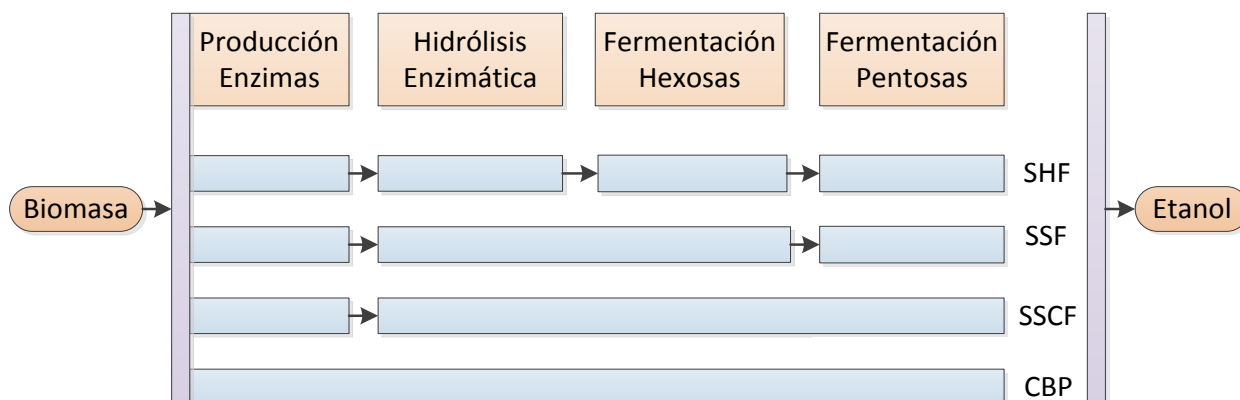


Figura 7. Estrategias de fermentación. *SHF*: Separate Hydrolysis and Fermentation. *SSF*: Simultaneous saccharification and fermentation. *SSCF*: Simultaneous saccharification and co-fermentation. *CBP*: Consolidated bioprocessing (adaptado de [60]).

El *CBP* o *Bio-proceso Consolidado* es la estrategia de fermentación en la que se realizan los 4 procesos fundamentales (producción de enzimas, sacarificación, fermentación de hexosas y pentosas) en un mismo reactor. Esta estrategia reduce enormemente los costos de enzimas y equipos, pero se debe contar con un microorganismo o comunidad de ellos que sean capaces de producir las enzimas celulolíticas y fermentar tanto hexosas como pentosas [56]. En esta estrategia, los microorganismos generan sus propias enzimas hidrolíticas, mientras que en las demás estrategias se deben producir paralelamente al proceso de producción de etanol.

El *SHF* o *Hidrólisis Enzimática y Fermentación Separadas* es una estrategia en donde la fermentación y la sacarificación ocurren en equipos distintos, es decir, primero se realiza la sacarificación para liberar los azúcares y luego la fermentación de éstos. La fermentación de hexosas se puede hacer en conjunto con la de pentosas o en equipos separados. La principal ventaja de este método es que cada operación se puede realizar en sus propias condiciones óptimas. La temperatura óptima de la sacarificación se encuentra entre los 45 a 50°C, pH ~5, mientras que las condiciones de fermentación dependen del microorganismo utilizado, normalmente entre 35 a 40°C. Sus desventajas están dadas por la inhibición por producto de las celulasas, principalmente por celobiosa y glucosa, y también por la inhibición de las celobiasas por glucosa. Otro factor negativo, es el largo tiempo de reacción y la imposibilidad de esterilizar las enzimas, lo que aumenta el riesgo de contaminación con otros microorganismos [56].

El *SSF* o *Sacarificación y Fermentación Simultáneo* es uno de los métodos más exitosos en la producción de etanol. En el proceso se combinan las etapas de sacarificación y fermentación utilizando un microorganismo fermentador de hexosas. La fermentación de

pentosas puede realizarse posteriormente o de manera paralela, en caso de que se haya separado la hemicelulosa previamente. Sus ventajas radican en varios puntos: 1) la disminución de la inhibición de las enzimas debido al rápido consumo de los azúcares simples por parte del microorganismo fermentador, 2) al no separar la fracción sólida de la líquida se disminuye la pérdida de los azúcares que puedan quedar retenidos en el sólido, 3) se disminuye la acumulación de compuestos inhibitorios, y 4) se disminuyen los costos en equipamientos pues sólo se requiere de un reactor, lo que además, implica disminuir la posibilidad de contaminación. La principal desventaja está en la dificultad de realizar la sacarificación y la fermentación en sus temperaturas óptimas, pues la primera ronda los 50°C mientras que la fermentación es cercana a los 30-40°C. Muchas investigaciones se han centrado en desarrollar o encontrar organismos termófilos que produzcan etanol eficientemente a los 50°C, pues usualmente es la sacarificación el paso limitante [4,56].

El *SSCF* o *Sacarificación y Co-fermentación Simultáneos* se considera una mejora de la *SSF*. Es un modo de operación en el que se realiza la sacarificación y la fermentación de pentosas y hexosas de manera simultánea, por lo que se debe utilizar una cepa capaz de utilizar ambos azúcares o el co-cultivo de 2 microorganismos, uno fermentador de hexosas y otro de pentosas [4,56].

Existen muchas variaciones de estas estrategias como, por ejemplo, realizar fermentaciones secuenciales utilizando primero un microorganismo que utilice las hexosas y luego uno que utilice las pentosas. En este trabajo se utilizarán las estrategias SHF, SSF, la co-fermentación y la fermentación secuencial.

2.4.4 *Scheffersomyces stipitis*

Una de los microorganismos fermentadores de pentosas más importantes es la levadura *Scheffersomyces stipitis*. Ésta tiene la capacidad de catabolizar glucosa, manosa, galactosa, ramnosa, xilosa, arabinosa, celobiosa e incluso algunos compuestos relacionados a la lignina. Otra ventaja son los altos niveles de rendimiento de etanol logrados utilizando xilosa, llegando hasta 0,48 [g] de etanol por [g] de xilosa [61]. La tolerancia al etanol de *S. stipitis* es cercana a los 30 [g/l], siendo éste el valor crítico sobre el cual las células no son capaces de crecer [62]. Además, tiene un rango de temperatura óptima para la fermentación de pentosas de 28 a 32°C y pH entre 3 a 7 [19]. También existen antecedentes de que esta cepa de levadura requiere de condiciones microaeróbicas para realizar de manera eficiente la fermentación de las xilosas a etanol [19,22,62].

2.4.5 *Saccharomyces cerevisiae*

Esta levadura es el microorganismo clásico para la producción de etanol. Puede fermentar anaeróbicamente hexosas como glucosa y manosa, pero es incapaz de fermentar pentosas. Las condiciones óptimas para la fermentación con esta cepa son entre 30 a 35°C y pH entre 3 a 7. Se han realizado muchos estudios enfocados en el aumento de la producción y su tolerancia al etanol, así como en el desarrollo de cepas recombinantes capaces de utilizar pentosas [19].

A continuación, se muestran antecedentes de trabajos previos que fueron considerados para la planificación y desarrollo de este estudio.

3. ANTECEDENTES DE TRABAJOS PREVIOS

Existen numerosos estudios que han utilizado diversas especies de algas pardas, rojas y verdes para producir etanol los cuales proponen distintos métodos y microorganismos [10,11,14,18-22,24,27,36]. La Tabla 2 muestra las algas, los microorganismos utilizados y los rendimientos de etanol obtenidos por algunos de estos estudios.

Tabla 2. Rendimientos de etanol (en [g] de etanol por [g] de alga seca) obtenidos en diversos estudios que han utilizado macroalgas como sustrato.

Macroalga	Grupo	Microorganismo	Rendimiento [g/g de alga seca]	Referencia
<i>Gracilaria salicornia</i>	Roja	<i>E. coli</i> KO11	0,079	[10]
<i>Saccharina japonica</i>	Parda	<i>E. coli</i> BAL1611	0,281	[20]
<i>Saccharina japonica</i>	Parda	<i>S. stipitis</i> (KCTC7228)	0,030	[21]
<i>Saccharina japonica</i>	Parda	<i>D. occidentalis</i> (KCTC7196)	0,110	[21]
<i>Ulva rigida</i>	Verde	<i>S. cerevisiae</i> (Red Star)	0,096	[24]
<i>Macrocystis pyrifera</i>	Parda	<i>S. cerevisiae</i> (Red Star)	0,080	[27]

Estos estudios confirman que es posible obtener etanol a partir de biomasa de algas, pero se requiere de más estudios para optimizar los procesos y lograr rendimientos económicamente viables.

En el trabajo de C. Wilken [27] se produjo etanol utilizando como materia prima el alga parda *M. pyrifera* y el microorganismo fermentador *S. cerevisiae*. Se obtuvieron niveles de etanol cercanos a los 0,080 [g/g alga] usando pretratamiento con ácido diluido y la estrategia SSF. Por otro lado, en los estudios de G. Briones [24] se trabajó con el alga verde *U. rigida* y la levadura *S. cerevisiae*, obteniéndose 5 [g/l] de etanol y llegando a rendimientos de 0,096 [g/g alga] usando la estrategia SSF. La biomasa de *U. rigida* no requirió de pretratamiento previo. Las condiciones utilizadas en estos estudios se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones utilizadas en los trabajos de C. Wilken [27] y G. Briones [24] que dieron mayores rendimientos de etanol.

	C. Wilken	G. Briones	Unidades
Estrategia	SSF	SSF	
Alga	<i>M. pyrifera</i>	<i>U. rigida</i>	
Organismo	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	
Pretratamiento	Hidrólisis ácida	No	
Tamaño de partículas	2,8 - 3,5	Polvo fino	[mm]
Carga de sustrato	2,5	5	% p/v
Carga celulosa	37	20	[FPU/g alga]
Carga celobiosa	37	20	[CBU/g alga]
Inóculo	10	10	[g/l]
Temperatura	40	40	°C
pH	4,8	4,8	
Agitación	250	250	[rpm]
Tiempo de operación	96	72	[h]
Volumen de reacción	20	20	[ml]

La desventaja de utilizar pretratamientos es la posible formación de inhibidores durante el proceso. Para el caso de hidrólisis ácida a alta temperatura, existe la posibilidad de formación de furfurales derivados de pentosas [7]. Los trabajos de G. Briones [24] determinaron que el pretratamiento con ácido diluido sobre *U. rigida* tiene efectos negativos en el rendimiento de la hidrólisis enzimática, obteniéndose los mejores niveles de etanol con el material sin pretratar. Esto concuerda con otro trabajo en el que se ha producido etanol exitosamente a partir de *Ulva* spp. (Sea lettuce) sin la necesidad de pretratamientos [63]. Este hecho resulta beneficioso pues se reducirían los costos de producción de bioetanol al utilizar *U. rigida*. En cambio, los trabajos de C. Wilken [27] determinaron que se requiere de pretratamiento con ácido diluido al utilizar *M. pyrifera*. Además, en estos estudios de producción de etanol a partir de algas [24,27] se encontró que la estrategia de SSF daba mejores resultados que la SHF, utilizando *S. cerevisiae*.

Con respecto a la sacarificación, se tiene que las cargas enzimáticas habituales para tratar material lignocelulósico están dentro del rango de 10 a 30 [FPU/g material], la temperatura óptima es de 50°C, el pH óptimo es de 4,8 y el tiempo de operación va de 48 a 72 [h] [64]. La estrategia SSF utiliza la misma carga enzimática, pero el pH, temperatura y tiempo de operación dependerán del microorganismo fermentador. Otros estudios han utilizado cargas enzimáticas mayores pues altos niveles de enzimas pueden aumentar el rendimiento de la sacarificación y la fermentación SSF, pero aumentan considerablemente los costos asociados a la producción de etanol.

En relación a las estrategias usadas para la producción de etanol, se tienen antecedentes en los que se han usado co-cultivos de *S. cerevisiae*, *S. stipitis* u otra combinación de especies para la producción de etanol de segunda generación [31]. Dentro de los obstáculos se tiene que la fermentación de xilosa es más lenta que la glucosa, por lo que los microorganismos fermentadores de pentosas pueden ser inhibidos por etanol antes de comenzar a utilizar xilosa. También existe una represión por glucosa en la utilización de xilosa por *S. stipitis*. [68,69]

Otra restricción asociada al uso de *S. stipitis* está relacionada al ajuste de la aireación, pues su ausencia impide la fermentación de las pentosas y un exceso promueve la formación de biomasa en detrimento de la producción de etanol. Se suma a esto la sensibilidad de la levadura a inhibidores en el hidrolizado [4,30,31]. Las condiciones de oxigenación de *S. stipitis* para la fermentación de xilosas se han sido estudiadas por G. Skoog [65], mientras que las condiciones de pH y temperatura por P.J. Slininger [66]. Para estas variables, en este estudio se usaron valores dentro de los rangos determinados por estos trabajos.

Sobre el alga *Ulva rigida* se conoce el dato de los azúcares reductores, los cuales fueron medidos por R. González (2012 – Comunicación personal) y usados por G. Briones [24]. Esta estimación fue realizada mediante hidrólisis ácida fuerte (72% ácido sulfúrico) y midiendo los azúcares con el método del DNS. Los valores reportados fueron de 368 [g] de azúcares reductores por [kg] de biomasa.

La información presentada en las Secciones 2 y 3 fue considerada para las discusiones y conclusiones de los resultados de este estudio.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

- Estudiar la producción de etanol derivada de la fermentación de los azúcares desde biomasa de alga utilizando *Scheffersomyces stipitis*.

4.2 Objetivos Específicos

- Determinar y comparar las concentraciones de glucosa, xilosa y azúcares reductores de las algas *Ulva rigida* y *Macrocystis pyrifera*, para elegir la más apropiada para continuar con la producción de etanol.
- Determinar cuál estrategia de fermentación (SSF o SHF) entrega mayores niveles de etanol utilizando *S. stipitis* y el alga elegida en el punto anterior.
- Estudiar la producción de etanol utilizando una estrategia de fermentación secuencial y otra simultánea (co-fermentación) con *S. cerevisiae* y *S. stipitis*.

CAPÍTULO II MATERIALES Y METODOLOGÍA

5. DIAGRAMAS

A continuación se muestran los diagramas de bloques que representan los pasos y etapas realizados durante el desarrollo del presente estudio. La descripción de los diagramas se encuentra en el Anexo F.

5.1 Determinación de la concentración de azúcares en las algas *Ulva rigida* y *Macrocystis pyrifera*

La Figura 8 muestra el procedimiento para determinar las concentraciones de azúcares reductores, glucosa y xilosa de las algas *U. rigida* y *M. pyrifera*.

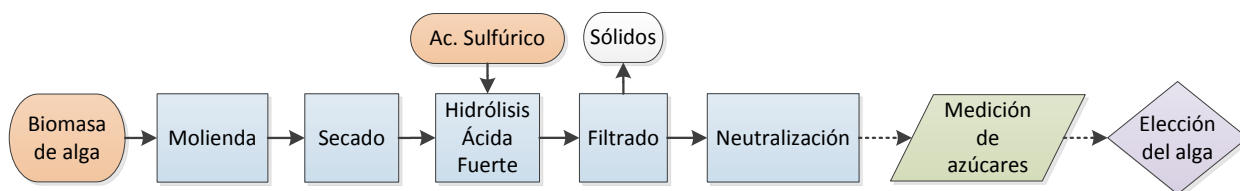


Figura 8. Diagrama de bloques de las etapas realizadas para la determinación de la concentración de azúcares en las algas *Ulva rigida* y *Macrocystis pyrifera*. Descripción en Anexo F.

5.2 Comparación entre las estrategias de fermentación SSF y SHF utilizando *Scheffersomyces stipitis*

La Figura 9 muestra el procedimiento realizado en las estrategias SHF y SSF con *S. stipitis*.

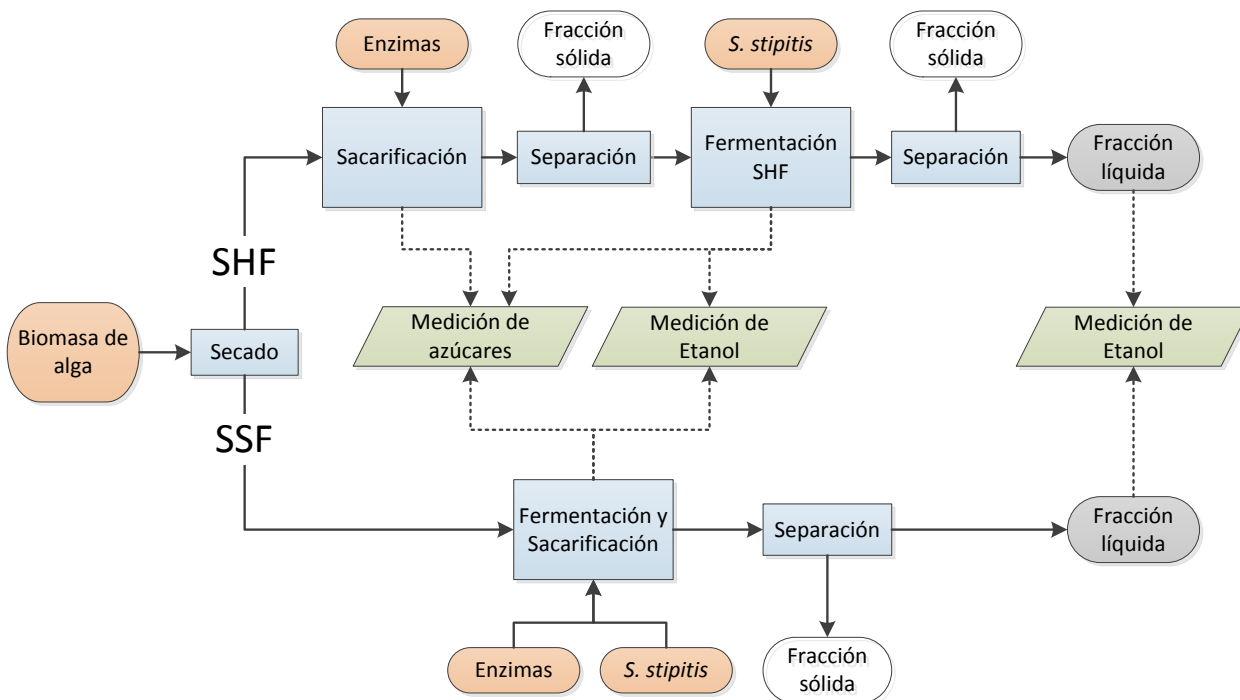


Figura 9. Diagrama de bloques de los pasos realizados para las estrategias SSF y SHF utilizando *S. stipitis*. Descripción en Anexo F.

5.3 Comparación entre la estrategia de fermentación secuencial y simultánea utilizando *Saccharomyces cerevisiae* y *Scheffersomyces stipitis*

La Figura 10 muestra los pasos realizados durante los ensayos de las estrategias secuencial y simultánea (co-fermentación).

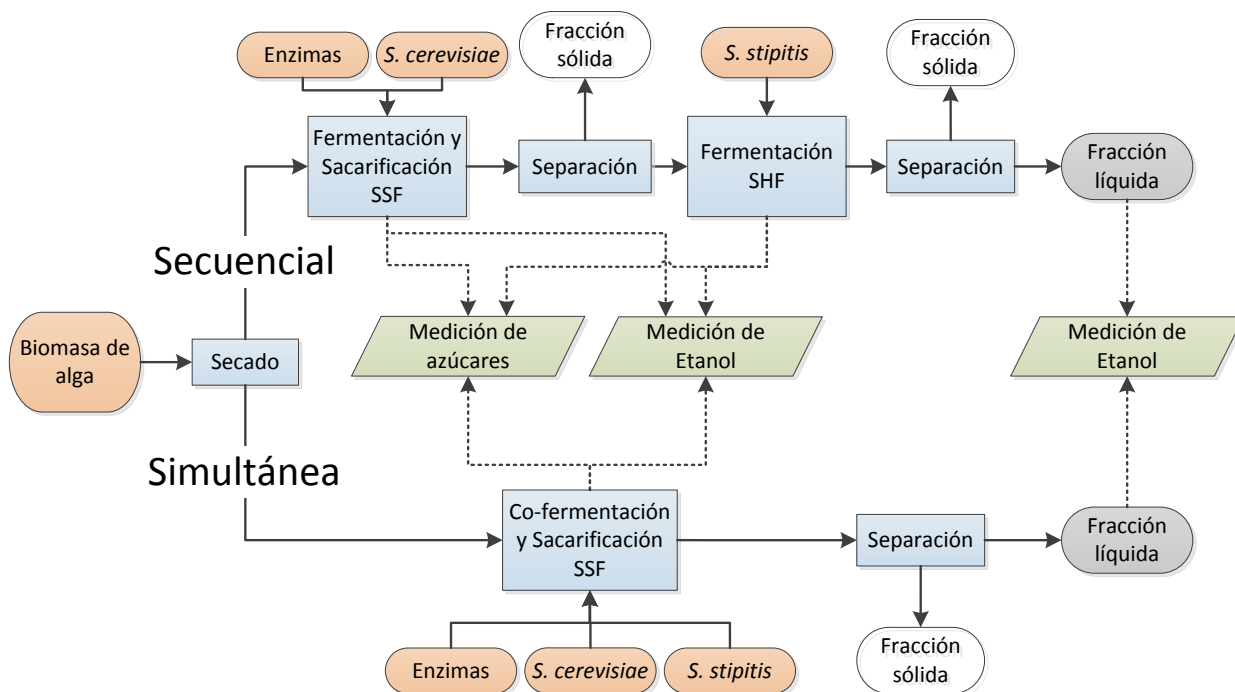


Figura 10. Diagrama de bloques de los pasos realizados para las fermentaciones secuencial y simultánea utilizando *S. cerevisiae* y *S. stipitis*. Descripción en Anexo F.

6. MATERIALES

6.1 Algas

Las algas utilizadas en este trabajo fueron obtenidas a través de donaciones. Las muestras de *Macrocystis pyrifera* fueron donadas por el Profesor A. Buschmann de la Universidad de Los Lagos, Puerto Montt, Chile. Los especímenes fueron cosechados en Noviembre del 2011 en Puerto Montt. El porcentaje de humedad del alga se estimó en un 8% y se trabajó con el alga reducida a polvo fino.

Las muestras de *Ulva rigida* fueron recolectadas en la bahía Herradura de Guayacán, Coquimbo, Chile y fueron donadas por el Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Algas (CIDTA) de la Universidad Católica del Norte. El porcentaje de humedad del alga se estimó en un 9% y se trabajó con el alga reducida a polvo fino. El CIDTA ha determinado que los carbohidratos más comunes en este género de alga son: ramnosa, fucosa, arabinosa, 3,6-anhidro-galactosa, xilosa, manosa, 6-O-Me-galactosa, galactosa y glucosa [24].

6.2 Enzimas

Para la hidrólisis enzimática de la biomasa de alga se utilizaron enzimas comerciales celulasas y celobiasas. El nombre comercial de las celulasas es Celluclast® 1,5L (Cat. C2730) y provienen del hongo *Trichoderma reesei*. La actividad registrada de las celulasas fue de 87 [FPU/ml], valor obtenido en trabajos previos [67].

El nombre comercial de las celobiasas es Novozyme® 188 (Cat. C6105) y provienen del hongo *Aspergillus niger*. La actividad registrada de las celobiasas fue de 650 [CBU/ml], valor obtenido en trabajos previos [67].

6.3 Microorganismos Fermentadores

El microorganismo fermentador principal de este estudio fue la levadura *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. Ésta fue donada por P. Bajwa de la University of Guelph, Ontario, Canadá. La cepa se mantuvo en placas con medio YPD-agar, traspasando una colonia a una nueva placa cada 2 semanas. Las características del medio y detalles sobre la mantención de la cepa en Anexo G. Esta levadura en particular es una cepa mutada para aumentar su tolerancia a inhibidores del licor de sulfito de madera [68,69]

También se trabajó con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, cepa Ethanol Red® (Red Star) donada por la empresa S.I. LESAFFRE FERMENTIS. La levadura se conservó liofilizada (gránulos finos).

6.4 Medio Básico 10X

Este medio fue utilizado en las fermentaciones llevadas a cabo durante el estudio. El medio está constituido por acetato de sodio a 500 [mM], extracto de levadura a 50 [g/l], MgSO₄·7H₂O a 0,25 [g/l] y (NH₄)₂HPO₄ a 5 [g/l]. Se ajustó el pH en 5 con ácido acético concentrado.

7. MÉTODOS

7.1 Hidrólisis ácida fuerte

Se utilizó el método de Klason adaptado según el trabajo de Harris [70]. Las muestras de algas fueron molidas en un mortero para dejarlas con el menor tamaño posible (polvo). Luego fueron secadas en un horno a 60°C *overnight* con el fin de eliminar los restos de humedad.

El procedimiento se hizo para cada alga en triplicado. Se pesaron 0,2 [g] del material seco en vasos precipitados de 20 [ml]. Se agregaron 3 [ml] de ácido sulfúrico al 72% p/p. La reacción transcurrió durante 2 [h] a temperatura ambiente, agitando constantemente con una vara de vidrio. Transcurridas las 2 horas, se vertió el contenido en botellas que contenían 112 [ml] de agua destilada, utilizándose la misma agua para lavar los vasos precipitados de todo el contenido. Las botellas selladas se esterilizaron por 60 minutos a 121°C.

Terminado el autoclavado, el contenido de las botellas fue filtrado para separar el material insoluble en ácido. Se utilizaron filtros de fibra de vidrio Millipore® AP20 (0,8-8 micra, 47 [mm]). Los filtros utilizados en esta etapa fueron previamente lavados en ácido al 72%

p/p durante la noche. Posteriormente fueron lavados con agua destilada y secados en un horno a 60°C *overnight*. Se registraron los pesos secos de cada filtro. El líquido filtrado fue neutralizado con NaOH (hasta pH cercano a 7) y guardado para posteriores mediciones de azúcares. El filtro con el material insoluble fue secado en un horno a 60°C *overnight* y posteriormente pesado para calcular la cantidad de insolubles.

7.2 Secado de la biomasa

La biomasa de alga fue pesada (Masa inicial) y luego colocada en una estufa a 60°C *overnight* con el fin de eliminar la humedad que pudiera contener. Posteriormente, el material fue pesado obteniéndose el peso seco (Masa final). El porcentaje de humedad del material se calculó como sigue:

$$\% \text{ de Humedad} = \frac{\text{Masa inicial} - \text{Masa final}}{\text{Masa inicial}} \cdot 100 \quad \text{ec. (3)}$$

7.3 Hidrólisis enzimática o sacarificación

Para todos los ensayos, las enzimas comerciales celulasa (Celluclast®) y celobiasa (Novozyme®) empleadas para la sacarificación son las mencionadas en la Sección 6.2. El volumen de enzima utilizado se calculó a partir de una carga enzimática definida (20 FPU y CBU por gramo de biomasa) y la actividad de cada enzima (en [FPU/ml] y [CBU/ml]). Esta carga fue la definida como óptima en los trabajos de G. Briones [24] para esta misma alga. Las reacciones se realizaron en un buffer de acetato de sodio (50 [mM], pH 4,8). Para todos los casos, las muestras fueron centrifugadas a 10.000 [rpm] (12.860g) por 10 [min], se descartó la fracción sólida, mientras que la fracción líquida fue congelada a -20°C. Todos los experimentos se realizaron en duplicado y se reportan en este trabajo los valores promedio.

Inicialmente se realizó una sacarificación en un volumen de 4 [ml]. En un tubo Falcon de 15 [ml] se colocó una carga de sustrato de 5% p/v (0,2 [g] de alga para 4 [ml] de volumen de reacción). Se agregaron 46 [µl] de Celluclast® y 6,2 [µl] de Novozyme®, quedando a una razón de 7,5:1 en volumen de celulasa/celobiasa. Se completaron los 4 [ml] con buffer de acetato de sodio. Las condiciones de operación fueron 250 [rpm] a 50°C durante 72 [h]. Se tomaron muestras de 50 [µl] a las 0, 3, 5, 24, 48 y 72 [h] para la posterior medición de glucosa, xilosa y azúcares reductores.

La sacarificación para la estrategia SHF se realizó en un volumen de 70 [ml]. En un matraz Erlenmeyer de 200 [ml] se colocó una carga de sustrato de 5% p/v (3,5 [g] de alga para 70 [ml] de volumen de reacción). Se agregaron 805 [µl] de Celluclast® y 108 [µl] de Novozyme®, quedando a una razón de 7,5:1 en volumen de celulasa/celobiasa. Se completaron los 70 [ml] con buffer de acetato de sodio. Las condiciones de operación fueron de 250 [rpm] a 50°C durante 72 [h]. Se tomaron muestras de 50 [µl] a las 0, 3, 5, 24, 48 y 72 [h] para la posterior medición de glucosa, xilosa y azúcares reductores. Al final de las 72 [h] el hidrolizado fue centrifugado a 10.000 [rpm] (12.860g) por 10 [min], descartándose la fracción sólida y guardando la fracción líquida para su utilización en la fermentación SHF (Sección 7.4.1).

7.4 Fermentaciones

Las fermentaciones se realizaron en matraces Erlenmeyer modificados de 50 [ml] (ver Anexo H). Los matraces modificados y el resto de los materiales fueron autoclavados y se trabajó bajo mechero para disminuir la posibilidad de contaminación. Los inóculos de *S. stipitis* se prepararon en un medio líquido con glucosa 10 [g/l], triptona 10 [g/l] y extracto de levadura 5 [g/l], a 30°C y 250 [rpm], dejando crecer hasta obtener la absorbancia requerida (~20) medida en un espectrofotómetro a 600 [nm]. La concentración de *S. stipitis* se estimó de acuerdo a lo mostrado en el Anexo I. La levadura *S. cerevisiae* se agregó al medio de fermentación en forma sólida (gránulos). En todas las fermentaciones se tomaron muestras de 1 [ml] a las 0, 3, 5, 24, 48 y 72 [h] (144 [h] en algunos casos) para la posterior medición de glucosa, xilosa, azúcares reductores y etanol. Las muestras fueron centrifugadas a 10.000 [rpm] (12.860g) por 10 [min], descartando la fracción sólida y almacenando la fracción líquida a -20°C. Las condiciones anaeróbicas se generaron sacando el aire del interior de los matraces con una jeringa estéril. Las condiciones microaeróbicas se generaron dejando aire estéril (filtrado) en el espacio desocupado del matraz al inicio de la fermentación. Todos los experimentos fueron realizados en duplicado y se reportan los valores promedio.

7.4.1 Fermentación SHF usando *S. stipitis*

Esta fermentación corresponde a la mostrada en el diagrama de la Sección 5.2,

Figura 9. El hidrolizado proveniente de la sacarificación (Sección 7.3) no fue autoclavada pues las altas temperaturas podían disminuir los azúcares fermentables debido a la caramelización de estos. El volumen total fue de 20 [ml]. Al matraz modificado se agregaron 17 [ml] del líquido obtenido al final de la sacarificación, 2 [ml] de medio básico 10X y 1 [ml] del inóculo de *S. stipitis*, quedando la concentración de levadura inicial en 0,6 [g/l]. Las condiciones de operación fueron de 250 [rpm] a 30°C durante 72 [h] en condiciones micro-aeróbicas.

7.4.2 Fermentación y Sacarificación SSF usando *S. stipitis*

Esta fermentación corresponde a la mostrada en el diagrama de la Sección 5.2, Figura 9. El volumen total fue de 20 [ml]. Al matraz modificado se agregó una carga de sustrato de 5% p/v (1 [g] de alga seca), 2 [ml] de medio básico 10X y 1 [ml] de inóculo de *S. stipitis*, quedando la concentración de levadura inicial en 0,6 [g/l]. La carga enzimática fue la definida en Sección 7.3. Se agregaron 230 [μl] de Celluclast® y 31 [μl] de Novozyme®. Se completaron los 20 [ml] con agua destilada. Las condiciones de operación fueron de 250[rpm] a 30°C durante 72 [h] en condiciones micro-aeróbicas.

7.4.3 Fermentación y Sacarificación SSF secuencial usando *S. cerevisiae*

Esta fermentación corresponde a la mostrada en el diagrama de la Sección 5.3, Figura 10. El volumen total fue de 20 [ml]. Al matraz modificado se agregó una carga de sustrato de 5% p/v (1 [g] de alga seca), 2 [ml] de medio básico 10X y 0,2 [g] de *S. cerevisiae* seca, quedando la concentración inicial de levadura en 10 [g/l]. La carga enzimática fue la definida en Sección 7.3 (Sacarificación). Se agregaron 230 [μl] de Celluclast® y 31 [μl] de Novozyme®. Se completaron los 20 [ml] con agua destilada. Las condiciones de operación

fueron de 250 [rpm] a 40°C durante 72 [h] en condiciones anaeróbicas. La solución obtenida al final de las 72 [h] fue utilizado en el paso siguiente (Sección 7.4.4).

7.4.4 Fermentación SHF secuencial usando *S. stipitis*

Esta fermentación corresponde a la mostrada en el diagrama de la Sección 5.3, Figura 10. La solución restante obtenida en el paso anterior (Sección 7.4.3) fue centrifugada a 10.000 [rpm] por 10 [min], descartando la fracción sólida. Se obtuvieron 12 [ml] de fracción líquida, los cuales fueron filtrados para disminuir la posibilidad de contaminación. Los 12 [ml] se agregaron a un matraz modificado junto con 1 [ml] de inóculo de *S. stipitis*, quedando la concentración inicial de células en aproximadamente 10 [g/l]. Se incubó a 250 [rpm] y 30°C en condiciones micro-aeróbicas. Luego de 72 [h] (144 [h] del experimento global) se tomó una muestra para medir glucosa, xilosa, azúcares reductores y etanol.

7.4.5 Co-fermentación y Sacarificación simultánea con *S. cerevisiae* y *S. stipitis*

Esta fermentación corresponde a la mostrada en el diagrama de la Sección 5.3, Figura 10. El volumen total fue de 20 [ml]. Al matraz modificado se agregó una carga de sustrato de 5% p/v (1 [g] de alga seca), 2 [ml] de medio básico 10X, 0,1 [g] de *S. cerevisiae* seca y 1 [ml] de inóculo de *S. stipitis*, quedando la concentración inicial de células en 5 [g/l] por cepa (entre ambas 10 [g/l]). La carga enzimática fue la definida en Sección 7.3 (Hidrólisis enzimática). Se agregaron 230 [μl] de Celluclast® y 31 [μl] de Novozyme®. Se completaron los 20 [ml] con agua destilada. Las condiciones de operación fueron de 250[rpm] a 32°C durante 144 [h] en condiciones micro-aeróbicas. Se escogió esta temperatura pues es el máximo valor del rango óptimo de fermentación de *S. stipitis* y se acerca a la temperatura óptima de *S. cerevisiae*, además que temperaturas más altas favorecen la hidrólisis enzimática.

7.5 Medición Glucosa

La medición de glucosa se realizó utilizando el kit comercial Gluc-Pap marca *Randox* (GL2623). La metodología aplicada fue la misma realizada en trabajos previos [24,64,67], basados en el manual propio del kit.

7.6 Medición de xilosa

La medición de xilosa se realizó utilizando el kit comercial D-Xylose marca *Megazyme*. El protocolo propio del kit fue escalado a un volumen de reacción de 1 [ml], utilizándose cubetas plásticas para este volumen y de 1 [cm] de paso de luz.

7.7 Medición de azúcares reductores

Se utilizó el método del DNS (ácido dinitrosalicílico) para medir la cantidad de azúcares reductores en las muestras. Se utilizó glucosa para confeccionar una curva de calibración del método.¹ Ésta se muestra en el Anexo J. Se midió la absorbancia a 550 [nm]. El procedimiento usado para determinar dichos valores fue el método clásico desarrollado

¹ Se confeccionó una nueva curva y fórmula cada vez que se utilizó una nueva mezcla de DNS.

por Miller [71] y utilizado en estudios previos [64,67]. La fórmula obtenida de la curva de calibración para la conversión de absorbancia a [g/l] es la que sigue:

$$\text{Concentración } \left[\frac{g}{l} \right] = \frac{\text{Absorbancia a 550 [nm]}}{1,171} \quad \text{ec. (4)}$$

7.8 Medición de etanol

La medición del etanol de las muestras se realizó mediante cromatografía de gases. El equipo utilizado fue el 6890 GC de *Agilent Technologies*. Las muestras se centrifugaron a 10.000 [rpm] (12.860g) por 5 [min], para luego ser filtradas con un filtro de 0,22 [μ m]. Se colocaron 0,5 [ml] de las muestras filtradas en viales de 1 [ml] especiales para el plato distribuidor del cromatógrafo. La inyección de la muestra fue realizada de forma automática por el equipo. La curva de calibración confeccionada con diluciones de etanol se encuentra en el Anexo K. Se calcularon las concentraciones de etanol de cada muestra en base a la relación obtenida de la curva de calibración,

7.9 Cálculo de rendimientos

Los rendimientos de la sacarificación (Y_s) se calcularon para cada azúcar en particular (azúcares reductores totales, glucosa, xilosa y otros azúcares reductores). Para calcular el rendimiento, se utilizaron las concentraciones por [g] de alga de cada azúcar liberado durante la sacarificación ($C_{sac X}$) y las concentraciones totales por [g] de alga para cada azúcar ($C_{total X}$), determinados durante la etapa de determinación de los azúcares de las algas.

$$Y_s \% = \frac{C_{sac X} \left[\frac{g \text{ azúcar } X \text{ liberado}}{g \text{ alga}} \right]}{C_{total X} \left[\frac{g \text{ azúcar } X \text{ total}}{g \text{ alga}} \right]} \cdot 100 \quad \text{ec. (5)}$$

Los rendimientos de etanol durante la fermentación se calcularon en base a la cantidad de alga seca utilizada ($Y_{e/al}$) y en base a la cantidad de azúcares reductores totales del alga ($Y_{e/az}$).

$$Y_{e/al} \left[\frac{g \text{ EtOH}}{g \text{ alga}} \right] = \frac{C_e \left[\frac{g \text{ EtOH}}{l} \right] \cdot V [l]}{M_a [g \text{ alga}]} \quad \text{ec. (6)}$$

$$Y_{e/az} \left[\frac{g \text{ EtOH}}{g \text{ azúcar}} \right] = \frac{Y_{e/al} \left[\frac{g \text{ EtOH}}{g \text{ alga}} \right]}{C_{total} \left[\frac{g \text{ azúcares}}{g \text{ alga}} \right]} \quad \text{ec. (7)}$$

- C_e = Concentración de etanol [g/l]
- C_{total} = Concentración de azúcares reductores totales [g/g]
- V = Volumen de reacción [l]
- M_a = Masa de alga seca utilizada [g]

CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se mostrarán los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta investigación en conjunto con las discusiones pertinentes. En primer lugar y en relación al primer objetivo específico, se presentan los resultados de las concentraciones de azúcares de las algas estudiadas. En base a estos, se definió el alga más adecuada para utilizar como materia prima de los estudios de fermentación empleando *S. stipitis*. También se exponen los resultados y análisis de la hidrólisis enzimática del alga *U. rigida*.

Luego se presentan los resultados de las estrategias SSF y SHF utilizando sólo *S. stipitis*, relacionados con el segundo objetivo. Finalmente, se muestran los resultados de las fermentaciones secuencial y simultánea con *S. cerevisiae* y *S. stipitis*, relacionados al tercer objetivo específico.

8.1 Concentración de azúcares de las algas *M. pyrifera* y *U. rigida*

Las muestras de ambas algas fueron hidrolizadas completamente con ácido según el método descrito en la Sección 7.1. En la fracción líquida obtenida se midieron glucosa, xilosa y azúcares reductores según los métodos descritos en las Secciones 7.5, 7.6 y 7.7, respectivamente, mientras que la fracción sólida remanente en el filtro representó la materia insoluble. La Figura 11 muestra las concentraciones de azúcares reductores totales y material insoluble encontradas para ambas algas.

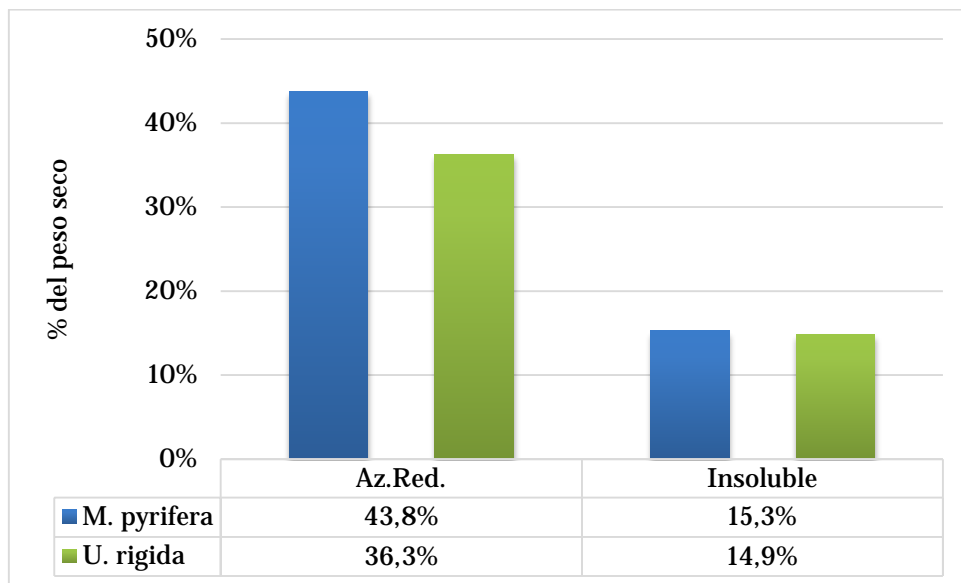


Figura 11. Concentración de azúcares reductores totales y material insoluble de las algas *M. pyrifera* y *U. rigida* como % del peso seco del alga.

La estimación de azúcares no-reductores puede realizarse una vez hidrolizados por ácido sulfúrico, pues los azúcares pasan a su forma reductora [72]. Una vez reducidos, los azúcares reductores pueden ser medidos con técnicas como el método del DNS. Dado que las muestras de alga fueron hidrolizadas con ácido sulfúrico, se considerará que la

concentración de azúcares reductores incluye también a los no-reductores, es decir, representan los azúcares totales.

El gráfico de la Figura 11 muestra que un 43,8% del peso seco del alga *M. pyrifera* está constituido por azúcares, mientras que el alga *U. rigida* por un 36,3%. Dentro de estos azúcares están incluidos la glucosa y xilosa. El siguiente gráfico, Figura 12, muestra el detalle de las concentraciones de glucosa y xilosa de cada alga.

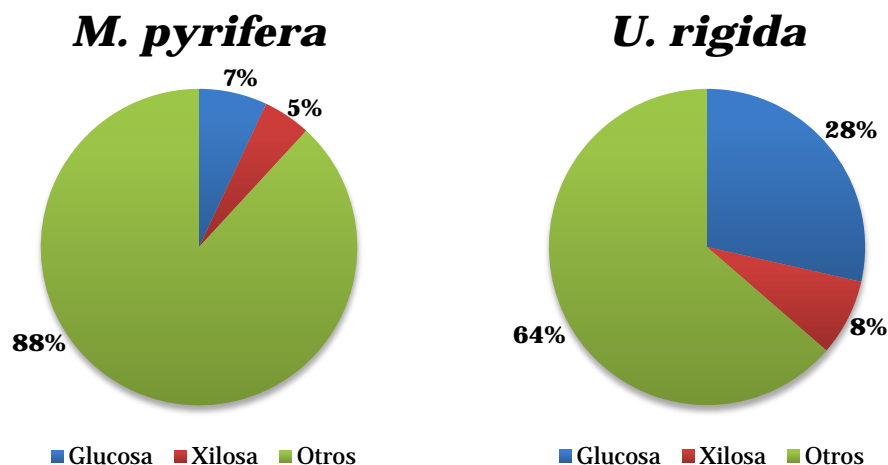


Figura 12. Porcentajes de glucosa, xilosa y otros azúcares dentro los azúcares totales.

Para el alga *M. pyrifera* la glucosa y xilosa representan el 7 y 5% del total de azúcares, y el 3 y 2% del peso seco del alga, respectivamente. Para el alga *U. rigida* la glucosa y xilosa representan el 28 y 8% del total de azúcares, y el 10 y 3% del peso seco del alga, respectivamente. En ambas algas, el mayor porcentaje de carbohidratos lo constituyen azúcares distintos a glucosa y xilosa, siendo un 88% para *M. pyrifera* y un 64% para *U. rigida*. El detalle de las concentraciones determinadas se encuentra en el Anexo L.

La Tabla 4 muestra una composición referencial [37] de *M. pyrifera*. El manitol, laminarina, alginatos, celulosa y fucoidina, todos polímeros de azúcares, representan el 41,7% del peso seco total del alga. Este valor concuerda con la concentración de azúcares encontrada en este estudio, de un 43,8%. Además, si se considera que la totalidad de glucosa está se encuentra en forma de celulosa, el valor encontrado del 3% no se aleja del 5,2% referencial.

Tabla 4. Composición referencial de la materia seca del alga *M. pyrifera* [37].

Compuesto	% p/p
Ceniza	41,1
Sólidos volátiles	58,9
Proteínas	17,3
Lípidos	-
Manitol	20,2
Laminarina	0,8
Alginatos	15,3
Celulosa	5,2
Fucoidina	0,2

Con respecto al alga *U. rigida*, se tiene la referencia de un estudio previo [24] donde la concentración de azúcares reductores fue de un 37% (368 [mg/g]). Este valor es muy similar al 36% encontrado en este estudio. Por otro lado, los estudios realizados por G. Satpati [73] sobre *U. rigida* indican un contenido de carbohidratos del 22% del peso seco del alga. La diferencia del valor encontrado por G. Satpati y el encontrado en este estudio, puede deberse a que el común de las algas cambian su composición química dependiendo de la estación y localización geográfica [37]. Por ejemplo, se tiene la referencia de que el alga *Laminaria digitata* puede variar desde un 5% a un 32% su concentración de manitol, y de un 0% a un 25% su concentración de laminarina [18]. El alga utilizada por G. Satpati fue cosechada en la India, mientras que la utilizada por este estudio y el de G. Briones [24] fue cosechada en Chile. Este hecho hace difícil la comparación de composiciones obtenidas por distintos estudios sobre una misma especie de alga.

En el alga *U. rigida*, se aprecia que el mayor potencial de azúcares se encuentra en la fracción que no corresponde ni a glucosa ni xilosa y abarca el 64% del total de azúcares. Dentro de estos azúcares pueden estar arabinosa, manosa, fucosa, ramnosa, ácido glucurónico y galactosa, entre otros, conformando algún heteropolisacárido como *Ulvan*, manano y glucoronoxilorhamnano [77,78].

En base a estos resultados y a los antecedentes previos, se optó por continuar la investigación utilizando sólo el alga verde *Ulva rigida*. Las razones de esta elección se enumeran a continuación:

1. El alga *U. rigida* no requiere pretratamientos, mientras que *M. pyrifera* sí. Los pretratamientos aumentan los costos del proceso, la pérdida de material e implican etapas de detoxificación, por lo que la utilización de *U. rigida* implicaría menos costos si se escala a nivel industrial.
2. La concentración de xilosa es levemente mayor en *U. rigida* (0,028 [g/g]) que en *M. pyrifera* (0,021 [g/g]). Dado que se usará una levadura que fermenta pentosas, es más adecuado realizar el estudio utilizando el alga con mayor cantidad de pentosas.
3. Las pentosas pueden formar furfurales (compuestos inhibidores) al ser sometidas a pretratamiento con ácido caliente [7,69]. Puesto que el alga *M. pyrifera* requiere de pretratamiento ácido, y además, contiene xilosa en su composición, se descarta su utilización para evitar la presencia de inhibidores producto del pretratamiento en las etapas posteriores.

8.2 Sacarificación de estrategia SHF

La etapa de sacarificación requerida para la estrategia SHF se realizó según Sección 7.3. Se utilizó una carga enzimática de 20 FPU y 20 CBU por [g] de biomasa se acuerdo a lo definido por G. Briones [24] para *U. rigida* sin pretratar. Fue realizado un primer ensayo de sacarificación en un volumen de 4 [ml] (en duplicado) y 0,1 [g] de alga seca, entregando concentraciones de azúcares reductores de 10 [g/l] a las 72 [h] de reacción. Con esta referencia, se realizó una sacarificación con las mismas condiciones pero en un único volumen de 70 [ml], la cual serviría como sustrato para la fermentación SHF. Hasta las 48 [h] ambas sacarificaciones se comportaban de manera similar. Inesperadamente, la concentración de azúcares reductores que se obtuvo a las 72 [h] fue de sólo 2,2 [g/l]. El seguimiento de ambas sacarificaciones se muestra en la Figura 13. La abrupta disminución en la concentración de azúcares en solución entre los tiempos 48 y 72 [h] pudo ocasionarse por: (1) la contaminación con algún microorganismo que consumiera el sustrato liberado, (2) la adsorción irreversible de las enzimas en el material celulósico y hemicelulósico, (3) precipitación de los azúcares o (4) adsorción de los azúcares liberados en material tratado.

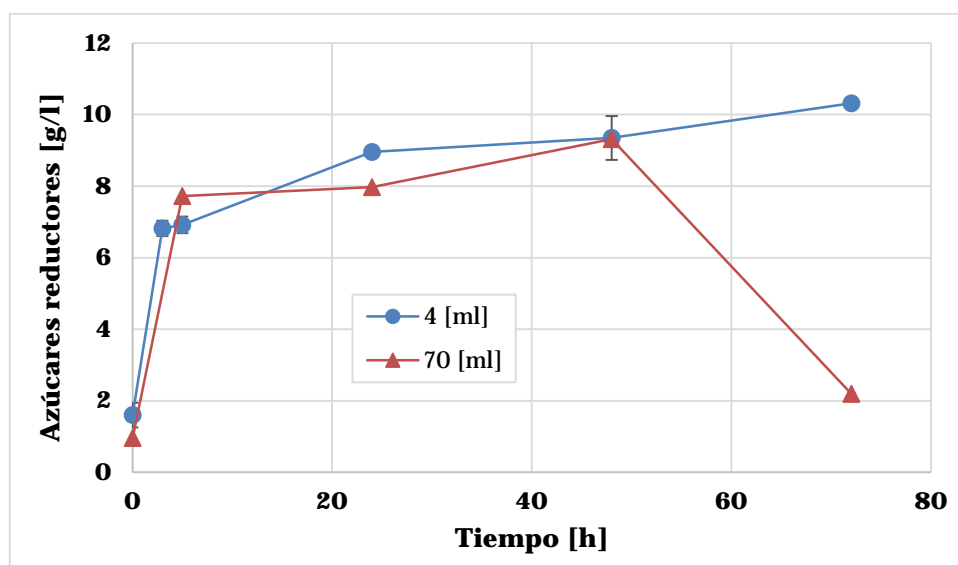


Figura 13. Cinética de liberación azúcares reductores durante la sacarificación de *U. rigida* en 4 y 70 [ml].

La contaminación con un microorganismo parece improbable debido a la temperatura con la que se realiza la sacarificación, 50°C, y el largo tiempo de reacción, aunque existen microorganismos que se desarrollan a esas temperaturas. Además, a simple vista no se observó ningún indicio de crecimiento bacteriano o fúngico al centrifugar la solución, aunque no se observó bajo microscopio ni se realizó un estudio en placas para comprobar esta hipótesis. Por otro lado, la adsorción irreversible de las enzimas al material es un problema común en la hidrólisis enzimática [56]. Éste se observaría como una disminución en la velocidad y rendimiento de sacarificación, pero no explica la disminución abrupta en la concentración de los azúcares. Esta adsorción de las enzimas al material puede solucionarse al agregar surfactantes en el medio de sacarificación. La precipitación de los azúcares también es improbable pues la concentración máxima lograda (9,3 [g/l]) es baja comparada con otros trabajos (e.g. 34 [g/l] [76]), en los que no

se observó este efecto. Otra posibilidad, es que los azúcares hayan sido adsorbidos en porosidades formadas por la acción enzimática sobre el material tratado, siendo arrastrados con la fracción sólida al centrifugar la solución. Lamentablemente, no se han encontrado antecedentes en las que suceda este fenómeno y tampoco se pudieron realizar pruebas del contenido de azúcares en la fracción sólida del hidrolizado. Finalmente, dado que la sacarificación en 70 [ml] no se realizó en duplicado, no es posible descartar la posibilidad de algún error en el procedimiento.

Con el fin de evitar nuevamente esta caída en la concentración de azúcares, se realizó otra sacarificación en el mismo volumen, 70 [ml], pero deteniendo la reacción a las 48 [h]. El perfil de azúcares reductores fue parecido a las sacarificaciones anteriores. El seguimiento de la sacarificación se muestra en la Figura 14.

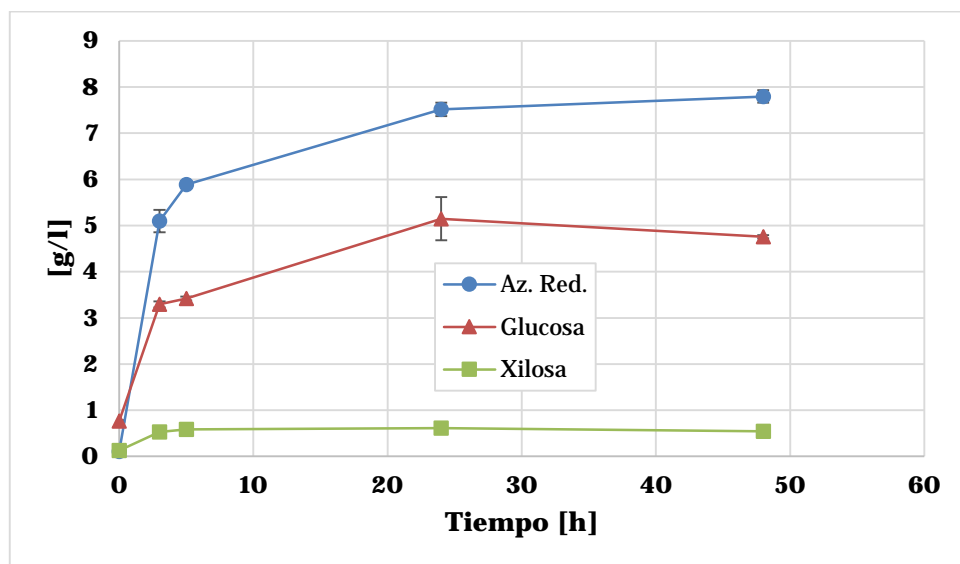


Figura 14. Cinética de liberación azúcares reductores, glucosa y xilosa a lo largo de la sacarificación.

La concentración final alcanzada de azúcares reductores fue de 7,8 [g/l], de glucosa 4,8 [g/l] y xilosa 0,54 [g/l]. La xilosa y glucosa representan el 7% y 61% del total de azúcares reductores liberados, respectivamente. El 32% restante representa a otros azúcares reductores no determinados. La Tabla 5 muestra los rendimientos de liberación de cada azúcar en función de los valores determinados en Sección 8.1.

Tabla 5. Rendimientos de liberación de cada azúcar durante la sacarificación en función de los valores totales determinados previamente. (*) Total disponible en base a los resultados de Sección 8.1.

	Liberados		Total*	Rendimiento
	[g/l]	[g/g de alga]		
Az. Red.	7,8	0,156	0,363	43%
Glucosa	4,8	0,095	0,104	92%
Xilosa	0,54	0,011	0,028	38%
Otros	2,5	0,050	0,231	22%

Se observa que la sacarificación con las enzimas celulasas Celluclast® y celobiasas Novozyme® tuvo un rendimiento del 43% de los azúcares totales. Lo obtenido por L. Ge [76] en estudios de sacarificación sobre biomasa de alga (*L. japonica*), el rendimiento de liberación de azúcares fue de un 92,5% (0,278 [g/g]) utilizando celulasas y celobiasas. La diferencia con este estudio radica en que el 30% del peso seco del material era celulosa (0,3 [g/g]), con un ínfimo porcentaje de otros carbohidratos, por lo que representa casi la totalidad de azúcares reductores. En el presente estudio, la liberación de glucosa llegó a un 92% del total de glucosa, lo que equivale al rendimiento obtenido por L. Ge [76]. Esto demuestra que la efectividad con que las celulasas y celobiasas hidrolizan la celulosa (o polímeros de glucosa) es alta. Por otro lado, la liberación de xilosa (38%) y otros azúcares (22%) es baja, por lo que es claro que las enzimas utilizadas no son adecuadas para hidrolizar hemicelulosas. Se tiene antecedentes de que las celulasas endo-1,4- β -glucanasas pueden romper los enlaces β -1,4 de las hemicelulosas [55], lo que explicaría la liberación de otros azúcares aparte de glucosa. Aun así, las hemicelulosas pueden presentar enlaces α -1,4, α y β 1,3 y 1,6 [77] los cuales no son hidrolizados por estas celulasas y celobiasas, lo que explicaría la baja eficiencia en la sacarificación de estos polisacáridos. Por ende, para aumentar la liberación de los azúcares que componen las hemicelulosas es necesario utilizar enzimas específicas capaces de romper sus enlaces internos.

En Anexo M se encuentran los datos resultantes de los ensayos de sacarificación con sus respectivas desviaciones estándar.

8.2.1 Ensayos de sacarificación utilizando enzima β -1,3-glucanasa

En el Anexo N se muestran las metodologías y los resultados de un ensayo de sacarificación sobre *U. rigida* utilizando una enzima β -1,3-glucanasa BGLII en conjunto con las enzimas comerciales Celluclast® y Novozyme®. El fin de este ensayo era determinar si al utilizar estas enzimas en conjunto, existiría un aumento en el rendimiento de la sacarificación. En vez de observar algún potenciamiento o sinergia con las 3 enzimas, la presencia de β -1,3-glucanasa tuvo efectos negativos al compararla con la sacarificación usando enzimas comerciales. Dado que las sacarificaciones se realizaron en las condiciones óptimas de las enzimas comerciales y no de la β -1,3-glucanasa, las altas temperaturas, el pH ácido y el buffer pueden haber sido las causantes de la baja o nula actividad de la β -1,3-glucanasa. Aun así, sería interesante realizar estos ensayos en condiciones intermedias entre las óptimas de cada enzima. En base a los resultados, se descartó la utilización de la β -1,3-glucanasa BGLII en las hidrólisis enzimáticas de este estudio.

8.3 Fermentación SHF y SSF utilizando *S. stipitis*

Las fermentaciones de las estrategias SHF y SSF se realizaron de acuerdo a lo mencionado en Secciones 7.4.1 y 7.4.2. En particular para la SHF, se utilizó el hidrolizado proveniente de la sacarificación, cuyo perfil de azúcares se muestra en la Sección 8.4, Figura 14. Las condiciones de fermentación, la carga de sustrato y el inóculo inicial fueron los mismos en ambos casos. Los datos obtenidos se encuentran en el Anexo O. A continuación se muestra en la Figura 15 los perfiles de azúcares reductores, glucosa, xilosa y etanol obtenidos durante ambas estrategias.

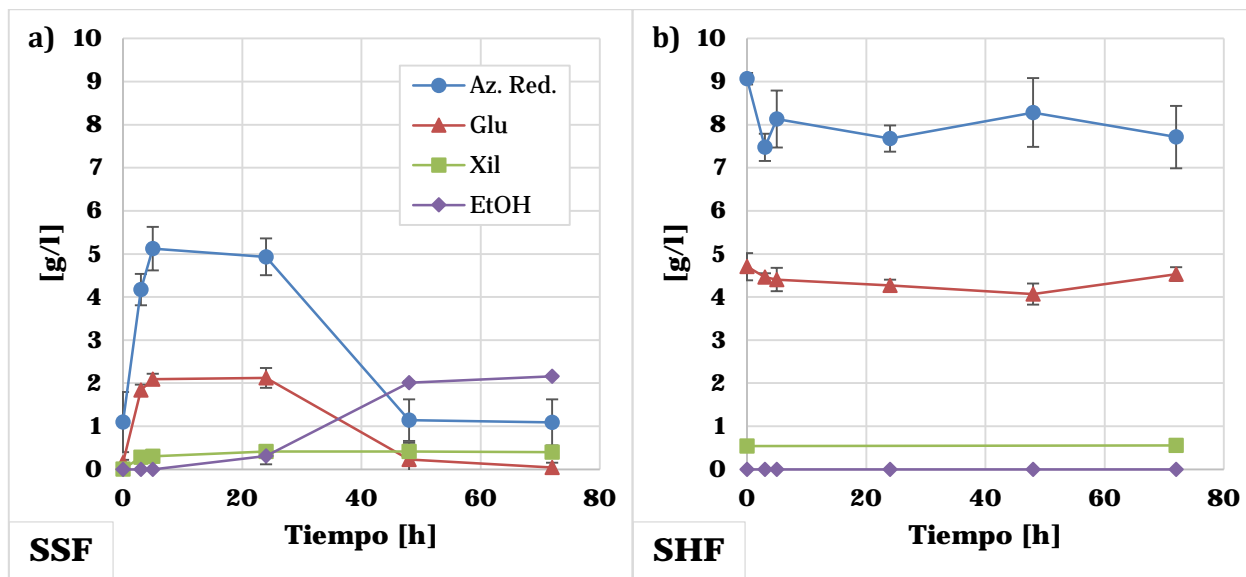


Figura 15. a) Estrategia de fermentación SSF. b) Estrategia de fermentación SHF. Se utilizó *S. stipitis*. Se muestran las concentraciones de azúcares reductores, glucosa, xilosa y etanol.

La Tabla 6 muestra los rendimientos de etanol obtenidos utilizando las estrategias SHF y SSF a partir de la máxima concentración de etanol alcanzada.

Tabla 6. Rendimientos de etanol obtenidos con las estrategias SHF y SSF en base a la cantidad de alga utilizada, en base a los azúcares totales del alga y en base al máximo teórico ($Y_{e/az}=0,51$ [g/g.]).

Estrategia	Etanol [g/l]	Rendimientos [g/g]		
		$Y_{e/al}$	$Y_{e/az}$	% del máximo teórico
SSF	2,2	0,044	0,12	24%
SHF	0	0	0	0%

Lo más notorio al comparar ambos gráficos, es la nula producción de etanol con la estrategia SHF. Por otro lado, con la estrategia SSF se llegó a una concentración de 2,2 [g/l] de etanol. En base a esto, se desprende inmediatamente la superioridad de la estrategia SSF frente a la SHF para producir etanol utilizando *U. rigida* y *S. stipitis*. Aun así, queda la incógnita de la razón del fracaso de la estrategia SHF. Esto puede deberse a la baja concentración inicial de levadura y a la presencia de inhibidores en el hidrolizado.

En ambos ensayos, SSF y SHF, se utilizó una concentración inicial de levadura de 0,6 [g/l]. Al estar en menor concentración, las levaduras están más sensibles a la inhibición por algún compuesto que pueda haberse formado en la hidrólisis enzimática de la estrategia SHF. Como referencia, los estudios de A. Ferreira [78] utilizando una cepa de *S. stipitis* sobre un hidrolizado hemicelulósico de caña de azúcar se obtuvieron rendimientos de etanol $Y_{e/az} = 0,19$ [g/g] utilizando mayores cargas iniciales de células (2 [g/l]). También pudo existir alguna inhibición por sales provenientes del alga, pero no se tiene el dato de la concentración de sales de ésta. La posibilidad de contaminación se descarta pues no hubo una disminución notoria de azúcares durante las 72 [h] que duró el proceso.

Con respecto a la estrategia SSF, el rendimiento de etanol en base a la cantidad de alga seca fue de $Y_{e/al} = 0,044$ [g/g]. Este resultado es bajo al compararlo con algunos de los mostrados en Antecedentes (Sección 3, Tabla 2), aunque superior a un trabajo similar [21] ($Y_{e/al} = 0,03$ [g/g]) en que se usó *S. stipitis* y un alga parda. El rendimiento de etanol en base al total de azúcares disponibles en el alga fue de $Y_{e/az} = 0,12$ [g/g], el cual representa el 24% del rendimiento máximo teórico ($Y_{e/az} = 0,51$ [g/g]). En el trabajo de G. Briones [24] con esta misma alga y *S. cerevisiae*, los rendimientos con SSF en condiciones similares fueron de $Y_{e/al} = 0,096$ [g/g] e $Y_{e/az} = 0,26$ [g/g], un 51% del máximo teórico. Esto puede dar cuenta de la diferencia en la eficiencia fermentadora de ambas cepas, aunque aún se debe considerar la concentración de levadura inicial usada por G. Briones fue mayor, de 10 [g/l].

Los trabajos de T. Niklitschek [79] indican que los rendimientos de etanol tienen una fuerte dependencia de la cantidad de inóculo inicial del microorganismo fermentador. Los resultados indicaron que con una concentración inicial de 10 [g/l] de levadura se lograba un 70% más de etanol que usando una concentración inicial de 0,1 [g/l]. Resulta lógico pensar que al tener una menor cantidad de microorganismos, la producción de etanol a un mismo tiempo será menor que al tener mayor concentración de células. Esto, pues se tiene menos levadura produciendo etanol.

La temperatura a la que se llevó a cabo la estrategia SSF, puede ser otro factor importante. Dado que *S. stipitis* tiene una temperatura óptima de fermentación de pentosas entre los 28 y 32°C, la SSF se realizó a 30°C. Esto es 20°C menos que la temperatura óptima de sacarificación, lo que claramente disminuye la eficiencia de la hidrólisis enzimática, por ende, se liberan menos azúcares disponibles para la fermentación.

Sobre los perfiles de azúcares observados en la estrategia SSF, Figura 15, la xilosa no parece haber sido consumida por *S. stipitis* luego de ser liberada por la hidrólisis. Esto puede deberse a que la baja cantidad de levadura inicial, al no consumir rápidamente las hexosas liberadas, permitió que estos azúcares reprimieran la fermentación de pentosas. Como se ve, la concentración de glucosa alcanzó una concentración cero recién a las 72 [h]. Otra posibilidad, es que las vías metabólicas involucradas en la fermentación de pentosas no estaban activas puesto que el inóculo se preparó en un medio con glucosa y en condiciones aeróbicas. Sobre esto, existen antecedentes de que la xilosa es necesaria para inducir la producción de xilosa reductasa y xilitol dehidrogenasa, enzimas cruciales en la fermentación de xilosa, mientras que la glucosa reprime su expresión [62,80]. De esta forma, la baja concentración de xilosa liberada pudo no ser suficiente para activar los mecanismos de fermentación de pentosas. Las concentraciones de los 3 azúcares muestran un rápido incremento inicial, dado que la baja cantidad de células iniciales no

son capaces de consumir todos los monosacáridos que son liberados por la hidrólisis enzimática. Este hecho no es beneficioso para el rendimiento de la sacarificación (y finalmente para la producción de etanol), pues las enzimas están más propensas a sufrir inhibición por producto. Posteriormente, la concentración de azúcares reductores y glucosa comienza a disminuir una vez que la tasa de consumo sobrepasa al de liberación de azúcares.

Otros dos factores que pueden haber evitado la fermentación de la xilosa son la cantidad de oxígeno disponible y la pérdida de la capacidad de fermentar xilosas a lo largo del estudio. Para probar que ninguno de estos factores estuvo involucrado, se realizó una fermentación simple utilizando sólo xilosa como fuente de carbono. A diferencia de la estrategia SSF, la concentración de levadura inicial usada fue mayor, de 10 [g/l], pero las otras variables se mantuvieron constantes (temperatura, pH, agitación, condiciones microaeróbicas). Los resultados se muestran en la Figura 16.

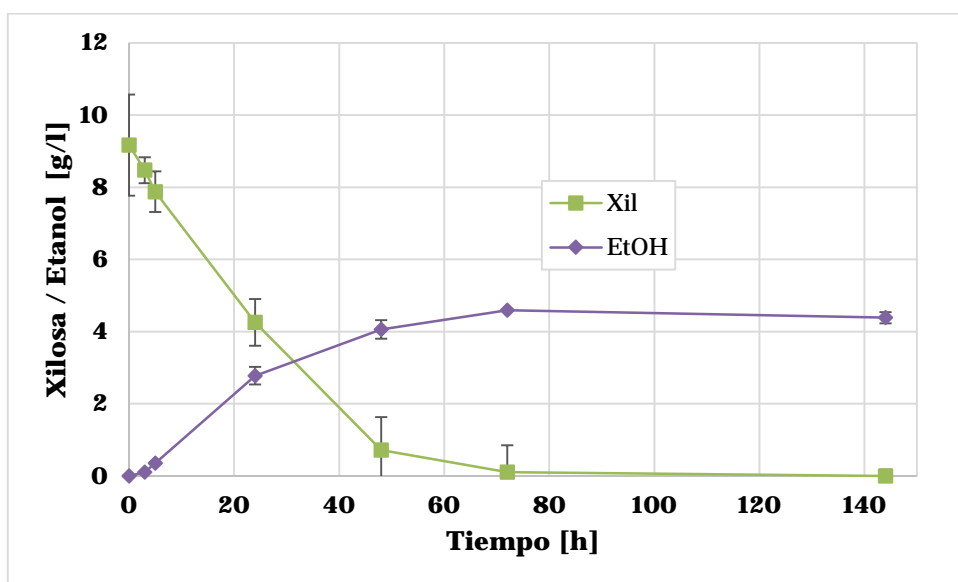


Figura 16. Cinética de fermentación de xilosa por *S. stipitis* a 30°C, 250 [rpm].

El rendimiento de conversión de xilosa a etanol fue de $Y_{e/az} = 0,48$ [g EtOH/g xilosa], un 94% del rendimiento máximo teórico. Esto confirma que la cepa no perdió su capacidad de fermentar xilosas durante el transcurso de la investigación, y además, que la cantidad de oxígeno dejada en el espacio vacío del matraz fue suficiente para la fermentación completa de la xilosa. Este último punto, es quizás el más complejo de manejar, pues una cantidad excesiva de oxígeno lleva a una disminución en la producción de etanol, mientras que una cantidad insuficiente, implica la no fermentación de las pentosas. La bibliografía indica que en un cultivo continuo la tasa de transferencia de oxígeno óptima debe ser menor a 1 [mmol/l/h] [65].

No se realizó una fermentación de una mezcla de glucosa y xilosa pues ya existen trabajos en lo que se ha analizado este escenario [62,69], siendo la finalidad de este ensayo sólo corroborar que la cepa no perdiera la capacidad de fermentar xilosa.

8.4 Fermentación simultánea y secuencial utilizando *S. cerevisiae* y *S. stipitis*

Estas estrategias se idearon con el fin de aumentar los rendimientos de etanol obtenidos previamente en los trabajos de G. Briones [24], en donde se utilizó *S. cerevisiae* en una estrategia SSF con el alga *U. rigida* como sustrato. Los rendimientos obtenidos en este trabajo fueron de $Y_{e/al}=0,096$ [g/g] e $Y_{e/az}=0,26$ [g/g]. Dado que *S. cerevisiae* no es capaz de fermentar las pentosas que componen el alga *U. rigida*, se planteó la posibilidad de aumentar los rendimientos de etanol al utilizar ambas cepas en conjunto o realizar fermentaciones secuenciales. De esta forma, *S. stipitis* podría fermentar las pentosas no metabolizadas por *S. cerevisiae*, reflejándose en un aumento del rendimiento final de etanol.

La Figura 17 muestra los resultados de ambas estrategias de fermentación, simultánea (co-fermentación) y secuencial.

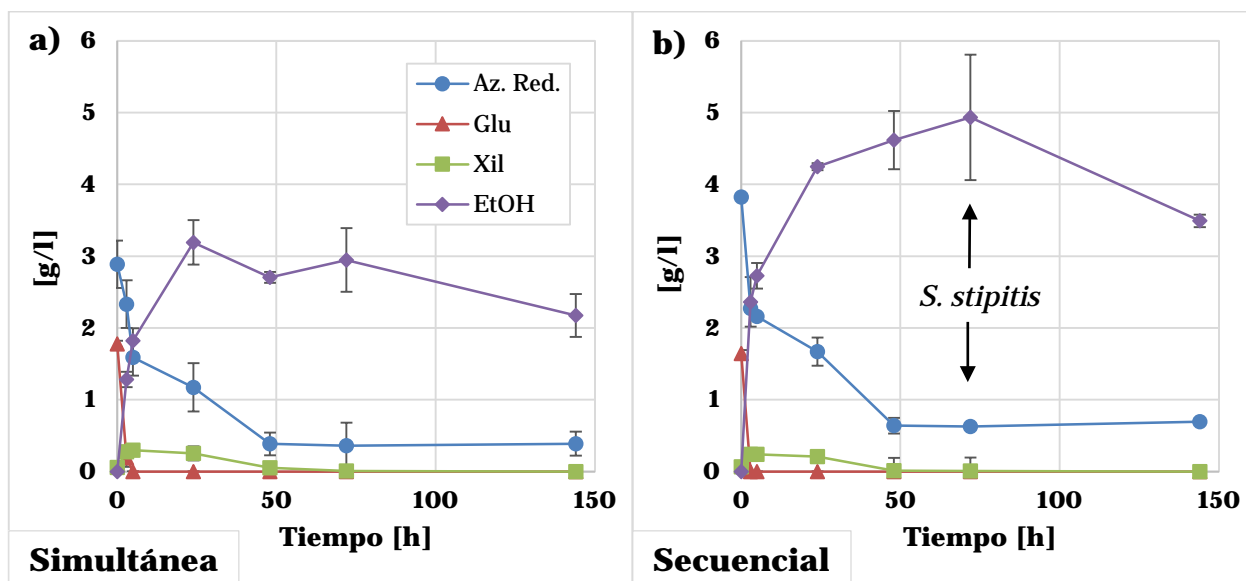


Figura 17. a) Fermentación simultánea (co-fermentación) con *S. cerevisiae* y *S. stipitis*. **b)** Fermentación secuencial primero con *S. cerevisiae* y luego *S. stipitis*.

La Tabla 7 muestra los niveles máximos de etanol obtenidos y, en base a estos, los rendimientos de ambas estrategias.

Tabla 7. Niveles máximos de etanol y rendimientos de las estrategias simultánea y secuencial.

Estrategia	Etanol		Rendimientos [g/g]		
	[g/l]	Tiempo [h]	$Y_{e/al}$	$Y_{e/az}$	% del máximo teórico
Simultánea	3,19	24	0,064	0,18	34%
Secuencial	4,93	72	0,099	0,27	53%

La estrategia de fermentación simultánea con ambas cepas se ideó en base a los antecedentes de otros estudios que han utilizado co-cultivos para fermentar materiales

lignocelulósicos o mezclas de glucosa/xilosa. Lo que se realizó fue básicamente una SSCF, o Sacarificación y Co-fermentación simultánea. Dado que se utilizó 2 especies de levaduras, la temperatura elegida, de 32°C, fue intermedia entre los óptimos de cada especie. Por otro lado, la estrategia de fermentación secuencial se diseñó para probar si la *S. stipitis* era capaz de fermentar los azúcares que no fueron ocupados por la *S. cerevisiae* en la fermentación previa. Además, cada fermentación pudo ser realizada en sus condiciones óptimas, de 40°C para la SSF con *S. cerevisiae* y de 30°C para la fermentación con *S. stipitis*.

Existe una clara superioridad en rendimientos por parte de la estrategia secuencial. Éste es de $Y_{e/az} = 0,27$ [g/g], muy similar a los 0,26 [g/g] obtenidos por G. Briones. Aun así, esto no representa el éxito de la estrategia, pues el *peak* de etanol fue obtenido al final de la fermentación SSF con *S. cerevisiae*, y no al final de la fermentación con *S. stipitis*. Es más, los niveles de etanol disminuyen considerablemente luego de la fermentación con *S. stipitis* y tampoco hay una disminución en la concentración de azúcares totales. Ésta disminución de etanol puede estar relacionada al consumo de éste por la levadura. Las levaduras son capaces de utilizar para su crecimiento el mismo etanol que producen (una vez que no se dispone de azúcares fermentables), pues sus enzimas alcohol deshidrogenasas catalizan la reacción de conversión de etanol a aceteldehído en ambos sentidos [81]. La respiración de etanol requiere de pequeñas cantidades de oxígeno el cual, en este caso, estaba presente en el matraz pues se habían dejado condiciones microaeróbicas para la fermentación de las pentosas.

También, la reducción de etanol luego de la fermentación con *S. cerevisiae* pudo deberse a que una pérdida de etanol durante la centrifugación del caldo para retirar la levadura y los restos sólidos. Para confirmar o descartar esta hipótesis, se podría utilizar un control con una concentración de etanol conocida y someterlo a los mismos pasos que las muestras de la fermentación. De esta forma, si la cantidad de etanol disminuye, existiría una pérdida de etanol durante el manejo posterior de las muestras.

En ambas estrategias observamos que existe un rápido consumo de los azúcares totales y en particular de glucosa. Junto con esto, se observa un rápido incremento en los niveles de etanol, siendo mayor en la estrategia secuencial. Los niveles iniciales de azúcares totales fueron ligeramente superiores para el caso de la estrategia secuencial, pero no lo suficiente como para explicar la gran diferencia en los niveles de etanol logrados. Esta menor producción de etanol en el caso simultáneo, pudo deberse a la menor eficiencia fermentadora de *S. stipitis* en comparación a *S. cerevisiae*. También pudo existir una competencia entre ambas levaduras reflejándose en este menor nivel de etanol. Existen antecedentes de las complejidades que acarrea realizar un co-cultivo de estas levaduras, sobre todo, el proveer la cantidad adecuada de oxígeno cuando se requiere fermentar exitosamente una mezcla de glucosa y xilosa utilizando estas levaduras en conjunto. El oxígeno disuelto es rápidamente consumido por *S. cerevisiae*, lo que va en desmedro de la actividad fermentadora de *S. stipitis* [33]. Lo que se ha realizado para mejorar esta situación, es utilizar cepas respiratorio-deficientes de *S. cerevisiae* en conjunto con *S. stipitis* [33]. Esto ha permitido ajustar óptimamente los niveles de O_2 y evitar el consumo de éste por *S. cerevisiae*, obteniéndose rendimientos de $Y_{e/az} = 0,50$ [g/g], versus el 0,39 [g/g] obtenidos en una co-fermentación con *S. cerevisiae* convencional. Es importante notar que el sustrato utilizado en los datos referenciados fue xilosa y glucosa pura, y no proveniente de un hidrolizado de biomasa, lo que explicaría también los altos

rendimientos. En la estrategia aquí presentada, se utilizó una cepa convencional de *S. cerevisiae*, y no se tuvo control de los niveles de O₂ más que dejar condiciones microaeróbicas al inicio de la fermentación. Contradictoriamente, también existen trabajos en los que se ha utilizado exitosamente los co-cultivos de *S. cerevisiae* convencional y *S. stipitis*, alcanzándose rendimientos de etanol de $Y_{e/az} = 0,43$ [g/g] a partir de un hidrolizado de material lignocelulósico [82]. Finalmente, si se contrastan las estrategias simultánea (co-fermentación) y la SSF con *S. stipitis* (Sección 8.3), los rendimientos de la simultánea son mayores, de un $Y_{e/al} = 0,064$ [g/g] e $Y_{e/az} = 0,18$ [g/g] para la simultánea, en contraste con los $Y_{e/al} = 0,044$ [g/g] e $Y_{e/az} = 0,12$ [g/g] de la SSF con *S. stipitis*.

Al comparar los perfiles de azúcares de estas estrategias con la estrategia SSF sólo con *S. stipitis* de la Sección 8.3, Figura 15, la diferencia es clara. El consumo es notoriamente mayor en las estrategias secuencial y simultánea, en las cuales no se observa un incremento en la cantidad de azúcares, sólo una disminución. Esto puede tener su explicación en la alta concentración de levadura inicial (10 [g/l]), la cual consumió rápidamente los azúcares disponibles liberados por la sacarificación, siendo la tasa de consumo más rápida que la de hidrólisis durante todo el proceso. En cambio, en la SSF sólo con *S. stipitis*, la concentración inicial de células fue de 0,6 [g/l], casi 17 veces menos que la simultánea y secuencial, lo que permitió observar el incremento de concentración de azúcares, pero a su vez, pudo incidir en el bajo rendimiento de la estrategia SSF sólo con *S. stipitis*.

La alta concentración de azúcares en $t = 0$ [h] que se observa en ambas estrategias, secuencial y simultánea, puede ser producto de monosacáridos liberados producto de la molienda de la biomasa de alga. A pesar de no haber sido pretratada con ácido, la molienda del alga puede ser considerada un pretratamiento físico. Ésta permitió liberar azúcares fermentables antes de la hidrólisis enzimática y pudo haber favorecido los rendimientos de ésta misma, al debilitar la estructura de los polisacáridos. Esto se observa en las Figuras 13, 14, 15.a y 17 pues en el tiempo cero existen azúcares reductores en solución. Ahora, si comparamos estos niveles iniciales con los observados en la estrategias SSF y la sacarificación SHF de la Sección 8.3, los de secuencial y simultánea son mayores, quizás producto de alguna demora al tomar las muestras o iniciar el experimento luego de aplicar las enzimas. El único azúcar que presentó una curva similar a la observada en la estrategia SSF con *S. stipitis*, fue la xilosa. Ésta aumentó, para luego decaer. En ambas estrategias, simultánea y secuencial, la xilosa llegó a niveles virtualmente cero a las 48 [h]. Esto es esperable en la estrategia simultánea, pues la xilosa es consumida por *S. stipitis* posterior al consumo de hexosas. En la estrategia secuencial, el consumo de xilosa ocurrió durante la fermentación con *S. cerevisiae*, la cual no posee la capacidad de fermentar este azúcar. Esto pudo ocurrir por la presencia de oxígeno dentro del matraz, lo que permitió la respiración de xilosa por *S. cerevisiae*. Entonces, no se puede asegurar que en la estrategia simultánea, la disminución de xilosa haya sido producto del consumo por la *S. stipitis*. Esta disminución pudo ser producto de una respiración de la xilosa por la *S. cerevisiae*, pues existía algo de O₂ al interior del matraz a consecuencia de las condiciones microaeróbicas iniciales.

CAPÍTULO IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

9. CONCLUSIONES

El presente trabajo tuvo la finalidad de realizar estudios exploratorios sobre la producción de bioetanol a partir de algas utilizando la levadura *Scheffersomyces stipitis*. Además, se generó nueva información acerca de la composición de dos especies de algas, *Macrocystis pyrifera* y *Ulva rigida*, la cual servirá para futuros estudios que involucren el uso de estas especies en la producción de bioetanol.

Para seguir avanzando en el desarrollo de procesos eficientes y económicamente sustentables para la producción de biocombustibles de tercera generación, es necesario aumentar el conocimiento de la composición y estructuras de las algas. De esta forma, se podrán elegir adecuadamente las especies que sean más aptas para la producción de biocombustibles. Para el caso del bioetanol, es ideal que las algas escogidas contengan grandes cantidades de carbohidratos simples y que conformen polisacáridos que sean fácilmente hidrolizables, con el fin de obtener altos rendimientos de azúcares, y por ende, de etanol. Realizar un estudio de la composición de las algas es complejo, pues muchas cambian su constitución dependiendo de la estación y localización geográfica, además de que sus compuestos son más variados que en las plantas terrestres, las cuales están conformadas principalmente de celulosa.

En este estudio sólo se analizó una parte de la gran variedad de monosacáridos que componen las algas *Macrocystis pyrifera* y *Ulva rigida*, pero la información fue suficiente para continuar con los estudios de producción de etanol. Se determinó que *M. pyrifera* y *U. rigida* están compuestas en un 43,8% y 36,3% de azúcares reductores, respectivamente. De estos azúcares reductores, para *M. pyrifera* la glucosa y xilosa representan el 7% y 5%, respectivamente, mientras que para *U. rigida* la glucosa y xilosa representan el 28% y el 8%, respectivamente. En ambas algas, la mayor cantidad de azúcares corresponde a otros monosacáridos que no fueron determinados, siendo un 88% para *M. pyrifera* y un 64% para *U. rigida*. Estas composiciones permitieron escoger el alga más adecuada para continuar la investigación, eligiéndose *Ulva rigida*, básicamente por la concentración levemente mayor de xilosa (0,028 [g/g alga]) y porque sólo requiere de una molienda como un pretratamiento físico, siendo suficiente para acondicionar la biomasa para la hidrólisis. En *U. rigida* el porcentaje de xilosa en el total de azúcares es bajo, por lo que su conversión a etanol no representa un gran aumento del rendimiento global. Aun así, puede haber otras pentosas en la fracción de azúcares no determinados, que sean fermentables y estén en mayor cantidad, como arabinosa. En conclusión, se pudo completar exitosamente el primer objetivo específico de este trabajo.

Con respecto a la hidrólisis enzimática de la biomasa, este punto viene siendo uno de los más relevantes dentro del proceso productivo, pues es crucial liberar el máximo de azúcares para que estén disponibles para la fermentación. Para encontrar el conjunto de enzimas adecuado para liberar el máximo de azúcares, es necesario conocer muy bien la composición del material a hidrolizar. Para el caso de las algas se vio que es muy complicado extrapolar de una especie a otra, pues la composición de polisacáridos varía enormemente.

Las hemicelulasas debiesen ser las enzimas principales en la sacarificación de esta alga, pues, dado que la glucosa sólo representa el 28% de la composición de azúcares, el

porcentaje restante debe estar mayoritariamente conformando alguna de las tantas hemicelulosas existentes. Esto fue corroborado al observar el rendimiento de las sacarificaciones, en las cuales se liberaba casi la totalidad de la glucosa (92% de ella, comprobándose la efectividad de las celulasas y celobiasas, así como su predilección por celulosa o glucanos), pero sólo fue liberado un 38% de xilosa y un 22% de otros azúcares. Lamentablemente, en este estudio sólo se determinó la concentración de glucosa y xilosa, quedando abierta la tarea de cuantificar todos los azúcares e idealmente sus polisacáridos. Esto permitiría elegir adecuadamente las enzimas para la sacarificación y sus proporciones, reduciendo costos y maximizando rendimientos al momento de llevar el método a una escala industrial.

En relación al segundo objetivo específico, se comparó las estrategias SHF y SSF con *S. stipitis*, concluyendo que SSF es la más exitosa. Los rendimientos fueron de nulos para SHF y de $Y_{e/al} = 0,044$ para SSF. La presencia de inhibidores formados durante la hidrólisis enzimática y la presencia de sales provenientes del alga, en conjunto con una baja concentración celular inicial, parecen ser las causas más probables del fracaso de la estrategia SHF. Utilizando la estrategia SSF se logró producir etanol aunque con rendimientos más bajos que en trabajos previos sobre esta misma alga y con *S. cerevisiae* (G. Briones [24]). Aun así, la baja concentración de levaduras inicial, la utilización de enzimas poco adecuadas para la hidrólisis, la baja temperatura del proceso (20°C menor que la óptima para sacarificación) y la menor eficiencia fermentadora de *S. stipitis*, pueden haber influido en los bajos rendimientos. Es por esto que, si se continúan optimizando los factores involucrados, no se descarta la posibilidad de obtener mejores rendimientos con esta estrategia.

En base al tercer y último objetivo específicos, se concluye que la estrategia secuencial entrega mayores rendimientos que la estrategia de fermentación simultánea. No obstante, los altos rendimientos obtenidos no fueron producto de la fermentación con *S. stipitis*, si no que producto de la fermentación con *S. cerevisiae*. La levadura *S. stipitis* no aumentó los rendimientos de etanol pues no fermentó ningún azúcar reductor, que era lo que se esperaba. El rendimiento de la estrategia simultánea ($Y_{e/al} = 0,064$) fue menor que el de la secuencial ($Y_{e/al} = 0,099$), pero mayores que la estrategia SSF sólo con *S. stipitis* ($Y_{e/al} = 0,044$). Dado que los factores de oxigenación y proporciones de células iniciales parecen ser fundamentales al momento de mejorar la estrategia de fermentación simultánea, queda un espacio abierto para continuar con la optimización de estos factores.

En general, el estudio entregó información valiosa acerca de la producción de bioetanol a partir del alga *U. rigida* utilizando *S. stipitis*, y además, se obtuvo más información acerca de la composición del alga. En base a esto, se determinó que la xilosa no es el principal componente de los carbohidratos del alga, por lo que la fermentación con una especie capaz de fermentar xilosas puede no ser la mejor estrategia. Aun así, un 64% de los azúcares no está determinado, de los cuales un porcentaje no menor podría corresponder a otras pentosas como arabinosa. Esto deja la puerta abierta para continuar con los estudios de caracterización del alga y fermentación con *S. stipitis*.

En base a lo observado durante este trabajo y en lo observado en otras investigaciones, se concluye que es difícil extrapolar los resultados de un trabajo a otro, pues al cambiar el tipo de pretratamiento, las enzimas para la hidrólisis y la materia prima, cambian los compuestos que puedan inhibir a ciertas enzimas o ciertos microorganismos. Para lograr

un proceso eficiente, se deberá idealmente conocer en detalle la composición de la materia prima, determinar adecuadamente los pretratamientos y enzimas a utilizar, y finalmente, elegir el o los mejores microorganismos para aprovechar al máximo los azúcares disponibles.

10. RECOMENDACIONES

De los resultados y discusiones, surgen muchas recomendaciones de nuevos estudios relacionados al trabajo e ideas para mejorar los experimentos ya realizados. Estas se detallan a continuación.

- Realizar un análisis acabado de los polisacáridos que componen el alga *U. rigida*, y en general de la biomasa a utilizar. Conocer a cabalidad las estructuras de la biomasa permite elegir adecuadamente los pretratamientos necesarios y las enzimas a utilizar en la sacarificación, así como el o los microorganismos que fermentaran los azúcares liberados.
- En relación a la biomasa utilizada, el alga *U. rigida*, se recomienda probar otros pretratamientos como el uso de líquidos iónicos, explosión a vapor o biológicos. En los trabajos de G. Briones [24] sólo se probó con hidrólisis ácida, el cual fue contraproducente probablemente por la gran cantidad de inhibidores formados. Otros pretratamientos podrían contribuir a los rendimientos finales de sacarificación y fermentación.
- Utilizar enzimas especializadas en la hidrólisis de hemicelulosa para la etapa de sacarificación, como xilanasas u otras. Esto debiera aumentar enormemente el rendimiento de la sacarificación de *U. rigida*. También se podría analizar la eficiencia de Celluclast® y Novozyme® sobre un sustrato hemicelulósico, para probar que sólo estas dos enzimas no son suficientes cuando la biomasa contiene grandes cantidades de hemicelulosa. Además, se podría medir la cantidad de azúcares que se retienen en la fracción sólida al final de la sacarificación.
- El uso de surfactantes, como Tween® 20 y polietilenglicol, es común para mejorar los rendimientos de la sacarificación en material lignocelulósico. Una de estas razones parece ser que previenen la adsorción improductiva de las enzimas al material, lo que aumenta la hidrólisis [56]. Dado que las algas contienen cantidades distintas de lignina, el uso de estos surfactantes puede mejorar los rendimientos del proceso en las estrategias SSF y SHF.
- Conociendo los monosacáridos que componen la biomasa, los inóculos pueden ser ambientados en medios que contengan proporciones de azúcares similares a los que componen la materia prima, y en condiciones de oxigenación similares a las que se realizará la fermentación. De esta forma, se activarán previamente las vías metabólicas involucradas en la fermentación de estos carbohidratos. Análogamente, si se conocen los inhibidores que puedan estar presentes en la sacarificación y fermentación, la ambientación podría llevarse en medios que contengan pequeñas cantidades de estos compuestos.

- Analizar el efecto de la concentración de células iniciales en las estrategias SSF y SHF, Además, se podría determinar la temperatura óptima para la estrategia SSF utilizando sólo *S. stipitis*. En SHF, medir la conductividad de las muestras de alga para estimar la concentración de sales y revisar si existen antecedentes de inhibición por sales de *S. stipitis*.
- Realizar recuentos en placas de microorganismos vivos en caso de dudas sobre contaminación o actividad de las levaduras.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] THE Colorado River Commission of Nevada. World fossil reserves and Projected Depletion. 2002.
- [2] SCHENK, P.M., THOMAS-HALL, E., STEPHENS, E., MARX, U., MUSSGNUN, J., POSTEN, C., KRUSE, O., HANKAMER, B. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. BioEnergy Research 1(1): 20–43. 2008.
- [3] SINGH, A., NIGAM, P., MURPHY, J.D. Renewable Fuels from Algae: An answer to debatable land based fuels. Bioresource Techonology. 102: 10-16. 2011.
- [4] MACHADO, C. Situación de los Biocombustibles de 2da y 3era Generación en América Latina y Caribe. En: V Seminario Latinoamericano y del Caribe de Biocombustibles. 17 y 18 de Agosto, 2010.
- [5] BRITISH Petroleum Company. BP Statistical Review of World Energy. Junio, 2012. [en línea] <<http://www.bp.com/statisticalreview>> [consulta: 01 Febrero 2013]
- [6] BRITISH Petroleum Company. BP Energy Outlook 2030. Enero, 2013. [en línea] <<http://www.bp.com/statisticalreview>> [consulta: 04 Febrero 2013]
- [7] NIGAM, P.S., SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. Progress Energ. Combust. Sci. 2010.
- [8] PATIL, V., TRAN, K.Q., GISELRØD, H. R. Towards sustainable production of biofuels from microalgae. International journal of molecular sciences, 9:7, 1188–95. 2008.
- [9] ROJAN, J., ANISHA, G.S., NAMPOOTHIRI, K., PANDEY, A. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. Bioresource Techonology. 102:186-193. 2010.
- [10] WANG, X., LIU, X., WANG, G. Two-stage hydrolysis of invasive algal feedstock for Ethanol fermentation. Journal for Integrative Plant Biology. 53(3):246-252. 2011.
- [11] LEE, S., OH, Y., KIM, D., KWON, D., LEE, C., LEE, J. Converting Carbohydrates Extracted from Marine Algae into Ethanol using various Ethanolic Escherichia coli strains. Applied Biochemisty Biotechnology. 164:878-888. 2011.
- [12] DEMIRBAS, M.F. Biofuels from algae for sustainable development. Applied Energy. 88:3473-3480. 2011.
- [13] ROSS, A.B., JONES, J.M., KUBACKI, M.L., BRIDGEMAN, T. Classification of macroalgae as fuel and its thermochemical behaviour. Bioresource Technology. 99:6494-504. 2008.
- [14] ADAMS, J., GALLAGHER, J., DONNISON, I. Fermentation study on *Saccharina latissima* for bioethanol production considering variable pre-treatments. Journal of Applied Phycology. 21(5):569-574. 2008.

- [15] PARK, J., LEE, J., SIM, S. Production of hydrogen from marine macro-algae biomass using anaerobic sewage sludge microflora. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 14(3):307-315. 2009.
- [16] CHEN, P., MIN, M., CHEN, Y., WANG, L., LI, Y., CHEN, Q., WAN, Y., WANG, X., CHENG, Y., DENG, S., HENNESY, K., LIN, X., LIU, Y., WANG, Y., MARTINEZ, B., RUAN, R. Review of the biological and engineering aspects of algae to fuels approach. International Journal of Agricultural and Biological Engineering 2(1):.2009.
- [17] YAZDANI, P., KARIMI, K., TAHERZADEH, M.J. Improvement of Enzymatic Hydrolysis of a Marine Macro-Alga by Dilute Acid Hydrolysis Pretreatment. World Renewable Energy Congress. 186–191. 2011.
- [18] HAL, J., LENSTRA, J., REITH, H., LÓPEZ, A.M. Seaweed biorefinery: towards third generation biobased commodities. En: ALG'N Chem, Montpellier, Francia. Energy research Centre of the Netherlands. 2011
- [19] LEE, S., LEE, J., SHIN, G, CHOI, W., KANG, D., LEE, H., JUNG, K. Development of a practical and cost-effective medium for bioethanol production from the seaweed hydrolysate in surface-aerated fermentor by repeated-batch operation. Journal of Microbiology and Biotechnology. 22(1):107-113. 2012.
- [20] WARGACKI, A., LEONARD, E., WIN, M., REGITSKY, D., SANTOS, C., KIM, P., COOPER, S. An Engineered Microbial Platform for Direct Biofuel Production from Brown Macroalgae. Science Magazine. 335:308-313. 2012.
- [21] LEE, S., LEE, J. Ethanol fermentation for main sugar components of brown-algae using various yeasts. Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 18:16-18. 2012.
- [22] YEON, J.H., LEE, S.E., CHOI, W.Y., JUNG, K. Repeated-batch operation of surface-aerated fermentor for bioethanol production from the hydrolysate of seaweed *Sargassum sagamianum*. Journal of Microbiology and Biotechnology. 21(3):323-331. 2011.
- [23] OKUDA, K., OKA, K., ONDA, A., KAJIYOSHI, K. Hydrothermal fractional pretreatment of sea algae and its enhanced enzymatic hydrolysis. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 841: 836–841. 2008.
- [24] BRIONES Parra, Gonzalo Alfonso. Producción de etanol a partir de la macroalga *Ulva rigida*. Tesis (Ingeniero Civil en Biotecnología). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, 2012.
- [25] CHANDEL, A.K., CHANDRASEKHAR, G, RADHIKA, K., RAVINDER, R. Bioconversion of pentose sugars into Ethanol: A review and future directions. Biotechnology and Molecular Biology Review. 6(1):8-20. 2011.
- [26] INGLEDEW, W.M., CASEY, G.P. Ethanol tolerance in yeasts. Critical reviews in Microbiology. 13(3):219-80. 1986.
- [27] WILKEN, Christian. Optimierung der Ethanolproduktion durch Makroalgen. Tesis (Bachelor of Sciences). Berlín, Alemania. University of Applied Sciences, 2012.

- [28] DALE, M.C, MOELHMAN, M. Enzymatic simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of biomass to ethanol in a pilot 130 liter multistage continuous reactor separator. Bio-Process Innovation. 1995.
- [29] LI, Y., PARK, J., SHIROMA, R., TOKUYASU, K. Bioethanol production from rice straw by a sequential use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* with heat inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* cells prior to xylose fermentation. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2011.
- [30] CHANDEL, A, LAKSHMI, G., VENKATESWAR, N. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of aqueous ammonia pretreated *Saccharum spontaneum* (wild sugarcane) for second generation ethanol production. Sugar Tech. 12(2):125-132. 2010.
- [31] CHEN, Y. Development and application of co-culture for ethanol production by co-fermentation of glucose and xylose: a systematic review. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 38:581-597. 2011.
- [32] TANIGUCHI, M., ITAYA, T., TOHMA, T. Ethanol Production from a Mixture of Glucose and Xylose by a Novel Co-Culture System with Two Fermentors and Two Microfiltration Modules. Journal of Fermentation and Bioengineering. 84(1):59-64. 1997.
- [33] TANIGUCHI, M., ITAYA, T., TOHMA, T. Ethanol Production from a Mixture of Glucose and Xylose by Co-Culture of *Pichia stipitis* and a Respiratory- Deficient Mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Fermentation and Bioengineering. 83(4):364-370. 1997.
- [34] SÁNCHEZ, O., CARDONA, C. Producción biotecnológica de alcohol carburante I: Obtención a partir de diferentes materias primas. Interciencia. 30(11): 671–678. 2005.
- [35] BIOCOMBUSTIBLES.cl. Bioetanol. 2010. [en línea] <http://www.biocombustibles.cl/site/productos_bioetanol.htm> [consulta: 19 Febrero 2013]
- [36] PEREIRA JUNIOR, N. [BR]. Production of ethanol from algae. Br. WO2007/101172. C12P7/06. 04/06/2009.
- [37] ROESIJADI, G., JONES, S., ZHU, Y. Macroalgae as a biomass feedstock: A preliminary analysis. U.S Department of Energy. 2010.
- [38] GOH, C.S., LEE, K.T. A visionary and conceptual macroalgae-based third-generation bioethanol (TGB) biorefinery in Sabah, Malaysia as an underlay for renewable and sustainable development. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14(2): 842–848. 2010.
- [39] PEZOA, R. CORTINEZ, V. HYVÄRINEN, S. REUNANEN, M. HEMMING, J. LIENQUEO, M. E. SALAZAR, O., CARMONA, R., GARCIA, A., MURZIN, D., MIKKOLA, J. Use of ionic liquids in the pretreatment of forest and agricultural residues for the production of bioethanol. Cellulose Chemistry and Technology. 44(4-6): 165–172. 2010.

- [40] ZHAO, C., RUAN, L. Biodegradation of *Enteromorpha prolifera* by mangrove degrading micro-community with physical-chemical pretreatment. Applied microbiology and biotechnology. 92(4): 709–716. 2011.
- [41] BASKAR, Chinnappan, BASKAR, Shikha y DHILLON, Ranjit. Biomass Conversion: The Interface of Biotechnology, Chemistry and Materials Science. Springer, 2012. 56p.
- [42] O’SULLIVAN, L. MURPHY, B., MCLOUGHLIN, P. Prebiotics from marine macroalgae for human and animal health applications. Marine drugs. 8(7): 2038–64. 2010.
- [43] THE SEAWEED SITE. What are seaweeds? [en línea] <<http://www.seaweed.ie/algae/seaweeds.php>> [consulta: 19 Febrero 2013]
- [44] AULADOS, Botánica. Phaeophytas (algas pardas) [en línea] <http://www.aulados.net/Botanica/Curso_Botanica/Algas_pardas/7_Phaeophyta_texto.pdf> [consulta: 20 Febrero 2013].
- [45] AULADOS, Botánica. Phaeophytas (algas rojas) [en línea] <http://www.aulados.net/Botanica/Curso_Botanica/Algas_rojas/8_Rhodophyta_texto.pdf> [consulta: 20 Febrero 2013].
- [46] ACUARIOFILIA. Algas rojas, Rodófitos [en línea] <<http://www.acuariofilia.net/tipos-de-algas/algas-rojas-rodofitos.html>> [consulta: 20 Febrero 2013].
- [47] USUV, A. Polysaccharides of the red algae. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 65:115-217. 2011.
- [48] AULADOS, Botánica. Phaeophytas (algas verdes) [en línea] <www.aulados.net/Botanica/Curso_Botanica/Algas_verdes/9_Chlorophyta_texto.pdf> [consulta: 20 Febrero 2013].
- [49] PATTERSON, William Duncan. Algal Physiology and Biochemistry. University of California Press. 1974.
- [50] ALGAEBASE. *Macrocystis pyrifera* (Linnaeus) C. Agardh 1820 [en línea] <http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=4427> [consulta: 20 Febrero 2013]
- [51] ALGAEBASE. *Ulva rigida* C. Agardh 1823 [en línea] <http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=40> [consulta: 20 Febrero 2013]
- [52] LOBBAN, Christopher S. y IARRISON, Paul J. Seaweed Ecology and Physiology. Cambridge University Press. 1994. 14p.
- [53] COUGHLAN, M. Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: An Overview. Bioresource Technology, 39:107-115. 1999.
- [54] LEHNINGER, A. Principles of Biochemistry. Freeman. 2005.

- [55] COMPLEX Carbohydrate Research center. Hemicelluloses. [en línea] <<http://www.crc.uga.edu/~mao/xyloglc/Xtext.htm>> [consulta: 21 Febrero 2013]
- [56] TAHERZADEH, M., KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. BioResources. 2(4):707-738. 2007.
- [57] OVANDO, S., KALISZEWSKI, K. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. Universidad y Ciencia. 21: 113-122. 2005.
- [58] PERSSON, I., TJERNELD, F., HAHN-HÄGERDAL, B. Fungal cellulolytic enzymes production: a review. Process Biochemistry, 26: 65-74. 1991.
- [59] JUNG, S.K., PARISUTHAN, V., JEONG, S.H., LEE, S.K. Heterologous Expression of Plant Cell Wall Degrading Enzymes for Effective Production of Cellulosic Biofuels. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2012.
- [60] DARKU, I., RICHARD, T. Biofuels: Ethanol Producers. Encyclopedia of Life Sciences. 2001.
- [61] LIU, T. ZOU, W., LIU, L. A constraint-based model of *Scheffersomyces stipitis* for improved ethanol production. Biotechnology for Biofuels. 5(1): 72. 2012.
- [62] LEE, T., KIM, M., KIM, K. PARK, K. A Parametric Study on Ethanol Production from Xylose by *Pichia stipitis*. Biotechnol. Bioprocess. Eng. 5:27-31, 2000.
- [63] MITSUNORI, Y., KANAMI, N., OSAMU, A., KIYOHICO, N. Production of high concentrations of bioethanol from seaweeds that contain easily hydrolyzable polysaccharides. Process Biochemistry. 46(11):2111-2116. 2011.
- [64] JURI Awad, Sebastián Andrés. Sacarificación y fermentación simultánea para la producción de bioetanol de segunda generación, mediante pre-tratamientos alternativos: líquidos iónicos reciclados y hongos de pudrición blanca. Memoria (Ingeniero Civil en Biotecnología). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, 2011.
- [65] SKOOG, K., HAHN-HÄGERDAL, B. Effect of Oxygenation on Xylose Fermentation by *Pichia stipitis*. Applied and environmental microbiology. 56(11):3389-94. 1990.
- [66] SLININGER, P.J., BOTHAST, R.J., LADISCH, M.R., OKOS, M.R. Optimum pH and temperature conditions for xylose fermentation by *Pichia stipitis*. Biotechnology and Bioengineering. 35:727-731, 1990.
- [67] PEZOA Conte, Ricardo Miguel. Estudio de pretratamiento con ácido y líquidos iónicos en residuos agrícolas para la producción de bioetanol de segunda generación. Tesis (Magíster en Ciencias de la Ingeniería, Mención Química). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, 2010.
- [68] BAJWA, P.K. PINEL, D., MARTIN, V. Strain improvement of the pentose-fermenting yeast *Pichia stipitis* by genome shuffling. Journal of Microbiological Methods. 81(2): 179-86. 2010.

- [69] BAJWA, P.K. SHIREEN, D., D'AOUST, F. Mutants of the pentose-fermenting yeast *Pichia stipitis* with improved tolerance to inhibitors in hardwood spent sulfite liquor. Biotechnology and Bioengineering. 104(5): 892–900. 2009.
- [70] HARRIS Correa, Ricardo José. Selección de pretratamientos en base a caracterización físico-química de residuos de *Eucalyptus globulus* y *Populus canadiensis* para la producción de bioetanol. Tesis (Magíster en Ciencias de la Ingeniería, Mención Química) Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, 2012.
- [71] MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31:426–428. 1959.
- [72] GOEL, R.K. Laboratory Techniques in Sericulture. APH Publishing Corporation. 2007. 370p.
- [73] SATPATI, G.G., PAL, R. Biochemical composition and lipid characterization of marine green alga *Ulva rigida*- a nutritional approach. Journal of Algal Biomass Utilization. 2(4): 10–13. 2011.
- [74] ROBIC, A. BERTRAND, D., SASSI, J. Determination of the chemical composition of ulvan, a cell wall polysaccharide from *Ulva* spp. (Ulvales, Chlorophyta) by FT-IR and chemometrics. Journal of Applied Phycology. 21 (4): 451–456. 2008.
- [75] SIDDHANTA, A.K., GOSWAMI, A., RAMAVAT, B. Water soluble polysaccharides of marine algal species of *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta) of Indian waters. Indian Journal of Marine Sciences. 30: 166–172. 2001.
- [76] GE, L., WANG, P., MOU, H. Study on saccharification techniques of seaweed wastes for the transformation of ethanol. Renewable Energy. 36(1):84-89. 2010.
- [77] BORDENAVE, N. Hemicelluloses. 2009 [en línea] <http://www.cfs.purdue.edu/class/f&n630/pdf_full/hemicelluloses_NB.pdf> [consulta: 26 Febrero 2013]
- [78] FERREIRA, A.D. MUSSATTO, S., CADETE, R. Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian forest. Yeast. 28:547–554. 2011.
- [79] NIKLITSCHK Contente, Tomás Andrés. Selección de condiciones de fermentación de residuos de lenga para la producción de bioetanol. Memoria (Ingeniero Civil en Biotecnología) Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, 2010.
- [80] BICHO, P., RUNNALS, L., CUNNINGHAM, J., LEE, H. Induction of Xylose Reductase and Xylitol Dehydrogenase Activities in *Pachysolen tannophilus* and *Pichia stipitis* on Mixed Sugars. Applied and Environmental Microbiology. 54(1): 50-54. 1988.
- [81] CHO, J.Y., JEFFRIES, T.W. *Pichia stipitis* genes for alcohol dehydrogenase with fermentative and respiratory functions. Applied and Environmental Microbiology. 64(4): 1350–8. 1998.

[82] WAN, P., ZHAI, D., WANG, Z. Ethanol Production from Nondetoxified Dilute-Acid Lignocellulosic Hydrolysate by Cocultures of *Saccharomyces cerevisiae* Y5 and *Pichia stipitis* CBS6054. Biotechnology Research International. 2012: 1-6. 2012.

ANEXOS

Anexo A. Proyecciones de uso de fuentes de energía para el año 2030

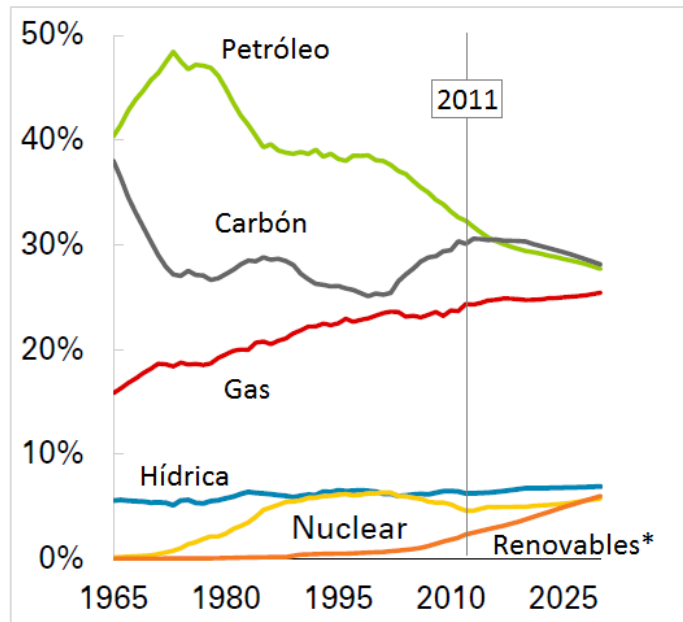


Figura 18. Proyecciones en el uso de los distintos tipos de fuentes energéticas para el año 2030. (*) Incluye biocombustibles.

Anexo B. Macroalgas pardas, rojas y verdes



Figura 19. Alga parda *Macrocystis pyrifera*.



Figura 20. Alga roja *Palmaria palmata*.



Figura 21. Alga verde *Ulva rigida*.

Anexo C. Estructura de la pared de las algas pardas

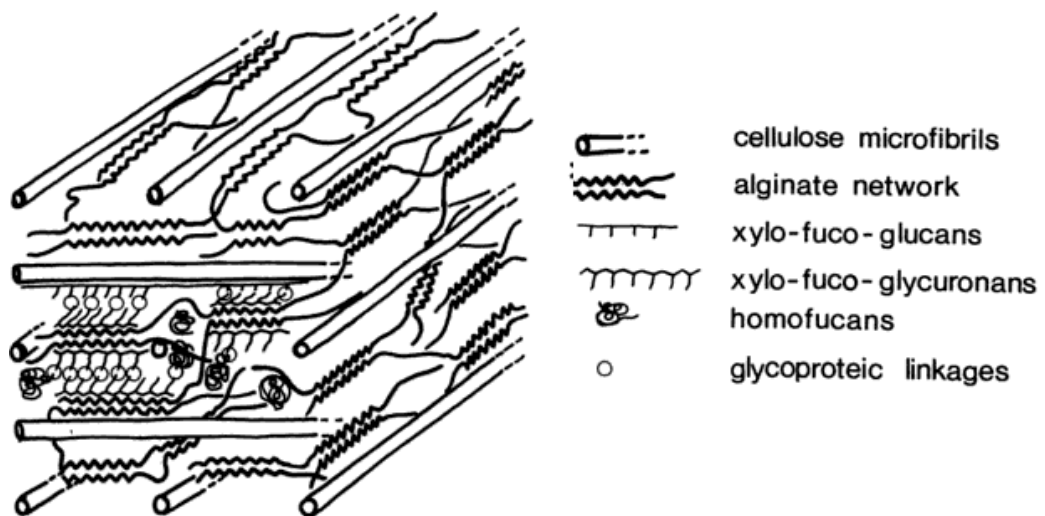


Figura 22. Esquema de la estructura y composición de la pared celular de las algas pardas [52].

Anexo D. Estructuras moleculares de algunos monosacáridos

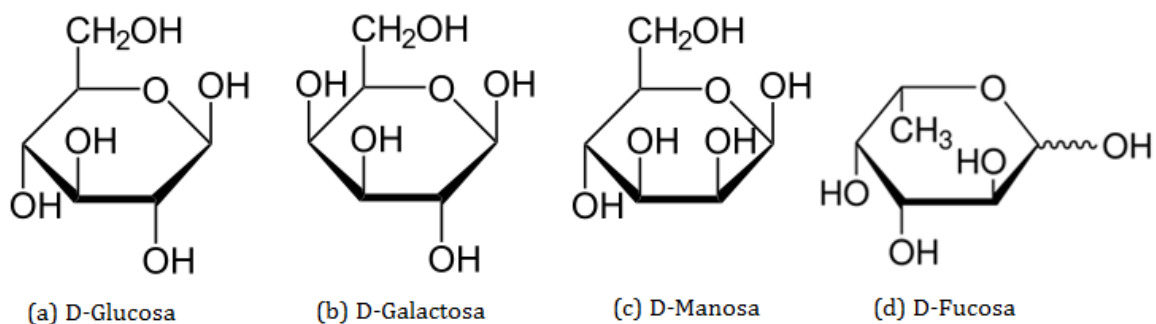


Figura 23. Estructuras moleculares de algunas hexosas.

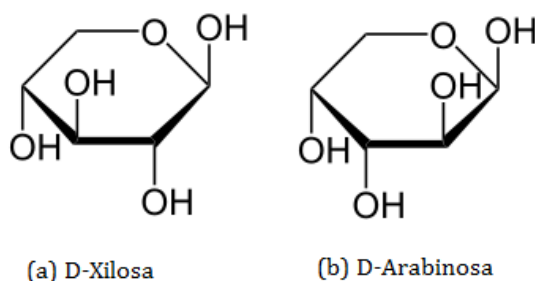


Figura 24. Estructuras moleculares de algunas pentosas.

Anexo E. Fermentación

La siguiente tabla muestra algunas levaduras, hongos filamentosos y bacterias capaces de fermentar pentosas y sus condiciones óptimas de operación.

Tabla 8. Algunos microorganismos fermentadores de pentosas y las condiciones óptimas de cultivo. (+) indica que es capaz de fermentar. (-) indica incapacidad de fermentar. Glu: glucosa. Man: manos. Xil: xilosa. Ara: arabinosa. Cel: celulosa. (adaptado de [25])

Microorganismo	Hexosas		Pentosas		Cel	Temperatura °C	pH
	Glu	Man	Xil	Ara			
Hongos filamentosos							
<i>Fusarium oxysporum</i>	+	+	+	+	+	28 - 32	5 - 6
<i>Neurospora crassa</i>	+	-	+	-	+	28 - 37	5 - 6
Levaduras							
<i>Klyuvermyces marxians</i>	+	+	+	+	-	30 - 35	3 - 7
<i>Candida shehatae</i>	+	+	+	+	-	28 - 32	3 - 7
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	+	+	+	+	-	28 - 32	3 - 7
Bacterias Mesófilas							
<i>Bacillus polymyxa</i>	+	+	+	+	-	35 - 37	5,5 - 8
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	+	+	+	+	+	35 - 37	4 - 8

A continuación se muestra un esquema simplificado de las vías metabólicas utilizadas por los microorganismos para fermentar galactosa, glucosa, arabinosa y xilosa a etanol. No se muestran todas las enzimas involucradas.

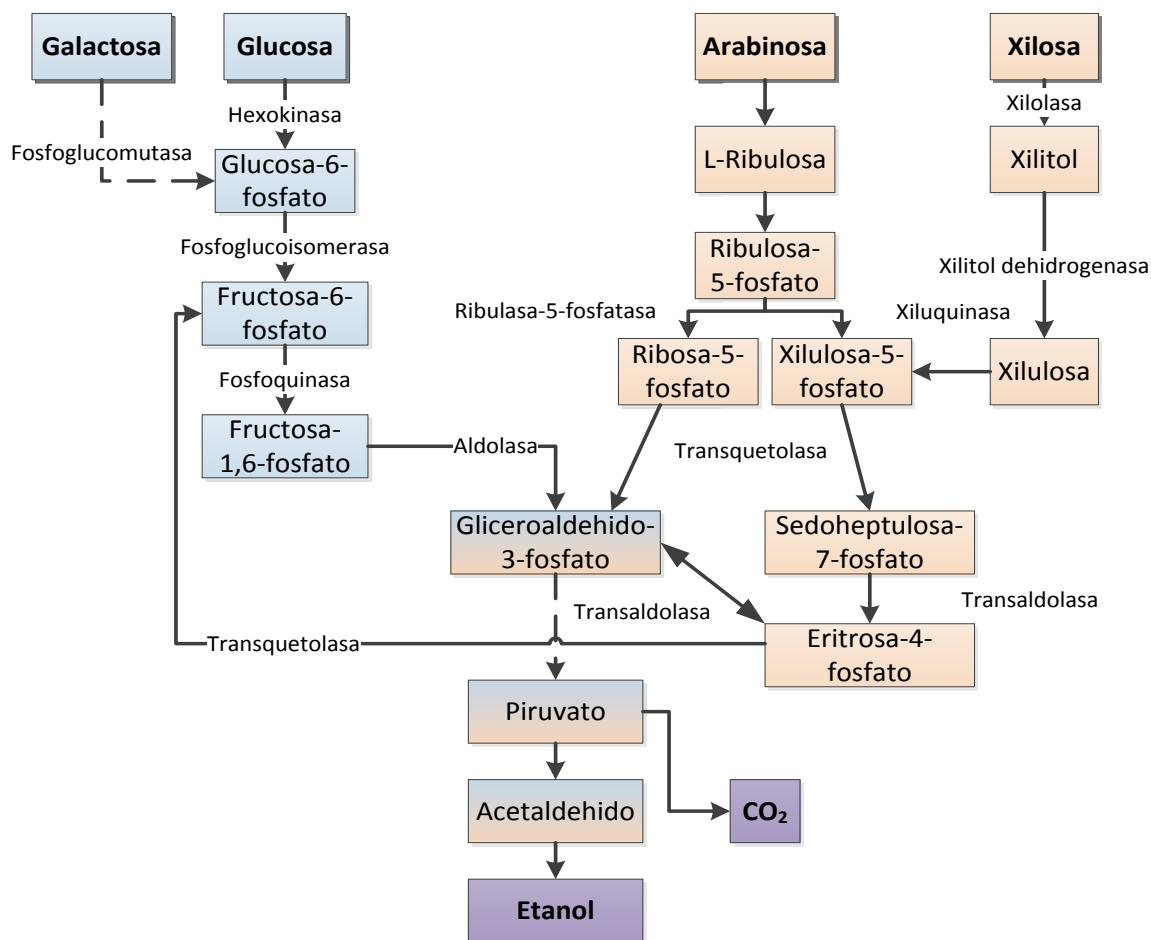


Figura 25. Vías metabólicas involucradas en la fermentación etílica. En azul se muestra la vía de las hexosas y en rojo la vía de las pentosas (adaptado de [60]).

Anexo F. Descripción de diagramas de bloques

Figura 8. El procedimiento mostrado en esta figura describe las etapas realizadas para la determinación de las concentraciones de azúcares de las algas *M. pyrifera* y *U. rigida*. Inicialmente, las muestras de alga fueron molidas hasta un polvo fino y luego secadas para eliminar los restos de humedad. Posteriormente, se realizó la hidrólisis con ácido sulfúrico al 72% de acuerdo método descrito en Sección 7.1. El ácido debiera hidrolizar la totalidad de los polisacáridos que componen el alga y liberar los monómeros a la solución. Luego de la hidrólisis, la solución fue filtrada para separar los sólidos insolubles y la fracción líquida fue neutralizada para la posterior medición de azúcares. En base a los resultados de composición de azúcares de cada alga, se eligió una para continuar con los estudios de sacarificación y fermentación usando *S. stipitis*.

Figura 9. La biomasa de alga, previamente molida hasta polvo fino, fue secada y utilizada como sustrato en las estrategias SHF y SSF. En SHF, la biomasa fue inicialmente sacarificada utilizando enzimas celulasas y celobiasas. Los azúcares se midieron a lo largo del proceso. Luego, el hidrolizado fue centrifugado descartando la fracción sólida y utilizando la fracción líquida como medio para la fermentación con *S. stipitis*. Los azúcares y etanol fueron medidos a lo largo del proceso. En SSF, la biomasa fue sometida a una sacarificación y fermentación simultáneas en un mismo matraz utilizando *S. stipitis*, procesos durante el cual se midieron azúcares y etanol. Al comparar los resultados de ambas estrategias, se determinó la estrategia más efectiva para la producción de etanol.

Figura 10. La biomasa de alga, previamente molida hasta polvo fino, fue secada y utilizada como sustrato en las estrategias de fermentación secuencial y simultánea. La estrategia secuencial consideró inicialmente una fermentación y sacarificación SSF con *S. cerevisiae*, midiéndose azúcares y etanol. Al término del proceso, el caldo fue centrifugado, descartándose la fracción sólida. La fracción líquida fue utilizada como medio para la fermentación SHF con *S. stipitis*. Se midió etanol y azúcares. La estrategia simultánea consideró una co-fermentación y sacarificación simultánea con ambas levaduras, midiéndose etanol y azúcares a lo largo del proceso.

Anexo G. Medio de cultivo para *S. stipitis* y mantención de la cepa

G1. Composición de medio YPD

El medio utilizado para cultivar la levadura *S. stipitis* fue preparado con los siguientes compuestos:

1% Extracto de levadura	(Bacto™ Yeast Extract, BD)
2% Glucosa	(D(+)-Glucose, Merck)
2% Peptona (reemplazado por triptona)	(Bacto™ Tryptone, BD)
2% Agar (para medio sólido)	

G2. Stock a -80°C de *S. stipitis* 20% glicerol

Se preparan 20 [ml] de medio YPD en matraz Erlenmeyer, se autoclava y luego inocula con una colonia de *S. stipitis* sacadas del stock de placas. Se deja crecer por 48 horas a 30°C a 250 rpm. Se toman 750 [µl] del cultivo y se mezclan con 250 [µl] de glicerol al 80%. Los tubos se agitan y se guardan a -80°C.

Anexo H. Matraces modificados

Los matraces modificados utilizados para las fermentaciones se muestran a continuación.

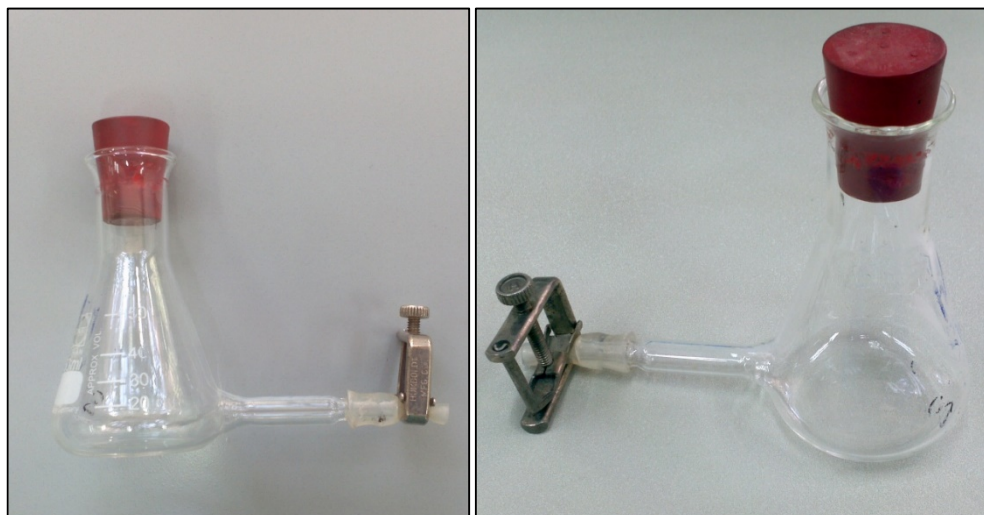


Figura 26. Matraces Erlenmeyer modificados de 20 [ml].

Las muestras fueron tomadas desde el fondo del matraz a través del tubo, de manera de conservar las condiciones anaeróbicas o microaeróbicas del interior.

Anexo I. Crecimiento *S. stipitis* y cálculo de concentración de biomasa

Se realizó un análisis del crecimiento de *Scheffersomyces stipitis* con el fin de encontrar una relación entre la absorbancia medida a 600 [nm] y el peso seco de la biomasa de levadura. El medio de cultivo de 200 [ml] estuvo compuesto de glucosa 10 [g/l], triptona 10 [g/l] y extracto de levadura 5 [g/l]. La absorbancia fue registrada a lo largo del tiempo, así como el peso seco de las muestras. El peso seco de levadura fue obtenido sacando muestras de 1 [ml] en los distintos tiempos y dejando secar por 24 [h] en una estufa a 60°C. Se registraron los pesos de los tubos Eppendorf previamente, para luego pesarlos con la biomasa seca, obteniéndose el peso seco de levadura a través de la diferencia de estos valores.

Para poder estimar la concentración de levadura en base a la absorbancia medida a 600 [nm], se graficó la concentración en función de la absorbancia. Posteriormente se realizó una regresión lineal para encontrar la relación. El gráfico y la ecuación de la recta se muestran a continuación.

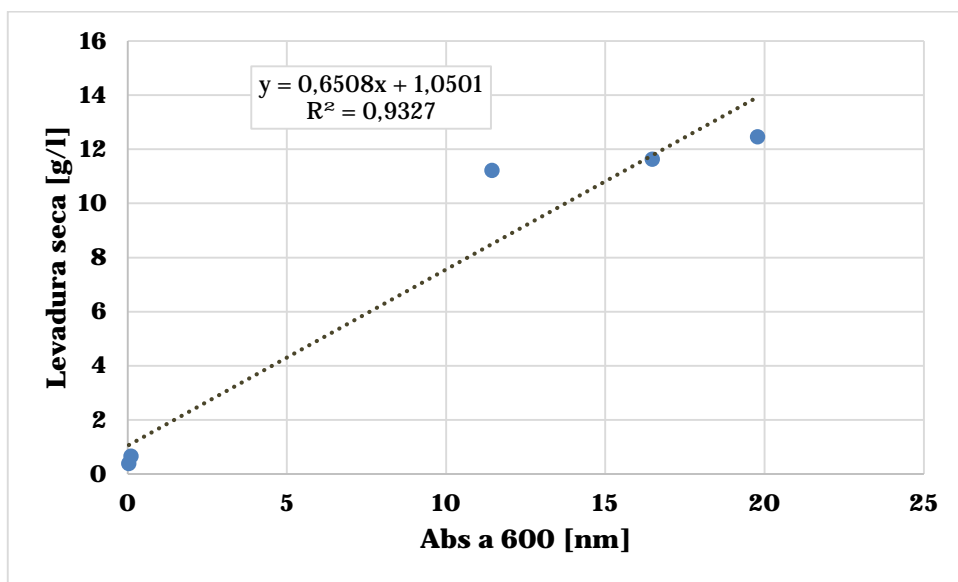


Figura 27. Relación entre la concentración de levadura seca y la absorbancia medida a 600 [nm].

Con esto, la estimación de la concentración de levadura seca queda dada por la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración } \left[\frac{g}{l} \right] = 0,6508 \cdot \text{Abs} + 1,0501 \quad \text{ec. (8)}$$

Anexo J. Curva de calibración para el método del DNS

Se realizaron diluciones de glucosa entre 0 y 2 [g/l], las cuales se sometieron al método del DNS. A grandes rasgos, se toman 90 [μl] de muestra y 90 [μl] del reactivo DNS, se mezclan en un tubo y se calienta a 90°C en un baño seco por 10 [min]. Se deja enfriar en hielo por 5 [min]. Se traspasan 100 [μl] a una placa de 96 pocillos y se mide la absorbancia a 550 [nm]. En caso de exceder el rango de la curva de calibración, se diluye la muestra inicial.

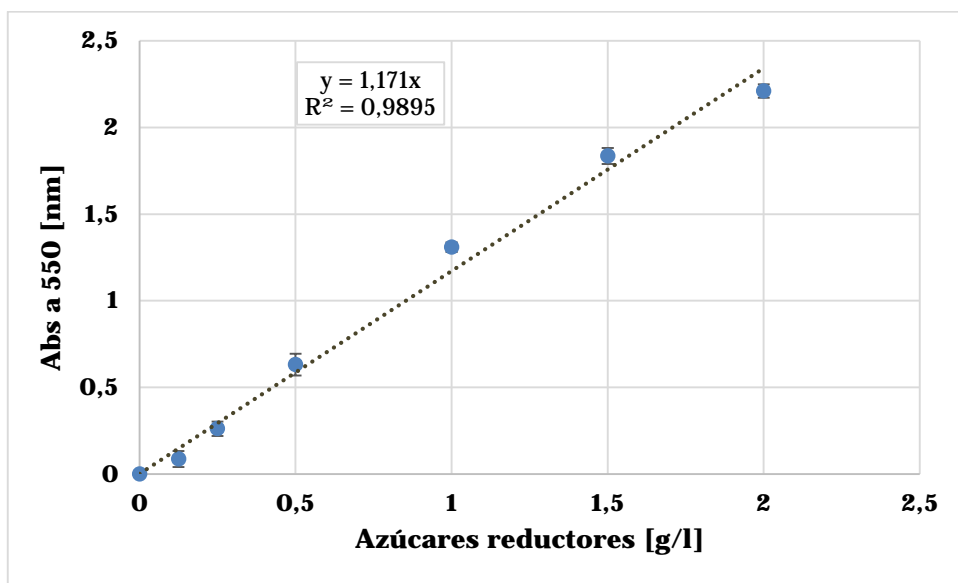


Figura 28. Curva de calibración para el método del DNS. Se usó glucosa como estándar.

Anexo K. Curva de calibración de etanol

La estimación del etanol presente en las muestra se realizó utilizando la fórmula obtenida de la curva de calibración de etanol. Esta relaciona el área bajo la curva del *peak* de etanol con el etanol presente en la muestra.

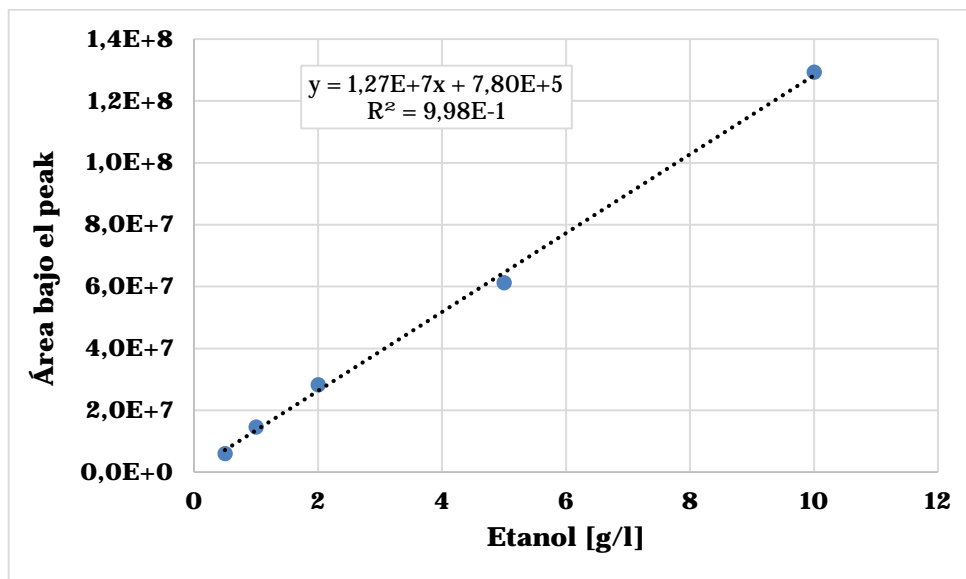


Figura 29. Curva de calibración de etanol para el cromatógrafo de gases.

La fórmula utilizada para la conversión se muestra a continuación.

$$Etanol \left[\frac{g}{l} \right] = \frac{(\text{Área} - 779.921)}{12.744.271} \quad \text{ec. (9)}$$

Anexo L. Datos de las concentraciones de azúcares

La siguiente tabla muéstralos datos de las concentraciones de azúcares encontradas para las dos algas estudiadas.

Tabla 9. Concentraciones de azúcares de las algas en [g/g de alga seca].

	<i>M. pyrifera</i>		<i>U. rigida</i>	
	[g/g]	D.E.	[g/g]	D.E.
Az.Red.	0,438	0,035	0,363	0,058
Glucosa	0,031	0,008	0,104	0,006
Xilosa	0,021	0,003	0,028	0,002
Insoluble	0,153	0,033	0,149	0,006

Anexo M. Datos de sacarificaciones

La siguiente tabla muestra los datos obtenidos de las sacarificaciones realizadas en 4 [ml] y 70 [ml].

Tabla 10. Concentraciones de azúcares reductores registrados durante las sacarificaciones en 4 [ml] y 70 [ml].

	4 [ml]		70 [ml]	
t [h]	Az. Red. [g/l]	D.E.	Az. Red. [g/l]	D.E.
0	1,60	0,35	0,96	0,35
3	6,82	0,22	-	-
5	6,92	0,23	7,73	0,28
24	8,96	0,13	7,97	0,28
48	9,35	0,61	9,32	0,25
72	10,32	0,05	2,20	0,85

La siguiente tabla muestra los datos obtenidos de la sacarificación SHF utilizada como medio para una fermentación posterior.

Tabla 11. Concentraciones de azúcares reductores, glucosa y xilosa durante la sacarificación SHF. (*) La xilosa no fue medida en duplicado por falta de disponibilidad de reactivos del kit.

	Az. Red.		Glucosa		Xilosa(*)
t [h]	[g/l]	D.E.	[g/l]	D.E.	[g/l]
0	0,11	0,10	0,77	0,02	0,13
3	5,10	0,24	3,29	0,06	0,53
5	5,88	0,07	3,42	0,04	0,58
24	7,51	0,15	5,15	0,47	0,62
48	7,79	0,13	4,76	0,03	0,54

Anexo N. Ensayos de Sacarificación con β -1,3-glucanasa BGLII

Se realizó un ensayo de hidrólisis enzimática sobre *U. rigida* utilizando una β -1,3-glucanasa BGLII en conjunto con las enzimas comerciales Celluclast® y Novozyme®. Las β -1,3-glucanasa hidrolizan los enlaces β -1,3 de glucanos, siendo su principal sustrato el polímero de almacenamiento laminarina. La actividad reportada de la enzima era de 49 [U/mg]ⁱⁱ, pero dado que se utilizó una muestra congelada, el valor entregado por un nuevo ensayo de actividad fue de 30 [U/mg].

Se realizaron las sacarificaciones de *U. rigida* con: (1) sólo β -1,3-glucanasa BGLII, (2) Celluclast® y Novozyme®, y (3) las tres enzimas juntas.

Dado que se disponía de esta nueva enzima, el fin de estos ensayos fue analizar si existía algún efecto sinérgico en conjunto con las enzimas comerciales. En todos los ensayos, la carga enzimática fue de 20 [FPU/g alga] para Celluclast®, 20 [CBU/g alga] para Novozyme® y 20 [U/g alga] para β -1,3-glucanasa. Además, la carga de sustrato fue del 5% p/v. El ensayo se realizó en un volumen de 4 [ml] con agitación 250 [rpm] y 50°C durante 72 [h]. El ensayo (1) se realizó en buffer fosfato de sodio 50 [mM], pH 7, mientras que los ensayos (2) y (3) en buffer acetato 50 [mM], pH 4,8. Las condiciones de sacarificación fueron las óptimas para las enzimas comerciales. Se tomaron muestras entre las 0 y 72 [h], las cuales fueron centrifugadas a 10.000 [rpm] por 5 [min] y se midieron azúcares reductores por el método del DNS. Los resultados se muestran a continuación.

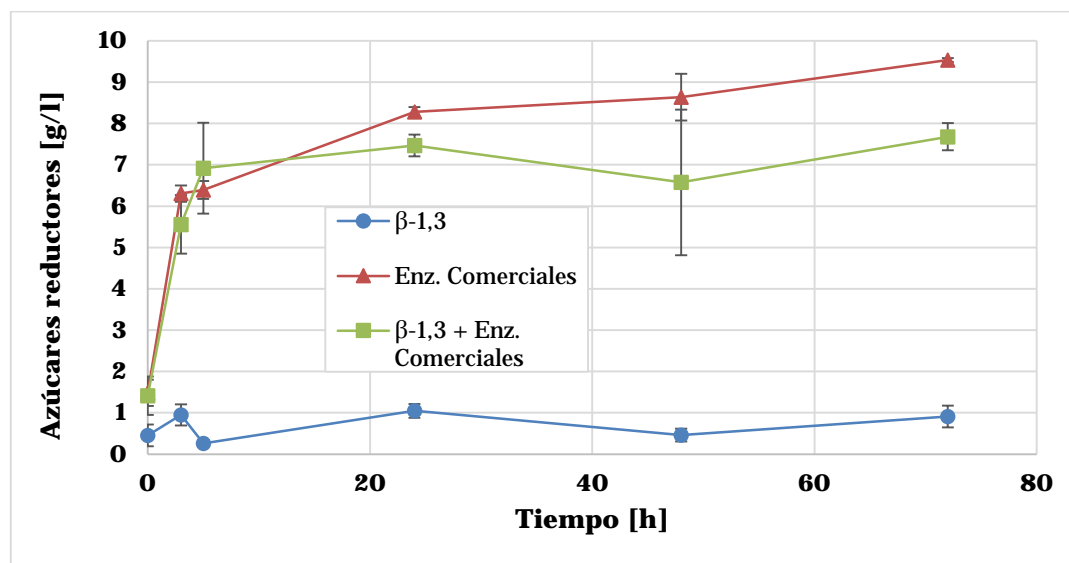


Figura 30. Azúcares reductores liberados durante los ensayos de sacarificación con β -1,3-glucanasa, Celluclast® y Novozyme®.

ⁱⁱ [U/mg] = μ moles de glucosa liberados por minuto por miligramo de proteína

Anexo O. Datos de estrategias SHF y SSF

La siguiente tabla muestra los datos de azúcares y etanol obtenidos de la fermentación SHF.

Tabla 12. Concentraciones de azúcares y etanol obtenidos de la fermentación SHF utilizando *S. stipitis*.

t [h]	Az. Red.		Glucosa		Xilosa		Etanol	
	[g/l]	D.E.	[g/l]	D.E.	[g/l]	D.E.	[g/l]	D.E.
0	9,07	0,14	4,71	0,32	0,54	0,01	0	0
3	7,48	0,32	4,46	0,09	-	-	0	0
5	8,13	0,66	4,40	0,27	-	-	0	0
24	7,68	0,31	4,27	0,13	-	-	0	0
48	8,28	0,80	4,07	0,24	-	-	0	0
72	7,71	0,72	4,53	0,16	0,55	0,01	0	0

La siguiente tabla muestra los datos de azúcares y etanol obtenidos de la fermentación SHF.

Tabla 13. Concentraciones de azúcares y etanol obtenidos de la fermentación SSF utilizando *S. stipitis*.

t [h]	Az. Red.		Glucosa		Xilosa		Etanol	
	[g/l]	D.E.	[g/l]	D.E.	[g/l]	D.E.	[g/l]	D.E.
0	1,10	0,70	0,15	0,07	0,01	0,01	0	0
3	4,17	0,36	1,84	0,13	0,28	0,01	0	0
5	5,12	0,51	2,09	0,13	0,30	0,02	0	0
24	4,93	0,43	2,12	0,23	0,41	0,04	0,31	0,20
48	1,14	0,48	0,23	0,38	0,41	0,04	2,01	0,03
72	1,09	0,53	0,04	0,12	0,40	0,07	2,16	0,02

La siguiente tabla muestra los datos de xilosa y etanol obtenidos de la fermentación de *S. stipitis* en xilosa.

Tabla 14. Concentraciones de xilosa y etanol obtenidos de la fermentación de *S. stipitis* en un medio con xilosa como única fuente de carbono.

t [h]	Xilosa		Etanol	
	[g/l]	D.E.	[g/l]	D.E.
0	9,17	1,40	0,00	0,00
3	8,47	0,36	0,10	0,00
5	7,88	0,56	0,36	0,03
24	4,26	0,65	2,78	0,24
48	0,72	0,91	4,06	0,26
72	0,10	0,75	4,59	0,00
144	0,00	0,17	4,39	0,15

Anexo P. Datos de estrategias simultánea y secuencial.

La siguiente tabla muestra los datos de azúcares y etanol obtenidos de la estrategia simultánea.

Tabla 15. Concentraciones de azúcares y etanol obtenidos de la estrategia simultánea utilizando co-fermentación de *S. cerevisiae* y *S. stipitis*.

t [h]	Az. Red.		Glucosa		Xilosa		Etanol	
	[g/l]	D.E.	[g/l]	D.E.	[g/l]	D.E.	[g/l]	D.E.
0	2,89	0,33	1,78	0,04	0,06	0,01	0,00	0,00
3	2,33	0,33	0,19	0,13	0,28	0,03	1,28	0,11
5	1,59	0,25	0,00	0,00	0,30	0,04	1,82	0,17
24	1,17	0,34	0,00	0,00	0,25	0,10	3,19	0,31
48	0,38	0,16	0,00	0,00	0,05	0,06	2,70	0,08
72	0,36	0,32	0,00	0,00	0,01	0,00	2,95	0,44
144	0,39	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00	2,17	0,30

La siguiente tabla muestra los datos de azúcares y etanol obtenidos de la estrategia secuencial.

Tabla 16. Concentraciones de azúcares y etanol obtenidos de la estrategia secuencial realizando una fermentación SSF con *S. cerevisiae*, seguida de una fermentación con *S. stipitis*.

t [h]	Az. Red.		Glucosa		Xilosa		Etanol	
	[g/l]	D.E.	[g/l]	D.E.	[g/l]	D.E.	[g/l]	D.E.
0	3,82	0,00	1,64	0,05	0,06	0,00	0,00	0,00
3	2,27	0,02	0,00	0,00	0,24	0,00	2,36	0,35
5	2,16	0,01	0,00	0,00	0,24	0,02	2,73	0,18
24	1,67	0,20	0,00	0,00	0,21	0,04	4,25	0,05
48	0,64	0,11	0,00	0,00	0,01	0,18	4,62	0,41
72	0,63	0,02	0,00	0,00	0,01	0,19	4,93	0,87
144	0,69	0,01	0,00	0,00	0,00	0,03	3,49	0,09